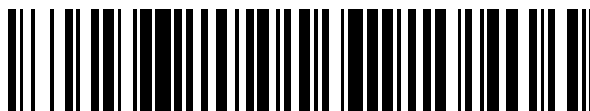


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 548**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2013** **PCT/CA2013/050425**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013** **WO13181755**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2013** **E 13801165 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017** **EP 2854841**

54 Título: **Isoformas de glicosilación de la calicreína-1 tisular humana**

30 Prioridad:

04.06.2012 US 201261655388 P
15.03.2013 US 201361789978 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2017

73 Titular/es:

DIAMEDICA THERAPEUTICS INC. (100.0%)
301 - 1665 Ellis Street
Kelowna BC V1Y 2B3, CA

72 Inventor/es:

CHARLES, MATTHEW;
KOLODKA, TADEUSZ y
WILLIAMS, MARK

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 625 548 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

Isoformas de glicosilación de la caliceína-1 tisular humana

Antecedentes

- 5 En individuos sanos, la liberación de insulina por el páncreas se asocia estrictamente a la glucemia. Una glucemia elevada como la que se produce después de las comidas se compensa rápidamente por un aumento correspondiente en la secreción de insulina. La diabetes *mellitus*, o simplemente diabetes, es un grupo de enfermedades metabólicas en las que una persona tiene hiperglucemia, debido a que el páncreas no produce suficiente insulina, o bien debido a que las células no responden a la insulina que se produce. Alrededor de 366 millones de personas en todo el mundo padecen diabetes *mellitus*. La diabetes sin tratar puede provocar muchas complicaciones. Las complicaciones agudas incluyen cetoacidosis diabética y coma hiperosmolar no cetósico. Las complicaciones a largo plazo graves incluyen enfermedad cardiovascular, insuficiencia renal crónica, retinopatía diabética, y neuropatía diabética. El tratamiento adecuado de la diabetes es, por tanto, importante y existe una necesidad de obtener tratamientos mejorados para el tratamiento de la diabetes.

Breve resumen de la invención

- 15 La presente invención incluye una composición, que comprende una primera forma madura y activa de un polipéptido de caliceína-1 tisular humana (KLK1) y una segunda forma madura y activa de un polipéptido de caliceína-1 tisular humana (KLK1):

en la que el primer polipéptido de KLK1 tiene tres glicanos ligados a N unidos a tres posiciones diferentes por polipéptido y el segundo polipéptido de KLK1 tiene dos glicanos unidos a dos posiciones diferentes por polipéptido; y

- 20 en la que el primer polipéptido de KLK1 y el segundo polipéptido de KLK1 están presentes en la composición en una proporción que varía de 45:55 a 55:45.

- Los tres glicanos del primer polipéptido de KLK1 son glicanos ligados a N en los residuos 78, 84, y 141. Los dos glicanos del segundo polipéptido de KLK1 son glicanos ligados a N en los residuos 78 y 84 pero no en 141. En algunos aspectos, la proporción del primer polipéptido de KLK1 y el segundo polipéptido de KLK1 en la composición es de 50:50.

La presente invención incluye una composición que incluye una isoforma triplemente glicosilada de un polipéptido de caliceína-1 tisular (KLK1) y una isoforma doblemente glicosilada de un polipéptido de caliceína-1 tisular (KLK1), en la que la isoforma triplemente glicosilada del polipéptido de KLK1 y la isoforma doblemente glicosilada del polipéptido de KLK1 están presentes en la composición en una proporción que varía de 45:55 a 55:45.

- 30 La isoforma triplemente glicosilada incluye glicanos ligados a N en los residuos aminoácidos 78, 84, y 141 de KLK1, como se define por SEQ ID NO:1. La isoforma doblemente glicosilada incluye glicanos ligados a N en los residuos aminoácidos 78 y 84, pero no en el residuo aminoácido 141 de KLK1, como se define por SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, la isoforma triplemente glicosilada y la isoforma doblemente glicosilada de KLK1 están presentes en la composición en una proporción de 50:50. En algunos aspectos de una composición de la presente invención, uno o más polipéptido(s) de KLK1 son un polipéptido de caliceína-1 tisular humana (hKLK1).

En algunos aspectos de una composición de la presente invención, uno o más polipéptido(s) de KLK1 incluyen los residuos aminoácidos 78-141 de SEQ ID NO:1 o los residuos aminoácidos 78-141 de SEQ ID NO:2.

En algunos aspectos de una composición de la presente invención, uno o más polipéptido(s) de KLK1 incluyen los residuos aminoácidos 25-262 de SEQ ID NO:1 o los residuos aminoácidos 25-262 de SEQ ID NO:2.

- 40 En algunos aspectos de una composición de la presente invención, uno o más polipéptido(s) de KLK1 incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2.

- En algunos aspectos de una composición de la presente invención, uno o más polipéptido(s) de KLK1 incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con los residuos aminoácidos 25-262 de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2.

En algunos aspectos de una composición de la presente invención, uno o más polipéptido(s) de KLK1 incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con los residuos aminoácidos 25-262 de SEQ ID NO:2, y en la que dicho(s) polipéptido(s) de KLK1 comprende(n) E145 y/o A188.

- 50 En algunos aspectos de una composición de la presente invención, uno o más polipéptido(s) de KLK1 incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con los residuos aminoácidos 25-262 de SEQ ID NO:2, y dicho(s) polipéptido(s) de KLK1 comprende(n) Q145 y/o V188.

En algunos aspectos de una composición de la presente invención, el/los polipéptido(s) de KLK1 tiene(n) SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2.

En algunos aspectos de una composición de la presente invención, el/los polipéptido(s) de KLK1 tiene(n) los residuos 25-262 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:2.

- 5 En algunos aspectos de una composición de la presente invención, una composición incluye además un diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunos aspectos de una composición de la presente invención, la composición está sustancialmente libre de otras isoformas glicosiladas (glicoformas) de KLK1.

- 10 En algunos aspectos de una composición de la presente invención, la composición tiene niveles de endotoxina de menos de 1 UE/mg de proteína, proteína de célula huésped de menos de 100 ng/mg de proteína total, ADN de célula huésped de menos de 10 pg/mg de proteína total, y/o está sustancialmente libre de agregados (apareciendo más de aproximadamente un 95 % como un pico único por SEC HPLC).

- 15 La presente invención también incluye un dispositivo que incluye una composición como se describe en el presente documento, en la que el dispositivo es adecuado para administrar la composición por vía subcutánea. En algunos aspectos, el dispositivo es una jeringuilla. En algunos aspectos, la jeringuilla incluye además un montaje con aguja hipodérmica unido a la jeringuilla. En algunos aspectos, la jeringuilla incluye además un recubrimiento protector alrededor del montaje con aguja. En algunos aspectos, la jeringuilla tiene una aguja que tiene una longitud de 1,27 cm (½ pulgadas) a 1,59 cm (5/8 pulgadas) y tiene un calibre de 25 a aproximadamente 31.

- 20 Se divulgan procedimientos de tratamiento de un sujeto que necesita el mismo, incluyendo administrar al sujeto una composición como se describe en el presente documento.

En algunos aspectos de los procedimientos, la administración es administración subcutánea.

- 25 En algunos aspectos de los procedimientos en los que el sujeto tiene diabetes de tipo 1 (DT1) o diabetes de tipo 2 (DT2) confirmada. En algunos aspectos, el sujeto tiene diabetes de tipo 2 (DT2), resistencia a la insulina, prediabetes, diabetes, intolerancia a la glucosa, trastorno metabólico de la glucosa, hiperglucemia, hiperinsulinemia, o síndrome metabólico. En algunos aspectos, el sujeto tiene diabetes autoinmunitaria latente de adultos (LADA).

En algunos aspectos de los procedimientos, el sujeto también se trata con un antidiabético. En algunos aspectos, el antidiabético es insulina o un mimético de incretina.

- 30 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se puede usar cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o la prueba de la presente invención, se describen los procedimientos y materiales preferentes. Para los propósitos de la presente invención, se definen los siguientes términos a continuación.

- 35 Los artículos “un/uno” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” quiere decir un elemento o más de un elemento.

- 40 Por “aproximadamente” se quiere decir una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía tanto como un 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % respecto de una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

- 45 En toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, las palabras “comprender”, “comprende” y “que comprende” se entenderá que implican la inclusión de una etapa, elemento o grupo de etapas o elementos establecido pero no la exclusión de ninguna otra etapa, elemento o grupo de etapas o elementos. Por “que consiste en” se quiere decir que incluye, y se limita a, cualquiera que sea la expresión que sigue a “que consiste en”. Por tanto, la expresión “que consiste en” indica que los elementos enumerados se requieren o son obligatorios, y que no puede estar presente ningún otro elemento. Por “que consiste esencialmente en” se quiere decir que incluye cualquier elemento enumerado después de la expresión, y se limita a otros elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por tanto, la expresión “que consiste esencialmente en” indica que los elementos enumerados se requieren o son obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o no materialmente a la actividad o acción de los elementos enumerados.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gel de SDS-PAGE teñido con tinción Coomassie Blue de varias cantidades de KLK1 humana recombinante purificada a partir de líneas celulares CHO o 293 después de transfección transitoria. El carril 1 es una

escalera de proteína preteñida, los pesos moleculares de los patrones están escritos a un lado (en kDa). Los carriles 2-5 tienen KLK1 purificada a partir de células CHO (carril 2 – 14 µg de proteína; carril 3 – 7 µg de proteína; carril 4 – 3,5 µg de proteína; carril 5 – 1,35 µg de proteína). El carril 6 tiene 14 µl de proteína KLK1 purificada a partir de transfección transitoria de células 293.

La figura 2 es una inmunoelectrotransferencia teñida con anticuerpos policlonales anti-KLK1 humana murinos de varias cantidades de KLK1 humana recombinante purificada a partir de líneas celulares CHO o 293 después de transfección transitoria. Los carriles 1 y 6 están cargados con una escalera de proteína preteñida, los pesos moleculares de los patrones están escritos a un lado (en kDa). Los carriles 2-5 tienen KLK1 purificada a partir de células CHO (carril 2 – 5 µl de proteína; carril 3 – 2,5 µl de proteína; carril 4 – 1,25 µl de proteína). El carril 5 tiene 2,5 µl de proteína KLK1 purificada a partir de transfección transitoria de células 293.

La figura 3 son resultados de cromatograma. La figura 3A es un cromatograma que representa la absorbancia A280 de varias fracciones de elución de la resina de interacción hidrófoba Octyl Sepharose usada para separar las glicoformas de KLK1 humana recombinante de bajo y alto peso molecular. La figura 3B es una ampliación del pico mostrado en la figura 3A. ■ representa la concentración de proteína (medida a A280); ● representa el % de tampón de elución; ○ representa el % de tampón de carga/tampón de lavado; y □ representa el pH de la solución que sale de la columna.

La figura 4 es una SDS-PAGE de muestras de las fracciones de elución de la resina de interacción hidrófoba Octyl Sepharose usada para separar los isómeros de KLK1 humana recombinante de bajo y alto peso molecular.

La figura 5 son resultados de cromatograma. La figura 5A es un cromatograma del análisis RP-HPLC de KLK1 humana aislada a partir de células CHO que representa la mezcla glicoformas de bajo y alto peso molecular (proporción aproximada de 45:55) de hKLK1. La figura 5B es un cromatograma del análisis RP-HPLC de la fracción B11 (glicoforma de KLK1 humana de alto peso molecular). La figura 5C es un cromatograma del análisis RP-HPLC de la fracción B5 (glicoforma de KLK1 humana de bajo peso molecular).

La figura 6 es un cromatograma del análisis RP-HPLC de KLK1 humana aislada a partir de células CHO que representa una mezcla 50:50 aproximada de glicoformas de bajo y alto peso molecular de hKLK1.

La figura 7 es un gráfico de la tasa de infusión de glucosa en rata Sprague-Dawley durante un pinzamiento hiperinsulinémico-normoglucémico, después de la administración de HU KLK1, rhKLK1, glicoformas de KLK1 de bajo peso molecular o alto peso molecular.

La figura 8 es un gráfico del área bajo la curva (ABC) de la tasa de infusión de glucosa en la figura 7.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones de glicoformas de polipéptidos de calicreína-1 tisular (KLK1) de proporciones definidas de polipéptidos doble y triplemente glucosilados de KLK1 como se define en las reivindicaciones, que son útiles en el tratamiento de la diabetes. Sorprendentemente, estas composiciones son más eficaces en el tratamiento y control de la diabetes que las composiciones naturales de KLK1.

Las calicreínas son miembros de una superfamilia génica de serina proteasas que comprenden al menos 15 proteínas separadas y distintas (denominadas calicreína tisular 1 a 15) (Yousef *et al.*, 2001, *Endocrine Rev*; 22:184-204). La calicreína-1 tisular se produce predominantemente en el páncreas, de ahí el origen del nombre a partir del término griego 'kallikrein'. También se produce en las glándulas salivales y en los riñones y se encuentra en el aparato genitourinario y en el músculo esquelético. La calicreína-1 tisular también es conocida como KLK1, calicreína pancreática/renal, calicreína-1 glandular, serina proteasa calicreína 1, calicreína-1, calicreína renal, calicreína renal/páncreas/salival, calicreína del riñón/páncreas/glándula salival. Como se usa en el presente documento, el término "calicreína-1 tisular" y "KLK1" son sinónimos.

La calicreína-1 tisular es una serina proteasa de tipo tripsina. En tejidos humanos y animales, la calicreína-1 tisular escinde el cininógeno en lisil-bradicinina (también conocida como calidina), una cinina decapeptídica que tiene efectos fisiológicos similares a los de bradicinina. La bradicinina es un péptido que hace que los vasos sanguíneos se dilaten y, por lo tanto, hace que la presión sanguínea disminuya. La calidina es idéntica a bradicinina con un residuo lisina adicional añadido en el extremo N terminal y señala a través del receptor de bradicinina.

El gen de KLK1 codifica una pre-pro-enzima individual que tiene una longitud de 262 residuos aminoacídicos y que incluye la "pre-" secuencia (residuos 1-18) y la "pro-" secuencia (residuos 19-24), que se activa por enzimas de tipo tripsina. La KLK1 humana de forma madura y activa es una glucoproteína de 238 residuos aminoacídicos (residuos 25-262) con un peso molecular de 26 kDa y un pI teórico de 4,6. La KLK1 tiene cinco enlaces disulfuro en su estructura terciaria que se cree que son responsables de la alta estabilidad de la proteína, tanto frente a la digestión con tripsina como de la inactivación térmica.

La secuencia de aminoácidos de la calicreína-1 tisular está disponible para una amplia variedad de especies, incluyendo, pero no limitándose a, ser humano (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2), ratón (véase, por ejemplo, GenBank:

5 AAA39349,1, 1 de febrero de 1994); gato doméstico (véase, por ejemplo, secuencia de referencia NCBI: XP_003997527,1, 6 de noviembre de 2012); gorila (véase, por ejemplo, secuencia de referencia NCBI: XP_004061305,1, 3 de diciembre de 2012); ganado bovino (véase, por ejemplo, GenBank: AAI51559,1, 2 de agosto de 2007); perro (véase, por ejemplo, secuencia de referencia CBI: NP_001003262,1, 22 de febrero de 2013); rata (véase, por ejemplo, GenBank: CAE51906,1, 25 de abril de 2006); y *Papio anubis* (véase, por ejemplo, secuencia de referencia NCBI: XP_003916022,1, 4 de septiembre de 2012). La KLK1 se conserva funcionalmente en todas las especies en su capacidad para liberar el péptido natriurético auricular, lis-bradisinina, del cininógeno de bajo peso molecular. Un polipéptido de calicreína-1 tisular de la presente invención puede tener cualquiera de las secuencias de aminoácidos conocidas para KLK1, o un fragmento o variante de las mismas.

10 En algunos aspectos, un polipéptido de calicreína-1 tisular es una calicreína-1 tisular humana (hKLK1), incluyendo, pero sin limitarse a, un polipéptido de hKLK1 representado por SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2.

Por ejemplo, la hKLK1 se puede representar por la secuencia de aminoácidos de GenBank Ref. NP_002248,1, que tiene la secuencia de aminoácidos preproteínica de KLK1 completa mostrada a continuación:

```

MWFLVLCLALSLGGTGAAPPIQSRIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQC      50
GGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFD DENTA QFVHVSES FPHPG      100
FNMSLLENHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVG      150
STCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDECKKAHVQKVTD FMLCV      200
GHLEGGKDT CVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSVAVRVLSY      250
VKWIEDTIAENS (SEQ ID NO:1)

```

15 Los aminoácidos 1 a 18 de SEQ ID NO:1 representan el péptido señal, los aminoácidos 19 a 24 representan secuencias propeptídicas, y los aminoácidos 25 a 262 representan el péptido maduro. Por tanto, la preproteína incluye un presunto péptido señal de 17 aminoácidos, un fragmento proenzimático de 7 aminoácidos y una proteína KLK1 madura de 238 aminoácidos.

20 Como se describe en el ejemplo 1, una segunda secuencia de aminoácidos para KLK1 humana se representa por SEQ ID NO:2, mostrada a continuación:

```

MWFLVLCLALSLGGTGAAPPIQSRIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQC      50
GGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFD DENTA QFVHVSES FPHPG      100
FNMSLLENHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTQEPEVG      150
STCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDECKKVHVQKVTD FMLCV      200
GHLEGGKDT CVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSVAVRVLSY      250
VKWIEDTIAENS (SEQ ID NO:2)

```

25 De nuevo, los aminoácidos 1 a 18 de SEQ ID NO:1 representan el péptido señal, los aminoácidos 19 a 24 representan secuencias propeptídicas, y los aminoácidos 25 a 262 representan el péptido maduro. Por tanto, la preproteína incluye un presunto péptido señal de 17 aminoácidos, un fragmento proenzimático de 7 aminoácidos y una proteína KLK1 madura de 238 aminoácidos.

30 Una comparación entre SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 muestra diferencias en dos aminoácidos entre las dos secuencias de aminoácidos de hKLK1. Los polimorfismos mononucleotídicos (SNP) entre los dos individuos dentro de una especie representan una sustitución de E por Q en el residuo aminoacídico 145 de 262 y una sustitución de A por V en la posición 188 de 262. La SEQ ID NO:1 tiene un E (ácido glutámico) en la posición 145 y una A (alanina) en la posición 188, mientras que la SEQ ID NO:2 tiene una Q (glutamina) en la posición 145 y una V (valina) en la posición 188.

35 Un polipéptido de KLK1 de la presente invención puede tener un E en la posición 145; puede tener una Q en la posición 145; puede tener una A en la posición 188; puede tener una A en la posición 188; puede tener un E en la posición 145 y una A en la posición 188; puede tener una Q en la posición 145 y una V en la posición 188; puede

tener una Q en la posición 145 y una A en la posición 188; o puede tener un E en la posición 145 y una V en la posición 188.

En determinados modos de realización, un polipéptido de calicreína-1 tisular puede incluir los residuos 1-262, residuos 19-262, o residuos 25-262 de una secuencia preproteínica de calicreína, incluyendo, pero sin limitarse a KLK1 humana que tiene SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, y fragmentos y variantes de la misma. Los fragmentos y variantes de un polipéptido de KLK1 mantienen la capacidad enzimática para liberar el péptido natriurético auricular, lis-bradisinina, del cininógeno de bajo peso molecular. En algunos modos de realización, una variante o fragmento activo mantiene la actividad de serina proteasa de un polipéptido de KLK1 que libera la calidina de un precursor de mayor peso molecular tal como cininógeno, o que escinde un sustrato similar a cininógeno tal como D-val-leu-arg-7-amido-4-trifluorometilcumarina para liberar un fragmento colorimétrico o fluorométrico.

Una "variante" de un polipéptido de partida o de referencia es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la del polipéptido de partida o de referencia. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, deleciones de, inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés. Un aminoácido variante, en este contexto, se refiere a un aminoácido diferente del aminoácido en la posición correspondiente en una secuencia polipeptídica de partida o de referencia. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción de variante o mutante final, siempre que la construcción final posea las características funcionales deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del polipéptido, tales como cambiar el número o posición de sitios de glicosilación.

Una variante de polipéptido puede tener una identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 98,5 %, al menos aproximadamente un 99 %, o al menos aproximadamente un 99,5 % con una secuencia de referencia, tal como, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento.

En algunos aspectos, un polipéptido de KLK1 tiene una identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 98,5 %, al menos aproximadamente un 99 %, o al menos aproximadamente un 99,5 % con respecto a SEQ ID NO:1, o con respecto a un fragmento de SEQ ID NO:1, tal como, por ejemplo, los residuos 25-262 o los residuos 78-141 de SEQ ID NO:1. Un polipéptido de KLK1 de este tipo puede tener un E o una Q en el residuo aminoacídico 145, y/o una A o una V en la posición 188.

En algunos aspectos, un polipéptido de KLK1 tiene una identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 98,5 %, al menos aproximadamente un 99 %, o al menos aproximadamente un 99,5 % con respecto a SEQ ID NO:2, o con respecto a un fragmento de SEQ ID NO:2, tal como, por ejemplo, los residuos 25-262 o los residuos 78-141 de SEQ ID NO:2. Un polipéptido de KLK1 de este tipo puede tener un E o una Q en el residuo aminoacídico 145, y/o una A o una V en la posición 188.

"Porcentaje (%)" de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a un polipéptido se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos en la secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para lograr el porcentaje de identidad de secuencia máximo, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático públicamente disponible, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California.

Para los propósitos en el presente documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que se puede expresar alternativamente como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se puede calcular como sigue:

100 veces la fracción X/Y, en la que X es el número de residuos aminoacídicos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias en esa alineación de A y B del programa, y en la que Y es el número total de residuos aminoacídicos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no equivaldrá al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A.

Las variantes también pueden incluir secuencias añadidas al polipéptido de referencia para facilitar la purificación, para mejorar la semivida metabólica o para hacer que el polipéptido sea más fácil de identificar, por ejemplo, una región Fc, una marca His y/o una secuencia de PEGilación.

El término "fragmento" incluye porciones más pequeñas de un polipéptido de KLK1 que mantiene la actividad de un polipéptido de KLK1. Los fragmentos incluyen, por ejemplo, un fragmento de polipéptido de KLK1 que varía de tamaño de aproximadamente 20 a aproximadamente 50, de aproximadamente 20 a aproximadamente 100, de aproximadamente 20 a aproximadamente 150, de aproximadamente 20 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 250 aminoácidos de longitud. En otros modos de realización, un fragmento de polipéptido de KLK1 varía de tamaño de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, de aproximadamente 50 a aproximadamente 150, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 aminoácidos de longitud. En otros modos de realización, un fragmento de polipéptido de KLK1 varía de tamaño de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, de aproximadamente 100 a aproximadamente 200, de aproximadamente 100 a aproximadamente 250, de aproximadamente 150 a aproximadamente 175, de aproximadamente 150 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 aminoácidos de longitud. En otros modos de realización ilustrativos, un fragmento de polipéptido de KLK1 varía de tamaño de aproximadamente 200 a aproximadamente 250 aminoácidos de longitud. Determinados modos de realización comprenden un fragmento de polipéptido de una KLK1 de longitud completa de aproximadamente, hasta aproximadamente, o al menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 o más residuos aminoacídicos (por ejemplo, contiguos). En algunos modos de realización, un fragmento puede tener los residuos 25-262 o los residuos 78-141 de una secuencia preproteínica. En algunos modos de realización, un fragmento puede ser de cualquiera de dichos tamaños de fragmento, como se describe anteriormente, de SEQ D NO:1 o SEQ IDNO:2.

Una secuencia "natural" o "de referencia" o la secuencia de una proteína/polipéptido "natural" o "de referencia" puede ser la secuencia de referencia de la que se derivan las variantes de polipéptidos a través de la introducción de cambios. En general, la secuencia de aminoácidos "natural" para una proteína dada es la secuencia que es más común en la naturaleza. De forma similar, una secuencia génica "natural" es la secuencia polinucleotídica para el gen que se encuentra de forma más común en la naturaleza. Se pueden introducir mutaciones en un gen "natural" (y por tanto la proteína que lo codifica) a través de procesos naturales o bien a través de medios inducidos por el ser humano.

Expresión de KLK1 recombinante

Los polipéptidos de KLK1 y las mezclas descritas en el presente documento se pueden preparar por cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica, incluyendo técnicas recombinantes. Como ejemplo general, se puede preparar KLK1 por un procedimiento que incluye una o más de las etapas de: preparar una construcción que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una rhKLK1 y que está ligada funcionalmente a un elemento regulador; introducir la construcción en una célula huésped; cultivar la célula huésped para expresar la rhKLK1; y aislar la rhKLK1 de la célula huésped. La construcción y el sistema de expresión pueden ser tales que la rhKLK1 madura o activa se exprese a partir de la célula huésped. De forma alternativa, la rhKLK1 se puede expresar en una forma inactiva, tal como un propéptido, y la actividad de serina proteasa rhKLK1 se puede activar (por ejemplo, retirando la secuencia "pro") después de que la rhKLK1 se aísle de la célula huésped.

Para expresar un polipéptido deseado, se puede insertar una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, o un equivalente funcional, en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Se pueden usar procedimientos que son bien conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control transcripcionales y traduccionales apropiados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Dichas técnicas se describen en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2001), y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (2003).

Es conocida una variedad de sistemas de vector de expresión/huésped y se pueden utilizar para contener y expresar secuencias polinucleotídicas. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago, plásmido o cósmido recombinantes; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales, incluyendo sistemas de células de mamífero. Si se usa un sistema de expresión de células distintas de mamífero (tal

como bacterias) entonces se necesitaría usar un proceso para añadir grupos glucano a la rhKLK1, tales como células genomanipuladas que expresen las enzimas requeridas para la glicosilación de tipo mamífero.

En células huésped de mamífero, en general están disponibles varios sistemas de expresión basados en virus. Por ejemplo, en casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, las secuencias que codifican un polipéptido de interés se pueden unir a un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y la secuencias líder tripartita. Se puede usar la inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma vírico para obtener un virus viable que pueda expresar el polipéptido en células huésped infectadas (Logan y Shenk, 1984, *PNAS USA*; 81:3655-3659). Además, se pueden usar potenciadores de transcripción, tales como el potenciador del virus de sarcoma de Rous (RSV), para incrementar la expresión en células huésped de mamífero.

Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero incluyen líneas CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, 1977, *J Gen Virol*; 36:59); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, *Biol Reprod*; 23:243-251); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather *et al.*, 1982, *Annals NY Acad Sci*; 383:44-68); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas de células huésped de mamífero incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células DHFR-CHO (Urlaub *et al.*, 1980, *PNAS USA*; 77:4216); y líneas celulares de mieloma tales como NSO y Sp2/0.

El ADN exógeno de la presente invención obtenido por clonación genómica o de ADNc o por síntesis génica proporciona polipéptidos de KLK1 recombinante (rKLK1). Los productos de polipéptidos de KLK1 de expresión de cultivo celular en células de vertebrados (por ejemplo, de mamífero y aviar) se pueden caracterizar además por la libertad de asociación con proteínas humanas u otros contaminantes, que se pueden asociar con KLK1 en su entorno natural de células de mamífero o en líquidos extracelulares tales como plasma u orina. Los polipéptidos de la invención también pueden incluir un residuo aminoacídico de metionina inicial (en la posición 1). Determinados modos de realización, por lo tanto, incluyen células huésped (por ejemplo, células huésped eucariotas tales como células CHO, células 293) que comprenden un polinucleótido recombinante o introducido que codifica un polipéptido de KLK1 descrito en el presente documento, tal como el polipéptido de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2. También se incluyen células huésped que comprenden un polinucleótido que codifica un polinucleótido de KLK1 recombinante (por ejemplo, no natural) descrito en el presente documento, tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:2.

Los polipéptidos de KLK1 expresados en cultivo celular de la presente invención se pueden aislar o purificar usando, por ejemplo, separaciones cromatográficas o separaciones inmunológicas que implican preparaciones de anticuerpos monoclonales y/o policlonales, o usando inhibidores o sustratos de serina proteasas para cromatografía de afinidad. Como será evidente para los expertos en la técnica, las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:2 enumeran la secuencia para pre-pro KLK1. Si el gen que codifica cualquiera de estas secuencias se expresa en células de mamífero, el péptido señal de 17 aminoácidos (residuos 1-18) debería dar como resultado el polipéptido de KLK1 que se va a secretar por la célula, y el péptido señal retirado por la célula. Si no se desea tener el polipéptido secretado, o si se usan células distintas de mamífero para la expresión, se puede generar un gen que codifica KLK1 en el que la secuencia señal se omite o se reemplaza por otra secuencia. La pro-secuencia de 7 aminoácidos (residuos 19-24) inhibirá la actividad serina proteasa de la KLK1 y se puede retirar para permitir la actividad del polipéptido de KLK1 maduro. La pro-secuencia se puede retirar después de que el polipéptido de KLK1 se aisle, por ejemplo, exponiendo la pro-KLK1 a tripsina en condiciones que permitan la escisión de la pro-secuencia, o generando un gen que codifica la KLK1 en la que la pro-secuencia se omite o se reemplaza por otra secuencia.

En determinados aspectos, los polipéptidos de KLK1 descritos en el presente documento se pueden "etiquetar" por asociación covalente con una sustancia marcadora detectable (tal como, por ejemplo, radiomarcadores tales como I^{125} o P^{32} y marcadores no isotópicos tales como biotina) para proporcionar reactivos útiles en la detección y cuantificación de KLK1 en tejido sólido y muestras de fluido tales como sangre u orina.

Además de los procedimientos de producción recombinante, se pueden producir polipéptidos de rhKLK1 por síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida (véase, por ejemplo, Merrifield, 1963, *J Am Chem Soc*; 85:2149-2154). Se puede realizar la síntesis de proteínas usando técnicas manuales o por automatización. Se puede lograr una síntesis automatizada, por ejemplo, usando el sintetizador peptídico Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). De forma alternativa, varios fragmentos se pueden sintetizar químicamente por separado y combinar usando procedimientos químicos para producir el polipéptido deseado. También se incluye la expresión sin células de proteínas. Estos modos de realización y modos de realización relacionados utilizan típicamente ARN polimerasa purificada, ribosomas, ARNt y ribonucleótidos; estos reactivos se pueden producir por extracción de células o a partir de un sistema de expresión basado en células.

Para los procesos de síntesis que no dan como resultado polipéptidos de KLK1 glicosilados, también se puede emplear un proceso para añadir grupos glucano ligados a N, de tipo mamífero, en la posición 78 y 84 para generar las glicoformas de bajo peso molecular (doblemente glicosilada) y en la posición 78, 84 y 141 para generar las glicoformas de alto peso molecular (triplemente glicosilada) del polipéptido de rhKLK1.

5 Glicoformas

La presente invención se refiere a composiciones de varias glicoformas de polipéptidos de calicreína-1 tisular (KLK1), incluyendo composiciones que comprenden proporciones definidas de polipéptidos doble y triplemente glicosilados de KLK1 como se define en las reivindicaciones.

10 La secuencia de aminoácidos de calicreína-1 tisular indica que existen tres sitios de glicosilación ligados a Asn (ligados a N) potenciales en el polipéptido, en las posiciones de aminoácidos 78, 84, y 141 (con relación a la secuencia preproteínica intacta en la secuencia de aminoácidos mostrada, por ejemplo, en SEQ ID NO:1), así como supuestos sitios de glicosilación ligados a O.

15 KLK1 está presente en circulación solo en cantidades pequeñas, se encuentra en el suero a 3,5+/-0,4 ng/ml (Chao y Chao, 1996, *Hypertension*; 27:491-494). Una vía de eliminación principal de KLK1 del cuerpo humano es a través de los riñones. La calicreína-1 tisular aislada de orina humana aparece en un gel de SDS PAGE en dos bandas, una glicoforma de bajo peso molecular y una glicoforma de alto peso molecular. La calicreína humana urinaria (HU KLK) contiene aproximadamente un contenido de carbohidrato de un 30 % en base al peso molecular estimado por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS). La calicreína humana tiene tres sitios de glicosilación ligados a Asn (ligados a N) potenciales en la posición 78, 84 y 141. En un análisis más riguroso, se ha
20 determinado que la KLK1 humana urinaria está completamente glicosilada en las posiciones 78 y 84, pero solo está parcialmente glicosilada en la posición 144, con glicosilación solo de un 60 % en la posición 141 (véase el documento WO/1989/000192). La glicosilación ligada a O no se detecta en la KLK1 natural.

25 El análisis de KLK1 humana recombinante (rhKLK1) expresada a partir de células CHO, detecta un patrón de glicosilación similar como en la KLK1 humana procedente de orina, esto es, un 40 % de los polipéptidos demostraron glicosilación ligada a N solo en dos posiciones, las posiciones 78 y 84, y un 60 % de los polipéptidos demostraron glicosilación ligada a N en las tres posiciones, las posiciones 78, 84 y 141 (Lu *et al.*, 1996, *Protein Expression and Purification*; 8:227-237).

30 Antes de la presente invención, la única proporción conocida para la glicoforma de bajo peso molecular de KLK1 con respecto a las glicoformas de alto peso molecular de rhKLK1 es de 40:60 (bajo:alto). Como se usa en el presente documento, el término "glicoforma" se refiere a varias isoformas de KLK1 que difieren con respecto al número o tipo de grupos glucano unidos (es decir, carbohidratos, polisacáridos, oligosacáridos o grupos de glicosilación).

35 Por análisis SDS-PAGE, los polipéptidos de KLK1 glicosilados solo en dos de las tres posiciones disponibles (posiciones 78 y 84) se detectan como una banda de bajo peso molecular y se denominan en el presente documento como la glicoforma de KLK1 doblemente glicosilada de bajo peso molecular (o como KLK1 "baja" o "doble"). Por análisis SDS-PAGE, los polipéptidos de KLK1 glicosilados en las tres posiciones (posiciones 78, 84, y 141) se detectan como la banda de alto peso molecular y se denominan en el presente documento como la glicoforma de KLK1 triplemente glicosilada de alto peso molecular (o KLK1 "alta" o "triple").

40 La presente invención incluye composiciones de un primer polipéptido de calicreína-1 tisular y un segundo polipéptido de calicreína-1 tisular, en las que el primer polipéptido de calicreína-1 tisular tiene tres glicanos unidos a las tres posiciones diferentes disponibles para glicosilación en el polipéptido y el segundo polipéptido de calicreína-1 tisular tiene dos glicanos unidos a solo dos de las tres posiciones diferentes disponibles para glicosilación en el polipéptido, como se define en las reivindicaciones y en las que el primer y segundo polipéptidos de rhKLK1 están presentes en una proporción que varía de 45:55 a 55:45 (alto:bajo).

45 En algunos modos de realización, una proporción de glicoformas de alto peso molecular con respecto a glicoformas de bajo peso molecular es de 50:50. En algunos modos de realización, la proporción no es 60:40 (alto:bajo). En algunos modos de realización, la proporción no es 40:60 (alto:bajo).

Aislamiento de KLK1 de bajo y alto peso molecular

50 Las proporciones de las isoformas doble y triplemente glicosiladas de KLK1 se pueden detectar y cuantificar por una variedad de procedimientos, incluyendo cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), que puede incluir fase inversa (RP-HPLC), cromatografía de afinidad con lectina y electroforesis de afinidad con lectina.

En determinados modos de realización de la presente invención, la proporción de las glicoformas de bajo (doblemente glicosilada) y alto (triplemente glicosilada) peso molecular de KLK1 es de 50:50 (bajo:alto).

55 En otros modos de realización, la proporción está entre 45:55 y 55:45 incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 46:54, aproximadamente 47:53, aproximadamente 48:52, aproximadamente 49:51, aproximadamente 51:49,

aproximadamente 52:48, aproximadamente 53:47, y aproximadamente 54:46, incluyendo todos los números enteros y decimales entre sí.

Los modos de realización de la presente invención incluyen composiciones que comprenden un polipéptido de KLK1 recombinante (rKLK1), y las que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de rKLK1, y mezclas de dichas glicoformas de polipéptidos de rKLK1. En modos de realización particulares, el polipéptido de KLK1 es un polipéptido humano recombinante. La KLK1 humana recombinante (rhKLK1) puede proporcionar determinadas ventajas sobre otras fuentes de KLK1, tales como KLK1 urinaria (por ejemplo, KLK1 humana aislada de orina humana), incluyendo una preparación homogénea de rhKLK1, vía reguladora de licencia más sencilla, y opciones para alterar la secuencia de aminoácidos o patrón de glicosilación en base a condiciones de cultivo celular.

Como se describe anteriormente, la KLK1 humana recombinante se puede expresar como una KLK1 en la que la KLK1 está unida al pro-péptido. El pro-péptido se puede retirar antes de la separación de las glicoformas de bajo y alto peso molecular, o las glicoformas de bajo y alto peso molecular de KLK1 se pueden separar, y a continuación digerir para liberar el pro-péptido y generar así la KLK1 activa. La pro-KLK1 se puede activar por digestión con tripsina u otras enzimas. De forma alternativa, se puede expresar una variante de KLK1 que no codifique la pro-secuencia, o que codifique una pro-secuencia que se escinde por enzimas en la célula, generando así una KLK1 activa.

Se puede emplear una variedad de otros procedimientos para generar mezclas de glicoformas de bajo y alto peso molecular de KLK1. En un modo de realización, se puede introducir un vector que codifica la KLK1 en una línea celular, y se puede cribar una variedad de clones que expresan la KLK1 recombinante para determinar la proporción de glicoformas de bajo y alto peso molecular de KLK1 que se expresan. A continuación, se puede elegir una línea celular que exprese la proporción deseada de glicoformas de bajo y alto peso molecular de KLK1.

En otro modo de realización, una línea celular puede no expresar la proporción deseada de glicoformas de bajo y alto peso molecular de KLK1, pero las condiciones del cultivo celular se pueden manipular hasta que la línea celular exprese las glicoformas de bajo y alto peso molecular de KLK1 en la proporción deseada. En la técnica son conocidas varias técnicas para manipular las condiciones del cultivo celular de modo que se altere la glicosilación de proteínas, tales como la adición de determinados azúcares u otros nutrientes, niveles de oxígeno disuelto, etc. Un artículo ejemplar para manipular las condiciones del cultivo celular para influir en los cambios en la glicosilación se describe por Devasahayam, 2007, *Indian J Med Res*; 126:22-27.

En determinados aspectos, la preparación de calicreína purificada o procalicreína se puede separar en dos glicoformas diferentes por cromatografía de Sepharose - benzamidina. La columna de afinidad acoplada a benzamidina presenta una afinidad de unión diferencial para las dos glicoformas. La calicreína de alto peso molecular se une débilmente a la columna de afinidad y se puede eluir con una elución isocrática usando NaCl 50 mM en el tampón de elución, mientras que la calicreína de bajo peso molecular se une más fuertemente a la columna de benzamidina y se puede eluir por GdnHCl 2 M en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7,6. En otro modo de realización, la separación con benzamidina - Sepharose de las calicreínas de alto y bajo peso molecular se puede realizar usando una preparación de calicreína parcialmente purificada. Se pueden seguir las etapas descritas anteriormente para la purificación de calicreína recombinante para aislar una proporción específica de glicoformas de KLK1. Por ejemplo, si se desea una mezcla 50:50 (u otra) de glicoformas de bajo y alto peso molecular de KLK1, pero una línea celular está produciendo una mezcla 60:40 (alto:bajo), se pueden alterar las condiciones de lavado de la columna de modo que se eluya parte de la KLK1 de alto peso molecular y no quede retenida antes de la elución de la KLK1 restante, dando como resultado una mezcla 50:50 de glicoformas después de la purificación en columna. De forma alternativa, se pueden manipular las condiciones de elución de modo que quede retenida en la columna una fracción de la KLK1 de alto peso molecular, dando como resultado una mezcla 50:50 de glicoformas después de la purificación en columna.

También se puede usar una cromatografía de interacción hidrófoba usando una columna de Octyl Sepharose para aislar las procalicreínas de alto y bajo peso molecular. A una concentración de sulfato de amonio 1,0 M, Octyl Sepharose se puede unir selectivamente a la procalicreína obtenida a partir de la preparación de procalicreína parcialmente purificada. En dichas condiciones, la calicreína residual no unida en la preparación se eluye en la fracción de flujo continuo de la columna. La procalicreína de alto peso molecular en la preparación presenta una unión más débil a la columna de interacción hidrófoba y se eluye por una elución isocrática usando sulfato de amonio 1 M. La procalicreína de bajo peso molecular que presenta una unión más fuerte a la columna se puede eluir posteriormente por un gradiente lineal inverso de sulfato de amonio de 1,0 a 0 M. Como se describe anteriormente, si se desea una mezcla 50:50 o similar de glicoformas de bajo y alto peso molecular de KLK1, pero una línea celular está produciendo una mezcla 60:40 (alto:bajo), se pueden alterar las condiciones de lavado de columna de modo que se eluya parte de la KLK1 de alto peso molecular y no quede retenida antes de la elución de la KLK1 restante, dando como resultado una mezcla de 45:55 a 55:45 de glicoformas después de la purificación en columna. De forma alternativa, se pueden manipular las condiciones de elución de modo que quede retenida en la columna una fracción de la KLK1 de alto peso molecular, dando como resultado una mezcla de 45:55 a 55:45 de glicoformas después de la purificación en columna.

En determinados modos de realización, se pueden aislar las glicoformas por HPLC de fase inversa. En otro modo de realización, se pueden aislar las glicoformas por cromatografía de exclusión por tamaño se puede emplear, y preferentemente se puede emplear esta separación en soluciones en las que la KLK1 se purifica parcial o sustancialmente a partir del medio celular. Adicionalmente, las glicoformas se separan en condiciones no reductoras o sin desnaturalización para permitir que la KLK1 mantenga los enlaces disulfuro internos. Otra técnica que se puede emplear es la separación basada en carga o hidrofobicidad. El tercer grupo glucosilado que distinguía las glicoformas de bajo y alto peso molecular de KLK1 daría como resultado que la glicoforma de más alto peso molecular fuera hidrófila. Además, las dos glicoformas diferirían en el punto isoeléctrico debido al ácido siálico adicional en el resto carbohidrato. Una vez separadas, las glicoformas se pueden recombinar para generar la proporción deseada. De forma alternativa, se puede añadir cualquier glicoforma de bajo o alto peso molecular de KLK1 a una mezcla preexistente de glicoformas de KLK1 hasta que se logre la proporción deseada.

Por ejemplo, para generar una proporción 55:45 a partir de una mezcla inicial de 70:30 (glicoformas de alto a bajo peso molecular), se puede añadir una cantidad de glicoforma de KLK1 de bajo peso molecular hasta que la mezcla alcance 55:45. De forma similar, para generar una proporción 45:55 a partir de una mezcla inicial de 25:75 (glicoformas de alto a bajo peso molecular), se puede añadir KLK1 de alto peso molecular adicional para lograr una proporción 45:55.

Pureza. Las determinaciones de la pureza de una composición de la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a, determinación de endotoxina, proteína de célula huésped, ADN de célula huésped, y/o porcentaje de pureza de pico único por SEC HPLC.

Determinación de proteína de célula huésped. Se puede caracterizar la pureza con relación a los niveles de proteínas de célula huésped. Las células huésped usadas para expresión recombinante pueden variar de líneas celulares de bacterias y de levaduras derivada de especies de mamíferos o de insectos. Las células contienen de cientos a miles de proteínas de célula huésped (HCP) y otras biomoléculas que pueden contaminar el producto final. La HCP se puede secretar junto con la proteína de interés, o liberarse por lisado accidental de las células, y puede contaminar la proteína de interés. Se pueden aplicar dos tipos de procedimientos inmunológicos al análisis de HCP: inmunoelectrotransferencia (WB, de *Western blotting*) e inmunoensayo (IA), que incluye técnicas tales como ELISA y inmunoensayo tipo sándwich o procedimientos similares usando marcadores de información radioactivos, luminiscentes o fluorescentes. Las composiciones de la presente invención pueden incluir una proteína de célula huésped de menos de aproximadamente 500, menos de aproximadamente 400, menos de aproximadamente 300, menos de aproximadamente 200, menos de aproximadamente 100 o menos de aproximadamente 50 ng/mg de proteína total.

Determinación de ADN de célula huésped. Se puede caracterizar la pureza con relación a los niveles de ADN de célula huésped. La detección de ADN de célula huésped residual se puede realizar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con una variedad de cebadores para las secuencias en el genoma de la célula huésped. En general, se informa de que el ADN de célula huésped residual está por debajo de un determinado nivel umbral, pero también se puede cuantificar con un procedimiento de rPCR. Las composiciones de la presente invención pueden incluir ácido desoxirribonucleico (ADN) de célula huésped de menos de aproximadamente 100, menos de aproximadamente 90, menos de aproximadamente 80, menos de aproximadamente 70, menos de aproximadamente 60, menos de aproximadamente 50, menos de aproximadamente 40, menos de aproximadamente 30, menos de aproximadamente 20, o menos de aproximadamente 10 pg/mg de proteína total.

Pruebas de endotoxina. La endotoxina es sumamente potente, es termoestable, atraviesa los filtros de membrana de esterilización y está presente dondequiera que las bacterias estén o hayan estado presentes. Una unidad de endotoxina (UE) es una unidad de actividad biológica del patrón de referencia de endotoxina de la USP.

La prueba de endotoxinas bacterianas (BET) es una prueba para detectar o cuantificar endotoxinas de bacterias gramnegativas usando un lisado de amebocitos (leucocitos) a partir del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*). Se usa el reactivo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), aprobado por la FDA, para todas las pruebas de endotoxina de la USP. Existen tres procedimientos para esta prueba: procedimiento A, la técnica del coágulo de gel, que se basa en la formación de gel; procedimiento B, la técnica turbidimétrica, basada en el desarrollo de turbidez después de escisión de un sustrato endógeno; y procedimiento C, la técnica cromogénica, basada en el desarrollo de color después de escisión de un complejo péptido-cromógeno sintético.

Se describen dos tipos de pruebas de endotoxina en la USP <85> BET. Las pruebas fotométricas requieren un espectrofotómetro, programa informático específico para endotoxina y capacidad de impresión. El sistema fotométrico más sencillo es una unidad portátil que emplea un cartucho de LAL de un solo uso que contiene reactivos precalibrados secos; no existe la necesidad de patrones o reactivos líquidos. La unidad aprobada por la FDA se comercializa con el nombre Endosafe®-PTS™. El dispositivo requiere aproximadamente de 15 minutos para analizar cantidades pequeñas de muestra, una alícuota de 25 µl de CSP diluida en un tubo estéril, y para imprimir los resultados. Por el contrario, los procedimientos de coágulo de gel requieren un termobloque, pipetas aforadas y termómetro, agitadora vortical, reactivos de LAL liofilizados, agua para reactivo de LAL (LRW) para hidratar los reactivos y material de vidrio despirogenado. En esta prueba de coágulo, la muestra diluida y los reactivos líquidos requieren aproximadamente de una hora para la preparación de la muestra y del control positivo y una incubación de

una hora en el termobloque; los resultados se registran manualmente. Por tanto, la simplicidad y la velocidad del sistema automatizado lo hacen idealmente adecuado para el contexto farmacéutico.

Pureza por SEC HPLC. Se puede determinar el grado de agregación de rhKLK1 (glicoforma o mezcla de glicoformas aislada) por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), que separa las partículas en base a su tamaño. Es un procedimiento generalmente aceptado para determinar la estructura terciaria y la estructura cuaternaria de las proteínas purificadas. La SEC se usa principalmente para el análisis de moléculas grandes tales como proteínas o polímeros. La SEC funciona atrapando estas moléculas más pequeñas en los poros de una partícula. Las moléculas más grandes simplemente no atraviesan los poros ya que son demasiado grandes para entrar en los poros. Por lo tanto, las moléculas más grandes fluyen a través de la columna más rápido que las moléculas más pequeñas, esto es, cuanto más pequeña sea la molécula, mayor será el tiempo de retención. En determinados modos de realización, se puede definir específicamente la "pureza" de un polipéptido de KLK1 en una composición. Por ejemplo, determinadas composiciones pueden incluir un polipéptido de hKLK1 que sea puro en al menos aproximadamente un 80, al menos aproximadamente un 85, al menos aproximadamente un 90, al menos aproximadamente un 91, al menos aproximadamente un 92, al menos aproximadamente un 93, al menos aproximadamente un 94, al menos aproximadamente un 95, al menos aproximadamente un 96, al menos aproximadamente un 97, al menos aproximadamente un 98, al menos aproximadamente un 99, o un 100 %, incluyendo todos los decimales intermedios, como se mide, por ejemplo y sin limitar de ningún modo, por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), una forma bien conocida de cromatografía en columna usada con frecuencia en bioquímica y química analítica para separar, identificar y cuantificar compuestos. Determinadas composiciones también están sustancialmente libres de agregados (apareciendo más de aproximadamente un 95 % como un pico único por SEC HPLC). Determinados modos de realización están libres de agregados apareciendo más de aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, como un pico único por SEC HPLC.

En determinados modos de realización, la glicoforma o mezcla de glicoformas de bajo o alto peso molecular de rhKLK1, puede tener uno o más de las siguientes determinaciones de pureza: pureza de pico único de menos de aproximadamente 1 UE endotoxina/mg de proteína, menos de aproximadamente 100 ng proteína de célula huésped/mg de proteína, menos de aproximadamente 10 pg ADN de célula huésped/mg de proteína, y/o más de aproximadamente un 95 % por SEC HPLC.

Actividad de glicoformas de rhKLK1. La KLK1 es una serina proteasa que escinde el cininógeno de bajo peso molecular dando como resultado la liberación de calidina (lis-bradicinina). Esta actividad proteasa de las glicoformas de KLK1 aisladas se puede medir en un ensayo de actividad enzimática midiendo la escisión de cininógeno de bajo peso molecular o bien la generación de lis-bradicinina. En un formato de ensayo, se hace reaccionar un sustrato marcado con la glicoforma de KLK1, y se detecta la liberación de un fragmento marcado. Un ejemplo de un sustrato fluorogénico de este tipo adecuado para la medida de la actividad de KLK1 es D-val-leu-arg-7-amido-4-trifluorometilcumarina (D-VLR-AFC, FW 597,6) (Sigma, Cat n.º V2888 o Ana Spec Inc Cat n.º 24137). Cuando se hidroliza la D-VLR-AFC, se puede cuantificar la AFC producida en la reacción por detección fluorométrica (excitación 400 nm, emisión 505 nm) o por detección espectrofotométrica a 380 nm (coeficiente de extinción = 12.600 a pH 7,2). También se pueden usar otros procedimientos y sustratos para medir la actividad proteolítica de la glicoforma de KLK1.

Se puede determinar la actividad de KLK1, medida en unidades o unidades/ml, comparando la actividad relativa de una muestra de KLK1 con el patrón de cininogenasa porcina adquirido del National Institute for Biological Standards and Control (producto NIBSC n.º 78/543). Para este patrón, la potencia asignada es de 22,5 unidades internacionales (UI) por 20 µg de ampolla de cininogenasa pancreática porcina. Típicamente, se realizan diluciones en serie del patrón, y se compara la actividad en una muestra desconocida de KLK1 con el patrón. Para los experimentos descritos en el presente documento, las glicoformas o mezclas de rhKLK1 tenían actividades específicas de aproximadamente 200 a 450 UI/mg, aunque las actividades específicas de determinados lotes pueden estar fuera de este intervalo. Sin embargo, la actividad específica de rhKLK1 puede variar de lote a lote, y, por tanto, sería necesario que se comprobara para determinar la dosificación en mg/kg o mg totales de rhKLK1 para administrar a un animal o paciente.

También se pueden usar ensayos basados en animales para determinar la actividad de glicoformas de hKLK1, incluyendo estimular la captación de glucosa de la circulación en un animal. Por ejemplo, la glicoforma de KLK1 se puede administrar a un animal que sea sensible a la KLK1, tal como rata Sprague-Dawley, y la captación de glucosa por los tejidos se puede determinar por un pinzamiento hiperinsulinémico-normoglucémico. Los resultados de dichos ensayos basados en animales pueden ser difíciles de cuantificar. Como tales, se pueden usar los resultados de pruebas con animales de manera cuantitativa tal como comparando glicoformas para determinar si determinadas glicoformas o mezclas tienen más o menos actividad en comparación con otras glicoformas/mezclas.

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de mezcla de formas glicosilada glicosiladas glicosiladas de KLK1 descritas en el presente documento, y un diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden formular con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, para optimizar la estabilidad y lograr isotonicidad. En determinados aspectos, el pH de la formulación puede ser cercano al pH fisiológico o de

- aproximadamente pH 7,4, incluyendo aproximadamente pH 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,5, o cualquier intervalo de los mismos. En algunos modos de realización, una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) comprende un polipéptido de KLK1 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichos vehículos incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o mamífero que está expuesto a los mismos en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Los procedimientos de formulación son bien conocidos y se divulgan, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., edición 21 (2005).
- 5 La expresión “fisiológicamente aceptable” o “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa alérgica o similar significativa cuando se administran a un ser humano. Típicamente, dichas composiciones se preparan como inyectables, como soluciones o bien suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para su solución en, o su suspensión en, líquido antes de la inyección. Las preparaciones también se pueden emulsionar.
- 10 Como se usa en el presente documento, “vehículo” incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, excipientes, recubrimientos, diluyentes, agentes de retardo de absorción e isotónicos, tampones, soluciones de vehículo, suspensiones, coloides, y similares. Excepto en la medida en que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas.
- 15 Las composiciones de KLK1 descritas en el presente documento se pueden formular para administrarse por una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, administración subcutánea, intravenosa, oral, rectal, transmucosa, transdérmica, intestinal, parenteral, intramuscular, intramedular, intratecal, intraventricular directa, intraperitoneal, intranasal e intraocular, entre otras.
- 20 Algunos modos de realización incluyen la administración por inyección subcutánea. Se puede administrar una inyección subcutánea (abreviada como s.c., sbc, sub-Q, sub-cu o subcut, siendo s.c. la abreviatura preferente) como una inyección intravenosa rápida en la hipodermis, la capa de la piel directamente por debajo de la dermis y la epidermis, conjuntamente denominadas cutis. Los sitios ejemplares en el cuerpo en los que las personas se pueden inyectar s.c. más fácilmente incluyen, sin limitación, el área externa del brazo, justo por encima y por debajo de la cintura, exceptuando en determinados aspectos el área justo alrededor del ombligo (un círculo de ~ 5 cm (~ 2 pulgadas)), el área superior de las nalgas, justo detrás del hueso ilíaco, y la parte frontal del muslo, a la mitad del lado externo, aproximadamente 10 cm (4 pulgadas) por debajo de la parte superior del muslo a aproximadamente 10 cm (4 pulgadas) por encima de la rodilla. Estas áreas pueden variar con el tamaño de la persona. Además, cambiar el sitio de inyección puede evitar que se formen bultos o pequeñas marcas denominadas lipodistrofias en la piel.
- 25 Las inyecciones subcutáneas normalmente entran en el tejido adiposo por debajo de la piel y en determinados casos se puede utilizar una aguja más corta y más pequeña. En ejemplos específicos, una aguja que sea de aproximadamente 1,27 cm (½ pulgada) a aproximadamente 0,63 cm (5/8 pulgada) de longitud con un calibre de aproximadamente 25 a aproximadamente 31 es suficiente para administrar por vía subcutánea el medicamento. Como se apreciará por un experto en la técnica, estas son recomendaciones generales y las inyecciones s.c. se pueden administrar con agujas de otros tamaños. En algunos modos de realización, la administración s.c. se realiza apretando el tejido para evitar la inyección en el músculo, y/o la inserción de la aguja en un ángulo de ~ 45° en la piel.
- 30 La inyección intramuscular es la inyección dentro de la sustancia de un músculo, normalmente el músculo del brazo, muslo o nalgas. Las inyecciones intramusculares se administran cuando la sustancia se va a absorber rápidamente. Se deben administrar con sumo cuidado, en especial en las nalgas, ya que el nervio ciático se puede dañar o se puede entrar en un vaso sanguíneo grande si la inyección no se realiza correctamente en el cuadrante superior externo de la nalga. También se usa el músculo deltoides en el hombro, pero menos comúnmente que el músculo glúteo de las nalgas; se debe tener cuidado al insertar la aguja en el centro, 2 cm por debajo del acromion. Las inyecciones en la cara anterolateral del muslo se consideran las más seguras debido a que existe menos riesgo de daño en un nervio o vaso sanguíneo principal. La aguja debe ser lo suficientemente larga para garantizar que el medicamento se inyecte hondo en el tejido muscular. Como norma general, no se administra más de 5 ml en una inyección intramuscular para un adulto. La aguja se inserta en un ángulo de 90 grados en la piel.
- 35 Las inyecciones intraperitoneales no se realizan comúnmente en pacientes humanos debido a las molestias, y se administran para obtener concentraciones sanguíneas sistémicas del agente; más rápido que una inyección subcutánea o intramuscular y se usan cuando las venas no son accesibles. La aguja se introduce en el flanco superior y el émbolo de la jeringuilla se extrae para garantizar que no se ha penetrado el intestino. La solución inyectada debe fluir libremente.
- 40 Las inyecciones intravítreas (intraoculares) son inyecciones en el ojo y un volumen pequeño de inyección es esencial para estos tipos de inyecciones para evitar la hipertensión en el ojo. El sitio de inyección normalmente es inferotemporal para facilitar el acceso. Algunos retinólogos realizarán la inyección en el cuadrante superotemporal,

ya que consideran si se produce una complicación tal como una forma de desprendimiento de retina, se puede tratar más fácilmente con una retinopexia neumática.

La inyección intracerebral es una inyección en el cerebelo o cerebro. Dichas inyecciones requerirán un volumen de inyección pequeño para evitar la hipertensión localizada que puede dar como resultado un daño en el tejido neuronal.

La inyección intrarraquídea (intratecal) es la inyección de una sustancia a través de la duramadre de la médula espinal en el espacio subaracnoideo.

La dosificación de mezclas de glicoformas de rhKLK1 dependerá de diversos factores, incluyendo la enfermedad que se va a tratar, otros medicamentos que el paciente esté tomando, etc. La dosificación de KLK1 también depende de la actividad específica de la proteína KLK1. Las dosificaciones de KLK1 se administran en base al número de unidades, que se convierten en mg de proteína. La KLK1 es una serina proteasa que escinde el cininógeno de bajo peso molecular dando como resultado la liberación de calidina (lis-bradicinina). Esta actividad de KLK1 se puede medir en un ensayo de actividad enzimática descrito anteriormente, o también se pueden usar otros procedimientos y sustratos para medir la actividad proteolítica de KLK1.

De acuerdo con la FDA Guidance for Industry; Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trial for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers (July 2005), Appendix D: Converting animal doses to human equivalent doses. Una dosis equivalente humana es 1/7 la dosis para rata y una dosis equivalente humana es 1/12 una dosis para ratón.

Como ejemplo no limitante, en algunos aspectos, una mezcla de glicoformas de KLK1 se administra por vía subcutánea a una dosis de al menos aproximadamente 200 µg/kg (0,20 mg/kg), o en el intervalo de aproximadamente 20 µg/kg a aproximadamente 5000 µg/kg (de 0,02 a 5,0 mg/kg). Como ejemplo ilustrativo, si se administra rhKLK1 a una dosis de aproximadamente 200 µg/kg en un paciente de 90 kg, entonces se requeriría un total de aproximadamente 18,0 mg de KLK1. Si la KLK1 se formula a 5 mg/ml, entonces se inyectaría un total de aproximadamente 3,6 ml, que es un volumen grande y podría provocar molestias si se inyecta por vía subcutánea. Sin embargo, si la KLK1 se formula a 25 mg/ml, el volumen de inyección total es de 0,72 ml, que está dentro del volumen de inyección recomendado para administración subcutánea de 1,0 a 1,5 ml.

De forma alternativa, para administrar una dosis de 500 µg/kg a una persona de 90 kg equivale a aproximadamente 45 mg de KLK1. Si la KLK1 se formula a 25 mg/ml, el volumen de inyección es de aproximadamente 1,8 ml, lo que está por encima del volumen recomendado para inyección subcutánea. Si la KLK1 se formula a 50 mg/ml, el volumen de inyección es de aproximadamente 0,9 ml o está dentro del límite tolerable para inyección subcutánea en un ser humano.

Una composición de la presente invención puede incluir una o más modalidades terapéuticas adicionales. En algunos aspectos, la administración de una composición de la presente divulgación puede permitir la eficacia de una dosificación menor de otras modalidades terapéuticas en comparación con la administración de las otras modalidades terapéuticas solas, proporcionando un remedio para la toxicidad observada con la administración de dosis mayores de las otras modalidades. Se pueden administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales antes, después y/o coincidentes con la administración de agentes de la presente divulgación. Los agentes de la presente divulgación y agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar por separado o como parte de una mezcla de medicamentos. Como se usa en el presente documento, un agente terapéutico adicional puede incluir, por ejemplo, un agente con un uso para el tratamiento de diabetes que es conocido por el experto en la técnica.

Una composición de KLK1 como se describe en el presente documento también se puede administrar en combinación con otros fármacos. Una composición de KLK1 descrita en el presente documento se puede usar para tratar a un paciente con diabetes tal como diabetes de tipo 1 o diabetes de tipo 2 y al sujeto se le puede administrar una composición de KLK y un antidiabético conocido, conocido en la técnica porque es útil en el tratamiento o prevención de resistencia a la insulina y diabetes. Los ejemplos de antidiabéticos, incluyen, por ejemplo, un antioxidante (tal como vitamina E, vitamina C, una isoflavona, cinc, selenio, Ebselen, o un carotenoide); una insulina o análogo de insulina (tal como insulina corriente, insulina lenta, insulina semilenta, insulina ultralenta, detemir, glargina, degludec, NPH o Humalog); un antagonista del receptor α -adrenérgico (tal como prazosina, doxazocina, fenoxibenzamina, terazosina, fentolamina, rauwolscina, yohimbina, tolazolina, tamsulosina, o terazosina); un antagonista del receptor β -adrenérgico (tal como acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, carteolol, esmolol, metoprolol, nadolol, penbutolol, pindolol, propanolol, timolol, dobutamina clorhidrato, alprenolol, bunolol, bupranolol, carazolol, epanolol, moloprolol, oxprenolol, pamatolol, talinolol, tiprenolol, tolamolol, o toliprolol); un antagonista del receptor adrenérgico no selectivo (tal como carvedilol o labetalol); una sulfonilurea de primera generación (tal como tolazamida, tolbutamida, clorpropamida, acetohexamida); una sulfonilurea de segunda generación (tal como gliburida, glipizida, y glimepirida); un agente biguanida (tal como metformina); un derivado de ácido benzoico (tal como replaglinida); un inhibidor de la α -glucosidasa (tal como acarbosa y miglitol); una tiazolidinediona (tal como rosiglitazona, pioglitazona, o troglitazona); un inhibidor de la fosfodiesterasa (tal como anagrelida, tadalafil, dipiridamol, difilina, vardenafil, cilostazol, milrinona, teofilina, o cafeína); un antagonista de la colinesterasa (tal como donepezilo, tacrina, edrofonio, demecario, piridostigmina, zanapezil, fosfolina, metrifonato, neostigmina, o

galatamina); un compuesto de incremento de glutatión (tal como N-acetilcisteína, un éster de cisteína, L-2-oxotiazolidin-4-carboxolato (OTC), gamma glutamylcisteína y su éster etílico, éster etílico de glutatión, éster propílico de glutatión, ácido lipoico, cisteína, metionina, o S-adenosilmetionina); o incretina o miméticos de incretina (tales como GLP-1, GLP-2, análogos peptídicos de tipo glucagón, tales como DAC:GLP-1(CJC-1131), liraglutida, ZP10, BIM51077, LY315902, LY307161 (SR), y exenatida). En algunos modos de realización, las composiciones de hKLLK1 se administran a un sujeto con insulina o un mimético de incretina.

Se divulgan procedimientos de tratamiento de un sujeto que necesita el mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización, el sujeto tiene diabetes de tipo 1 (DT1) o diabetes de tipo 2 (DT2) confirmada. En algunos modos de realización, el sujeto está en la fase de luna de miel, con el inicio reciente o diagnóstico de diabetes de tipo 1 DT1. La luna de miel, o fase de remisión, se refiere al periodo que sigue al diagnóstico inicial cuando las restantes células beta que producen insulina funcionan bien. Durante esta luna de miel, es más fácil controlar la glucemia, con menores oscilaciones, menos riesgo de hipoglucemia, y un menor promedio total de glucemia. El periodo de luna de miel en los pacientes con diabetes de tipo 1 se caracteriza por la función de las células B conservada. En algunos modos de realización, el sujeto en la fase de luna de miel o inicio reciente de DT1 tiene aproximadamente un 10-20 % de sus células beta pancreáticas con relación a un control sano y produce insulina. En algunos casos, el sujeto no tiene diabetes de tipo 1 (DT1) pero está en riesgo de desarrollar DT1. En algunos modos de realización, el sujeto tiene diabetes autoinmunitaria latente de adultos (LADA). La diabetes de tipo 2 (DT2) como se usa en el presente documento es una enfermedad caracterizada por concentraciones de glucemia por encima de las normales. La DT2 puede estar provocada por una producción insuficiente de insulina en el sujeto o el sujeto es resistente a la acción de la insulina (resistente a la insulina). La administración de las composiciones descritas en el presente documento a un sujeto con DT2 puede ayudar a moderar la glucemia.

En algunos modos de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de KLLK1 incluye una cantidad que disminuye la glucosa en ayuno, incrementa la tolerancia a la glucosa, u otro indicador en un sujeto con diabetes. En algunos modos de realización, una dosis terapéuticamente eficaz es la cantidad de composición de glicoforma de KLLK1 que trata o retrasa el inicio de la diabetes de tipo I sin efectos secundarios adversos sobre la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca.

En algunos modos de realización, el sujeto tiene una afección isquémica. Los ejemplos no limitantes incluyen isquemia cardíaca (isquemia miocárdica), colitis isquémica, isquemia cerebral (apoplejía isquémica), isquemia de extremidades e isquemia cutánea. Estas afecciones y afecciones médicas relacionadas se pueden diagnosticar de acuerdo con técnicas rutinarias en la técnica.

Las composiciones de la presente divulgación se pueden administrar por cualquier medio adecuado incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, oral, rectal, nasal, tópico (incluyendo, por ejemplo, transdérmico, aerosol, oral y sublingual), vaginal, parenteral (incluyendo, por ejemplo, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intradérmico, intravascular, intraperitoneal, intravítreo, intraocular, o intracerebral, intrarraquídeo). Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para administración humana, las preparaciones deben cumplir las normas exigidas de esterilidad, pirogenicidad, y seguridad general y pureza como se requiere por la FDA. Dicha preparación puede estar libre de pirógenos.

Dispositivos. La presente invención también incluye dispositivos que contienen una composición descrita en el presente documento, incluyendo dispositivos adecuados para administración subcutánea. En algunos modos de realización, el dispositivo es una jeringuilla. En algunos modos de realización, la jeringuilla está unida a un montaje con aguja hipodérmica, que comprende opcionalmente un recubrimiento protector alrededor del montaje con aguja. En algunos modos de realización, la aguja puede ser de aproximadamente 1,27 cm (½ pulgada) a aproximadamente 0,63 cm (5/8 pulgada) de longitud y tiene un calibre de aproximadamente 25 a aproximadamente 31. Determinados modos de realización incluyen, por tanto, dispositivos que se unen o que se pueden unir a un montaje con aguja que es adecuado para administración subcutánea, que comprenden una composición a base de mezcla de glicoformas de KLLK1 descrita en el presente documento. Por ejemplo, determinados dispositivos incluyen un vial o jeringuilla, opcionalmente en los que el vial o jeringuilla se puede unir a o se une a un montaje con aguja hipodérmica. También se incluyen viales que tienen una tapa de caucho, en los que se puede insertar una aguja/jeringuilla en el vial por medio de la tapa de caucho para extraer la composición a base de KLLK1 para administración subcutánea.

En aspectos particulares, el dispositivo es una jeringuilla que se puede unir o que se une a una aguja hipodérmica, y se envasa con uno o más recubrimientos protectores extraíbles y/o permanentes alrededor de la aguja o montaje con aguja. Por ejemplo, un primer recubrimiento protector extraíble (que se retira durante la administración) puede proteger a un usuario u otra persona de la aguja antes de la administración, y se puede colocar un segundo recubrimiento protector (es decir, encajar) para una eliminación segura del dispositivo después de la administración.

En determinados aspectos, un dispositivo, opcionalmente un dispositivo desechable, comprende una dosis individual de una KLLK1 de al menos aproximadamente 25 mg, o en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 500 mg. En algunos modos de realización, el dispositivo comprende una dosis de al menos aproximadamente 0,02 a

aproximadamente 5,0 mg/kg, al menos aproximadamente 0,02 a aproximadamente 10 mg/kg. En algunos modos de realización, el dispositivo comprende una dosis de al menos aproximadamente 0,02, aproximadamente 0,03, aproximadamente 0,04, aproximadamente 0,05, aproximadamente 0,06, aproximadamente 0,07, aproximadamente 0,08, aproximadamente 0,09, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,3, aproximadamente 1,4, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 2,0, aproximadamente 2,1, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,3, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,7, aproximadamente 2,8, aproximadamente 2,9, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, o aproximadamente 5,0 mg/kg.

En determinados aspectos, la composición de KLK1 se puede envasar para permitir la administración por el paciente o al paciente en un ámbito doméstico cada día, varias veces a la semana, cada semana, o con menos frecuencia. Una composición de KLK1 se puede formular en un vial multidosis o una jeringuilla multidosis/multiusos, similar a las formulaciones de insulina u hormona del crecimiento humano. En un vial multidosis, una cantidad suficiente para al menos 2 administraciones puede estar en un vial (por ejemplo, 50 mg, o en el intervalo de aproximadamente 5 a 1000 mg), y se usan una aguja y una jeringuilla para extraer la cantidad requerida de KLK1 del vial e inyectarla en un paciente. Una jeringuilla multidosis o multiusos contiene una cantidad de KLK1 suficiente para al menos 2 administraciones (por ejemplo, 50 mg, o en el intervalo de aproximadamente 5 a 1000 mg), y el volumen que se puede inyectar se puede determinar por el paciente. La jeringuilla multidosis también puede tener un cartucho reemplazable que se puede cargar en la jeringuilla que contiene cantidades adicionales de la composición de KLK1.

Para determinar si una dosis de una mezcla de glicoformas de KLK1 de una proporción definida es eficaz en el tratamiento de un paciente, en términos de la cantidad (número de unidades administradas a un paciente) de glicoforma de KLK1 administrada o bien de la frecuencia de administración, se pueden medir varios marcadores. Los siguientes marcadores se describen como ejemplos en el tratamiento de pacientes con DT1, y no pretenden ser una lista exhaustiva. Una dosis eficaz de glicoforma de KLK1 puede incrementar la cifra de linfocitos T reguladores en el bazo, específicamente linfocitos CD4+/CD25+/FoxP3+ en el bazo del sujeto con DT1. Otro criterio de valoración para determinar la dosis eficaz en una mejora en el pinzamiento hiperinsulinémico-normoglucémico, como se observa y se describe en el presente documento a continuación. Otro criterio de valoración para determinar la dosis eficaz es una disminución en la insulinitis, que se mide por biopsias pancreáticas, u otros procedimientos no invasivos en seres humanos. Como puede ser evidente, en el tratamiento de enfermedades distintas de DT1, se pueden medir otros marcadores para determinar si una dosis de glicoforma de KLK1 o mezcla de la misma es eficaz en el tratamiento de la enfermedad.

Para el tratamiento de sujetos con DT2, la composición de mezcla de glicoformas de KLK1 se administra al sujeto, se miden parámetros tales como una disminución en la disminución de la glucohemoglobina (HbA1c) en la glucemia en ayuno. También se pueden medir otros parámetros para determinar si la dosis de las mezclas de glicoformas de rhKLK1 es eficaz en el tratamiento de DT2.

En base a los resultados de los marcadores que se miden, la cantidad de dosificación de glicoforma de KLK1 o mezclas se puede incrementar o disminuir, simplemente a modo de ejemplo, en aproximadamente 1,1x, 1,2x, 1,3x, 1,4x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, 2,5x, 3x, 3,5x, 4x, 4,5x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x, 20x o más, con relación a la dosificación previa. La frecuencia de dosificación se puede incrementar o disminuir, simplemente a modo de ilustración, en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o más dosificaciones por día, y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosificaciones por semana, con relación a la pauta de dosificación previa. Como se incide anteriormente, la cantidad de dosificación se puede incrementar o disminuir por separado o en combinación con la frecuencia de dosificación, y viceversa, opcionalmente hasta que se logre un nivel o intervalo deseado de uno o más biomarcadores u otros indicadores del tratamiento.

Una composición de la presente invención puede estar libre de endotoxinas o sustancialmente libre de endotoxinas. Como se usa en el presente documento, el término "libre de endotoxinas" o "sustancialmente libre de endotoxinas" se refiere, en general, a composiciones, disolventes, dispositivos y/o recipientes que contienen como mucho cantidades mínimas (por ejemplo, cantidades que no tienen efectos fisiológicos adversos en un sujeto) de endotoxina, y preferentemente cantidades indetectables de endotoxina. Las endotoxinas son toxinas asociadas con determinadas bacterias, típicamente bacterias gramnegativas, aunque las endotoxinas se pueden encontrar en bacterias grampositivas, tales como *Listeria monocytogenes*. Las endotoxinas más predominantes son los lipopolisacáridos (LPS) o lipooligosacáridos (LOS) hallados en la membrana externa de varias bacterias gramnegativas, y que representan un rasgo patógeno fundamental en la capacidad de estas bacterias para provocar enfermedad. Cantidades pequeñas de endotoxina en seres humanos pueden producir fiebre, una disminución de la presión sanguínea, y la activación de inflamación y coagulación, entre otros efectos fisiológicos adversos.

Por lo tanto, en la producción farmacéutica, a menudo es deseable retirar la mayoría de o todas las trazas de endotoxina de los productos farmacéuticos y/o recipientes de fármacos, debido a que pequeñas cantidades pueden provocar efectos adversos en los seres humanos. Se puede usar un horno despirogenación para este propósito, ya que típicamente se requieren temperaturas en exceso de 300 °C para destruir la mayoría de las endotoxinas. Por ejemplo, en base al material de envasado principal tal como jeringuillas o viales, la combinación de una temperatura vítrea de 250 °C y un tiempo de retención de 30 minutos a menudo es suficiente para lograr una reducción de 3 en escala logarítmica en el nivel de endotoxinas. Se contemplan otros procedimientos de retirada de endotoxinas, incluyendo, por ejemplo, procedimientos de cromatografía y filtración, como se describe en el presente documento y como es conocido en la técnica. También se incluyen procedimientos de producción de polipéptidos de KLK1 en y su aislamiento de células eucariotas tales como células de mamífero para reducir, por no decir eliminar, el riesgo de que las endotoxinas estén presentes en una composición de la invención. Son preferentes los procedimientos de producción de polipéptidos de KLK1 en y su aislamiento de células recombinantes que crecen en medio sin suero químicamente definido.

Las endotoxinas se pueden detectar usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica. Por ejemplo, en ensayo de lisados de amebocitos de *Limulus*, que utiliza sangre de cangrejo herradura, es un ensayo muy sensible para detectar la presencia de endotoxina. En esta prueba, niveles muy bajos de LPS pueden provocar una coagulación detectable del lisado de *Limulus* debido a una poderosa cascada enzimática que amplifica esta reacción. Las endotoxinas también se pueden cuantificar por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Para estar sustancialmente libre de endotoxinas, los niveles de endotoxina pueden ser de menos de aproximadamente 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08, 0,09, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 UE/ml, o UE/mg de proteína. Típicamente, 1 ng de lipopolisacárido (LPS) corresponde a aproximadamente 1-10 UE.

Los términos “modular” y “alterar” incluyen “incrementar”, “potenciar” o “estimular”, así como “disminuir” o “reducir”, típicamente en un grado o cantidad estadísticamente significativa o fisiológicamente significativa con relación a un control. Una cantidad “incrementada”, “estimulada” o “potenciada” es típicamente una cantidad “estadísticamente significativa”, y puede incluir un incremento que es de 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo toda la composición de control, muestra o sujeto de prueba. Números enteros “disminuidos” o “reducidos” y decimales intermedios y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad o nivel producido por una cantidad es típicamente una cantidad “estadísticamente significativa”, y puede incluir una disminución de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % en la cantidad o nivel producido por una composición de control, muestra o sujeto de prueba.

Como ejemplo no limitante, la comparación puede ser entre la cantidad o nivel de un parámetro farmacocinético o respuesta biológica/terapéutica producida por la administración de una mezcla de isoformas triple:doblemente glicosilada glicosiladas glicosiladas (o glicofomas) de KLK1 (por ejemplo, aproximadamente 55:45, aproximadamente 50:50, o aproximadamente 45:55) con relación a la administración de una mezcla diferente de dichas glicofomas (por ejemplo, aproximadamente 60:40, aproximadamente 40:60, ~90:10, ~10:90, ~95:5, o ~5:95). Como otro ejemplo no limitante, la comparación puede ser entre la cantidad o nivel de un parámetro farmacocinético o respuesta biológica/terapéutica producida por la administración de una composición sustancialmente pura de una isoforma triplemente glicosilada (o glicofoma) de rhKLK1 (por ejemplo, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % triplemente glicosilada) con relación a la administración de una glucoforma diferente (por ejemplo, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % doblemente glicosilada) o una mezcla de glicofomas (por ejemplo, aproximadamente 60:40 o aproximadamente, 40:60).

Otros ejemplos de comparaciones y cantidades “estadísticamente significativas” se describen en el presente documento. Un resultado se denomina típicamente “estadísticamente significativo” si es improbable que se haya producido por casualidad. El nivel de significación de una prueba o resultado se refiere tradicionalmente a la cantidad de pruebas requeridas para aceptar que un acontecimiento es improbable que haya surgido por casualidad. En determinados casos, la significación estadística se puede definir como la probabilidad de tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es realmente verdadera (una decisión conocida como error de tipo I, o “determinación de positivo falso”). Esta decisión se toma a menudo usando el valor p: si el valor p es menor que el nivel de significación, entonces la hipótesis nula se rechaza. Cuanto más pequeño sea el valor p, más significativo será el resultado. También se pueden utilizar los factores de Bayes para determinar la significación estadística (véase Goodman, *Ann Intern Med.* 130:1005-13, 1999).

El término “solubilidad” se refiere a la propiedad de un polipéptido rhKLK1 proporcionado en el presente documento para disolverse en un disolvente líquido y formar una solución homogénea. La solubilidad se expresa típicamente como una concentración, por masa de soluto por unidad de volumen de disolvente (g de soluto por kg de disolvente, g por dl (100 ml), mg/ml, etc.), molaridad, molalidad, fracción molar u otras descripciones similares de concentración. La cantidad máxima de equilibrio de soluto que se puede disolver por cantidad de disolvente es la solubilidad de ese soluto en ese disolvente en las condiciones especificadas, incluyendo temperatura, presión, pH y la naturaleza del disolvente. En determinados modos de realización, la solubilidad se mide a pH fisiológico, u otro pH, por ejemplo, a pH 6,0, pH 7,0, pH 7,4, pH 8,0 o pH 9,0. En determinados modos de realización, la solubilidad se mide en agua o un tampón fisiológico tal como PBS o NaCl (con o sin NaP). En modos de realización específicos, la solubilidad se mide a un pH relativamente menor (por ejemplo, pH 6,0) y concentración salina relativamente mayor (por ejemplo, NaCl

500 mM y NaP 10 mM). En determinados modos de realización, la solubilidad se mide en un líquido biológico (disolvente) tal como sangre o suero. En determinados modos de realización, la temperatura puede ser aproximadamente la temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, o aproximadamente 25 °C) o aproximadamente la temperatura corporal (37 °C). En determinados modos de realización, un polipéptido de KLK1 tiene una solubilidad de al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 11, al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 13, al menos aproximadamente 14, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 16, al menos aproximadamente 17, al menos aproximadamente 18, al menos aproximadamente 19, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, o al menos aproximadamente 60 mg/ml a temperatura ambiente o a 37 °C.

“Sustancialmente” o “esencialmente” quiere decir casi totalmente o completamente, por ejemplo, un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de alguna cantidad dada.

“Tratamiento” o “tratar”, como se usa en el presente documento, incluye cualquier efecto deseable sobre los síntomas o patología de una enfermedad o afección, y puede incluir incluso cambios o mejoras mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que se está tratando. “Tratamiento” o “tratar” no indica necesariamente una erradicación o cura completa de la enfermedad o afección, o síntomas asociados de la misma. El sujeto que recibe este tratamiento es cualquier sujeto que necesita el mismo. Los marcadores ejemplares de mejora clínica serán evidentes para los expertos en la técnica.

Un “sujeto”, como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal que presente un síntoma, o que esté en riesgo de presentar un síntoma, que se puede tratar con un polipéptido de KLK1 o composición de la presente invención. Los sujetos adecuados (pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o perro). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, pacientes humanos.

Por “aislado” se quiere decir un material que esté sustancial o esencialmente libre de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural. Por ejemplo, un “péptido aislado” o un “polipéptido aislado” y similares, como se usa en el presente documento, incluye el aislamiento y/o purificación *in vitro* de una molécula peptídica o polipeptídica de su entorno celular natural, y de la asociación con otros componentes de la célula; es decir, no está significativamente asociado con sustancias *in vivo* tales como proteínas o ácidos nucleicos de la célula huésped.

La presente invención se ilustra por los siguientes ejemplos. Se debe entender que los ejemplos, materiales, cantidades, y procedimientos particulares son para interpretarse ampliamente de acuerdo con el alcance de la invención como se expone en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se adquirió un ADNc que codificaba la pre-pro-KLK1 humana, la secuencia de 262 residuos aminoácidos representada en SEQ ID NO:2, de OriGene™ (Rockville, MD, USA). El ADNc KLK1 (catálogo n.º SCI22623) es un clon con marco de lectura abierto de ADNc humano, clonado en el sitio de multiclonación del vector pCMV6-XL5 de OriGene, entre un promotor de citomegalovirus (CMV) para controlar la transcripción del ADNc que codifica la pre-pro-KLK1 humana y una señal de poliadenilación. Este clon de KLK1 se secuenció y, usando el programa informático de traducción, tradujo para revelar la SEQ ID NO:2. Esta secuencia difirió en 2 residuos aminoácidos de la secuencia de KLK1 humana en GenBank como Ref n.º NP_002248,1 (SEQ ID NO:1). Como se representa en SEQ ID NO:2, los polimorfismos mononucleotídicos (SNP) dieron como resultado un cambio de E a Q en el residuo aminoácido 145 de 262, y un cambio de A a V en la posición de aminoácido 188 de 262. Todos los experimentos posteriores se realizaron teniendo KLK1 la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO:2.

El ADNc de KLK1 humana en el pCMV6-XL5 se transfectó en una línea celular de CHO usando el sistema de expresión de CHO MAX FreeStyle™ (Invitrogen, Carlsbad, CA catálogo n.º K9000 20). El kit permitió la transfección transitoria de vectores en células de ovario de hámster chino (CHO), el crecimiento de las células CHO transfectadas en un cultivo de 10 litros, y la expresión de proteínas en medio sin suero definido. Las células CHO se hacen crecer en suspensión y la transfección transitoria del vector de KLK1 se realizó con el reactivo liposomal suministrado en el kit según las instrucciones.

La expresión y la purificación de KLK1 humana recombinante se realizaron esencialmente como se describe por Hsieng S. Lu, *et al*, (Purification and Characterization of Human Tissue Prokallikrein and Kallikrein Isoforms Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells, *Protein Expression and Purification* (1996), 8, 227-237). En resumen, después de la transfección y permitiendo tiempo suficiente para la expresión de KLK1 humana recombinante, el

sobrenadante de cultivo del cultivo de 10 litros de células CHO se recogió por centrifugación seguido de filtración de 0,2 micrómetros. El sobrenadante clarificado se concentró a continuación, se hizo reaccionar con tripsina para activar la KLK1 humana recombinante. Puesto que la transfección transitoria se realizó con el ADNc que codificaba la pre-pro-KLK1 humana, la KLK1 humana recombinante secretada de las células CHO estaba en la forma de proproteína inactiva. Por lo tanto, el ensayo de actividad de la KLK1 del sobrenadante de cultivo celular implica una etapa de activación con digestión con tripsina. La activación se realiza con tripsina en una concentración final 10 nM durante 2 horas a temperatura ambiente, y la tripsina se inactiva con inhibidor de soja de tripsina.

Después de la activación de la KLK1 humana recombinante, el sulfato de amonio se añadió al sobrenadante, y se cargó sobre una columna de Octyl Sepharose®. La mezcla de elución de la columna de Octyl de la KLK1 activa se purificó adicionalmente por cromatografía de afinidad con benzamidina. Las fracciones activas mezcladas de la columna de benzamidina se intercambiaron de tampón a un tampón de equilibrado con DEAE y se limpiaron por columna DEAE. Las fracciones de KLK1 activa de DEAE se mezclaron y se intercambió de tampón a tampón 1 X PBS. El principio activo de KLK1 final se alícuotó y se almacenó a -20 °C.

Ejemplo 2

La KLK1 humana recombinante purificada contenía un contenido de carbohidratos de aproximadamente un 30 % en base al peso molecular estimado por electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS) (véase la figura 1). La KLK1 de las células CHO aparece como una banda que tiene un peso molecular aparente de ~40 a 49 kDa; una banda ancha de este tipo puede resultar de diferentes isoformas glicosiladas glicosiladas glicosiladas de KLK1 secretada por células CHO. Para la KLK1 expresada en células 293, aparecieron dos bandas en el gel de SDS-PAGE a aproximadamente 40 kDa y 45 kDa. La identidad de las bandas como KLK1 humana se confirmó por análisis de inmunoelectrotransferencia usando anticuerpo policlonal de ratón obtenido frente a una proteína KLK1 humana de longitud completa (catálogo n.º: H00003816- B01P, anticuerpo policlonal murino MaxPab purificado de KLK1 (B01P), Abnova Corporation, Walnut, CA, USA) (véase la figura 2). La inmunoelectrotransferencia confirma los resultados del gel de SDS-PAGE, en los que la KLK1 humana recombinante de células CHO aparece como una banda que tiene un peso molecular aparente de ~40 a 49 kDa, y la KLK1 expresada en células 293 se resuelve como dos bandas a aproximadamente 40 kDa y 45 kDa.

La pureza de KLK1 de CHO se estimó visualmente a partir del gel de SDS-PAGE que era >90 % con una concentración final de 1,19 mg de proteína KLK1/ml. A partir del gel de SDS-PAGE, parece que la KLK1 producida en CHO también contiene impurezas de mayor peso molecular (~70-95 kDa) que no son visibles en la preparación de 293.

Se usó un ensayo de actividad enzimática para someter a prueba la actividad de KLK1 humana recombinante en sobrenadantes de cultivo celular, fracciones de cromatografía durante la purificación y en el producto purificado final. Un sustrato fluorogénico adecuado para la medida de actividad de la calicreína tisular es D-val-leu-arg-7-amido-4-trifluorometilcumarina (D-VLR-AFC, FW 597,6) (Sigma, Cat n.º V2888 o Ana Spec Inc Cat n.º 24137). Cuando se hidroliza la D-VLR-AFC, se puede cuantificar la AFC producida en la reacción por detección fluorométrica (excitación 400 nm, emisión 505 nm) o por detección espectrofotométrica a 380 nm (coeficiente de extinción = 12.600 a pH 7,2).

La medida de la actividad de KLK1 humana recombinante (unidades/ml) producida en las células CHO se determinó comparando la actividad relativa de KLK1 recombinante con el patrón porcino de cininogenasa adquirido del National Institute for Biological Standards and Control (producto NIBSC n.º 78/543). Para este patrón, la potencia asignada es de 22,5 unidades internacionales (UI) por 20 µg de ampolla de cininogenasa pancreática porcina.

Ejemplo 3

Se realizaron experimentos para determinar si la columna de Octyl Sepharose puede resolver las formas de alto y bajo peso molecular de KLK1 humana recombinante, y para cuantificar la actividad relativa de las dos formas aisladas.

Aproximadamente 45 mg (20 ml) de KLK1 humana recombinante se sometieron a la columna de Octyl Sepharose como se detalla a continuación (véase la tabla 1):

Resina: resina de interacción hidrófoba Octyl Sepharose (GE).

Columna: XK16 x 16, 1,6 cm x 16 cm (diámetro x longitud), 32 ml de volumen de lecho de resina

Caudal: 3 ml/minuto de carga (~10 minuto de tiempo de contacto), 3 ml/minuto de gradiente (~90 cm/h).

Carga: 20 ml (~44,6 mg) de KLK1 humana recombinante purificada diluido hasta 150 ml con fosfato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 7,0.

Tampones: Fosfato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 7,0. Fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0.

Elución: Gradiente del 0 % al 67 % B (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0) sobre 5 VC (160 ml), seguido de

90 ml al 67 %.

Fracciones: recogidas cada 8 ml sobre la elución del gradiente.

Tabla 1. Protocolo de columna de Octyl Sepharose

Etapa	Tampón	VC	Volumen (ml)
Desinfección	Hidróxido de sodio 0,1 M (almacenamiento)	ND	ND
Equilibrado	Sulfato de amonio 1,5 M en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0	>5	175
Carga	KLK1 humana recombinante purificada en (A)		150
Tampón de lavado	Sulfato de amonio 1,5 M en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0	5	160
Elución	Gradiente del 0 % al 67 % B sobre 160 ml (53,3 minutos), mantenido al 67 % durante ~3 VC	5	160
		3	90
Tira	100 %B (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0)	~5	150
Limpieza y almacenamiento	NaOH 0,1 M	3	~100

El cromatograma en la figura 3A (aumentado en la figura 3B) y el análisis SDS-PAGE en la figura 4 ilustran que la glicofoma de KLK1 de bajo peso molecular se aisló de la glicofoma de alto peso molecular usando la columna de Octyl Sepharose. Todas las fracciones se filtraron de forma estéril y se almacenaron a 2-8 °C en espera del análisis.

- 5 Se identificaron dos fracciones para análisis adicional, la fracción B11 de la glicofoma de rhKLK1 de alto peso molecular (triplemente glicosilada) (figura 4, carril 6) y la fracción B5 de la glicofoma de rhKLK1 de bajo peso molecular (doblemente glicosilada) (figura 4, carril 8). Estas dos fracciones se analizaron por absorbancia, actividad y cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa (RP-HPLC). Las fracciones se alicuotaron a alícuotas de 1 ml, se etiquetaron y se congelaron. Los resultados de las pruebas se muestran a continuación. La
- 10 cuantificación de RP-HPLC se correlaciona muy bien con la absorbancia a A280 (usando un coeficiente de extinción de 1,76) y muestra las dos glicofomas de rhKLK1 (véase la figura 5), como se observa con los resultados de la cromatografía de Octyl. Específicamente, el análisis con RP-HPLC de KLK1 humana recombinante antes de la separación de las glicofomas aparece como dos picos (figura 5A). Después de la separación de las glicofomas, la fracción B11 (glicofoma de KLK1 de alto peso molecular) del análisis RP-HPLC aparece como una única banda
- 15 (figura 5B), y fracción B5 (glicofoma de KLK1 de bajo peso molecular) aparece como una banda puntiaguda (figura 5C), aunque es evidente alguna contaminación de la glicofoma de KLK1 de bajo peso molecular.

- Se generaron cinco líneas celulares que producen diferentes proporciones de las glicofomas de bajo y alto peso molecular de rhKLK1. La figura 5A representa una mezcla de rhKLK1 purificada con las glicofomas de KLK1 de bajo y alto peso molecular en una proporción aproximada de 55:45, respectivamente, y específicamente un 52 % y un
- 20 47,5 % para las glicofomas de KLK1 de alto y bajo peso molecular, respectivamente, y un 0,5 % como agregados, también se purificó la rhKLK1 de otra línea celular de CHO recombinante que expresaba las glicofomas de rhKLK1 aproximadamente en una proporción de 50:50 (véase la figura 6).

- Actividad específica de KLK1.* La actividad específica (unidades/mg) de las glicofomas de rhKLK1 de bajo peso molecular y de alto peso molecular, así como la mezcla 50:50 de rhKLK1 y KLK1 humana urinaria, se sometió a prueba por un ensayo de actividad enzimática. Un sustrato fluorogénico adecuado para la medida de actividad de la caliceína-1 tisular es D-val-leu-arg-7-amido-4-trifluorometilcumarina (D-VLR-AFC, FW 597,6) (Sigma, Cat n.º V2888 o Ana Spec Inc Cat n.º 24137). Cuando se hidroliza la D-VLR-AFC, se puede cuantificar la AFC producida en la
- 25 reacción por detección fluorométrica (excitación 400 nm, emisión 505 nm de acuerdo con el catálogo, pero son posibles excitación y emisiones alternativas, incluyendo excitación 360 nm, emisión 460 nm) o por detección espectrofotométrica a 380 nm (coeficiente de extinción = 12.600 a pH 7,2).
- 30

- La medida de la actividad específica (unidades/mg) para las glicofomas de KLK1 y mezclas se determinó comparando la actividad relativa de KLK1 con el patrón porcino de cininogenasa adquirido del National Institute for Biological Standards and Control (producto NIBSC n.º 78/543). Para este patrón, la potencia asignada es de 22,5 unidades internacionales (UI) por 20 µg de ampolla de cininogenasa pancreática porcina. Todas las dosificaciones
- 35 de las ratas se basaron en unidades de KLK1.

- La KLK1 humana urinaria (HU) se adquirió de Lee BioSciences (catálogo n.º: 314-15: CAS: 9001-01-8: Lote n.º: L23165). Se sabe que HU KLK1 comprende una proporción de glicofomas de 60:40 (alto con respecto a bajo peso molecular). De acuerdo con la especificación del producto del fabricante, la HU KLK1 es pura en un >99 % y tiene una actividad específica de 9,9 U/mg. Sin embargo, esta determinación de la actividad específica fue con un ensayo
- 40 diferente y en condiciones diferentes al ensayo de D-VLR-AFC descrito anteriormente. Por lo tanto, se sometió a prueba la HU en el ensayo de D-VLR-AFC junto con las glicofomas de rhKLK1 de bajo y alto peso molecular y mezcla de rhKLK1 50:50. Los resultados de los cálculos de actividad específica y las concentraciones de proteína como se determinaron por RP-HPLC o A280 nm se resumen en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Actividad específica

Fracción	A280 nm mg/ml	RP-HPLC mg/ml	Actividad específica U/mg (A280 nm)
Mezcla de rhKLK1 50:50	0,22	0,49	454
B11 (carril 6)	0,48	0,50	389
B5 (carril 8)	0,36	0,39	289
HU KLK1	1,0	ND	311

La pureza de rhKLK1 (mezcla 50:50, fracción B5 y B11) era relativamente baja en endotoxina con respecto a la proteína total (< 1 UE/mg de proteína), baja en proteína de célula huésped con respecto a la proteína total (<100 ng/mg de proteína), baja en ADN de célula huésped con respecto a la proteína total (<10 pg/mg de proteína), y apareció mayoritariamente como un monómero (>95 % como un pico único por SEC HPLC). Para la HU KLK1 la endotoxina y el grado de agregación no se cuantificaron. Sin embargo, las pruebas cualitativas sugirieron que la HU KLK1 tenía niveles de endotoxina de > 1 UE/mg de proteína, mayores que para la mezcla de rhKLK1 50:50, fracción B5 y B11, y un mayor grado de agregación (>5 %) que rhKLK1 (mezcla 50:50, fracción B5 y B11), teniendo la última niveles de agregación de <5 %.

Pinzamiento hiperinsulinémico-normoglucémico. La actividad *in vivo*, y específicamente la capacidad para estimular la captación de glucosa por los tejidos, de las dos glicoformas aisladas de rhKLK1, la mezcla 50:50 de glicoformas y HU KLK1, se determinaron por un estudio de pinzamiento hiperinsulinémico-normoglucémico. El pinzamiento hiperinsulinémico-normoglucémico es el patrón de referencia para investigar la utilización de la glucosa, incluyendo cuantificar la resistencia a la insulina debido a que mide la cantidad de glucosa necesaria para compensar un incremento en el nivel de insulina sin provocar hipoglucemia. En incremento en la tasa de infusión de glucosa detectada por el pinzamiento también puede indicar un incremento en la sensibilidad a la insulina, o incremento en la captación de glucosa por los músculos, adipocitos, u otros tejidos en el cuerpo.

Se realizó un ensayo de pinzamiento hiperinsulinémico-normoglucémico de 120 minutos sobre ratas Sprague Dawley con 6 horas de ayuno con infusión continua de insulina humana (Humulina, Lilly) a una tasa constante de 4 mU/kg/minuto. Al mismo tiempo, se infundió una solución de glucosa al 20 % a una tasa variable y se ajustó la tasa cada 10 minutos para mantener la glucemia objetivo. Tanto la insulina como la glucosa se infundieron a través de cateterización de vena yugular derecha y se realizó el seguimiento de la glucemia a partir de la cateterización de la arteria carótida izquierda.

Se usaron doce grupos de tres ratas cada uno para este procedimiento de pinzamiento. A cada grupo de cuatro ratas se le inyectó por vía subcutánea cualquier rhKLK1, fracción 11 (glicoforma de KLK1 de alto peso molecular), fracción 5 (glicoforma de KLK1 de bajo peso molecular) y KLK1 humana urinaria a 1,0 U, 0,33 U y 0,1 U/rata (véase la tabla 3 a continuación). La KLK1 humana se disolvió en PBS y las ratas se dosificaron por vía subcutánea, 30 minutos antes del procedimiento de pinzamiento. La tabla 3 resume la dosificación de ratas con las diversas formas de KLK1 humana.

Tabla 3

Grupo	Compuesto	Dosis
1. rhKLK1 mezcla 50:50	rhKLK1	1,0 U/rata
2. rhKLK1 mezcla 50:50	rhKLK1	0,33 U/rata
3. rhKLK1 mezcla 50:50	rhKLK1	0,1 U/rata
4. Glicoforma de alto PM	rhKLK1 fracción B11	1,0 U/rata
5. Glicoforma de alto PM	rhKLK1 fracción B11	0,33 U/rata
6. Glicoforma de alto PM	rhKLK1 fracción B11	0,1 U/rata
7. Glicoforma de bajo PM	rhKLK1 fracción B5	1,0 U/rata
8. Glicoforma de bajo PM	rhKLK1 fracción B5	0,33 U/rata
9. Glicoforma de bajo PM	rhKLK1 fracción B5	0,1 U/rata
10. KLK1 urinaria	huKLK1	1,0 U/rata
11. KLK1 urinaria	huKLK1	0,33 U/rata
12. KLK1 urinaria	huKLK1	0,1 U/rata

Se monitorizó la glucemia arterial antes de la dosificación a t=-120, -90, -30, -15 y 0 minutos y a continuación cada 10 minutos durante 120 minutos (t=120), usando un glucómetro (Accu Check, Roche Diagnostics). Se siguió con los pinzamientos durante 120 minutos (t=120) momento en que finalizó el experimento. Se registró el efecto de la administración de glicoforma de KLK1 sobre la tasa de infusión de glucosa requerida para mantener la misma glucemia. La figura 7 es un gráfico de la tasa de infusión de glucosa (GIR) para ratas tratadas con 1 U/rata de rhKLK1 (mezcla 50:50), HU KLK1, o glicoforma de rhKLK1 de bajo o alto peso molecular. Este gráfico es típico de los gráficos de GIR ya que la GIR se incrementa desde el tiempo cero y presenta picos a aproximadamente de 40 a 60 minutos, y a continuación hay una ligera disminución en la GIR. Se realizó otro análisis sobre la tasa de infusión

de glucosa (GIR) para calcular el área bajo la curva (ABC), una medida de glucosa total glucosa infundida (mg/kg/min·min) durante el estudio de pinzamiento.

La tasa de infusión de glucosa requerida para mantener la misma glucemia era significativamente mayor con los grupos tratados con rhKLK1 (glicoformas mezcladas 50:50) a 1 U/rata que en animales tratados con fracción 11, fracción 5 o HU KLK1. Esta diferencia es evidente cuando con los datos se calcula una ABC total para la tasa de infusión de glucosa (véase la figura 8 y la tabla 4). Para ratas tratadas con fracción B11, el ABC es de 3996 +/- 98 mg/kg/min·min (media +/- EEM) y con fracción B5, el ABC es de 3551 +/- 113 mg/kg/min·min. Se esperaba que la mezcla 50:50 de rhKLK1 tuviera un ABC intermedio entre la glicoforma de bajo y alto peso molecular. Sorprendentemente, para la mezcla 50:50, el ABC fue de 4547 +/- 69 mg/kg/min·min. Esta ABC sorprendentemente alta indica que la combinación de KLK1 de alto y bajo peso molecular tiene un efecto inesperadamente aditivo o mayor sobre la estimulación de la captación de glucosa. Para la KLK1 humana urinaria, puesto que se administró una cantidad igual de rhKLK1 y HU KLK1 a las ratas en base a la actividad *in vitro* (unidades calculadas en el ensayo de D-VLR-AFC), se esperaba que el efecto sobre GIR fuera el mismo. Sin embargo, el ABC de la GIR para KLK1 humana urinaria fue de 3444 +/- 227 mg/kg/min·min, lo que era significativamente menor que el 4547 +/- 69 mg/kg/min·min calculado para rhKLK1.

Tabla 4. Captación de glucosa

Grupo / Dosis	Compuesto	ABC de la GIR +/- EEM mg/kg/min·min
1. mezcla 50:50 1 U/rata	rhKLK1	4547 +/- 69
4. Glicoforma de alto PM 1 U/rata	rhKLK1 fracción B11	3996 +/- 98
7. Glicoforma de bajo PM 1 U/rata	rhKLK1 fracción B5	3551 +/- 113
10. KLK1 urinaria 1 U/rata	HU KLK1	3444 +/- 227

Como se muestra en la tabla 5 a continuación, la mezcla 50:50 de rhKLK1 estimuló de forma consistente el incremento en la captación de glucosa en ratas en comparación con la HU KLK1 medida por un incremento en el ABC de la GIR. A una dosis de 0,33 U, el ABC de la mezcla 50:50 para rhKLK1 fue de 4127 +/- 78 mg/kg/min·min mientras que para HU KLK1 fue de 2969 +/- 144 mg/kg/min·min, y a 0,1 U, para rhKLK1 fue de 3612 +/- 135 mg/kg/min·min mientras que para HU KLK1 fue de 2503 +/- 266 mg/kg/min·min.

Tabla 5. Captación de glucosa

Dosis	ABC de la GIR +/- EEM mg/kg/min·min	
	rhKLK1 50:50	KLK1 urinaria
1 U/rata	4547 +/- 69	3444 +/- 227
0,33 U/rata	4127 +/- 78	2964 +/- 144
0,1 U/rata	3612 +/- 135	2503 +/- 266

En estos experimentos, se administraron cantidades iguales de KLK1 a las ratas, en base a la actividad *in vitro* de KLK1 medida en el ensayo de proteasa. Se administró una única dosis de KLK1 (isoforma doblemente glicosilada, isoforma triplemente glicosilada, mezcla 50:50 o HU KLK1) por vía subcutánea 30 minutos antes del pinzamiento. Debido a que las diversas preparaciones de KLK1 se administraron por vía subcutánea, la proteína se debería absorber lentamente en la circulación con relación a la administración i.v. Además, los animales se sometieron a prueba en los 30 minutos de administración de los polipéptidos de KLK1. Como tal, cualquier diferencia en el pK o la semivida entre los polipéptidos de KLK1 en circulación se debería minimizar y cualquier efecto sobre GIR debería resultar de la actividad de la KLK1 administrada.

El tratamiento de ratas con la glicoforma de rhKLK1 de alto peso molecular dio como resultado un ligero incremento en la utilización de glucosa, como se detecta en una mayor ABC de la GIR, en comparación con la glicoforma de rhKLK1 de bajo peso molecular. Esto se puede atribuir en parte a que la glicoforma de alto peso molecular tiene una semivida mayor en circulación que la glicoforma de bajo peso molecular. La glicoforma de alto peso molecular puede que no se elimine a través de los riñones tan fácilmente. Como se analiza anteriormente, dado el breve margen de tiempo para las pruebas (30 minutos después de la administración), el efecto no puede deberse solo a la semivida de la proteína KLK1 en circulación.

De forma alternativa, la glicosilación adicional puede permitir que la glicoforma de KLK1 de mayor peso molecular se una a determinados receptores en el animal, lo que daría como resultado cambios en la utilización de glucosa. Por ejemplo, la glicoforma de alto peso molecular puede ser más eficaz que la glicoforma de bajo peso molecular al estimular un receptor directamente, o unirse a otra proteína (por ejemplo, serpina) más eficazmente y el complejo afecta a la utilización de glucosa. La glicoforma de alto peso molecular también se puede unir a un receptor más

eficazmente que la glicoforma de bajo peso molecular, y secuestrar la glicoforma de KLK1 en un microentorno en el que la actividad enzimática actúa influenciando la utilización de glucosa. La glicosilación adicional también puede permitir que la glicoforma de KLK1 de alto peso molecular sea más activa en un entorno fisiológico tal como un animal, que no se refleja en los ensayos *in vitro*.

5 Sorprendentemente, la mezcla 50:50 de glicoformas de rhKLK1 dio como resultado una mayor ABC de la GIR en comparación con la glucoforma de alto peso molecular. El resultado esperado es que las glicoformas mezcladas 50:50 tendrían una actividad (medida por el ABC de la GIR) que es intermedia a las glicoformas de bajo y alto peso molecular. Este efecto sinérgico en la mezcla 50:50 es inesperado. De hecho, el ABC de la GIR era
10 significativamente mayor con las ratas tratadas con rhKLK1 (mezcla 50:50) en comparación con HU KLK1 (mezcla 60:40) en todas las dosis sometidas a prueba (véase la tabla 5).

Una posible explicación no limitante para la sinergia de la mezcla de glicoformas 50:50 en las ratas es que las glicoformas de alto y bajo peso molecular actúan de formas ligeramente diferentes (actividades enzimáticas ligeramente diferentes, o unión ligeramente diferente a los receptores) en un contexto fisiológico. Estas ligeras diferencias en las actividades son complementarias y, por tanto, sinérgicas cuando las glicoformas están en una
15 mezcla 50:50.

De forma alternativa, la KLK1 puede actuar a través de varios mecanismos diferentes para influir en la utilización de glucosa, tales como unión a receptor y actividad enzimática. Las glicoformas de alto y bajo peso molecular pueden actuar de manera complementaria en la que una glucoforma tiene mayor actividad enzimática en un contexto fisiológico, mientras que la otra glicoforma tiene mayor afinidad de unión. Conjuntamente, dichas diferencias dan
20 como resultado un efecto sinérgico en un animal. Esta sinergia o complementariedad no se detectó en la proporción 60:40 de KLK1 de alto con respecto a bajo peso molecular.

Se llevó a cabo un estudio en un modelo animal de diabetes de tipo 2, específicamente ratones db/db de 11 semanas de edad, administrados con la mezcla 52:57,5 de rhKLK1 descrita previamente. Los ratones db/db habían desarrollado diabetes de tipo 2 como se demostró por una glucemia en ayuno mayor de 250 mg/dl. Se separaron los
25 ratones en cuatro grupos de diez ratones por grupo, y después de ayuno durante la noche (8 horas), a los ratones se les administró tampón solo (control negativo) o bien 2 unidades, 0,8 unidades o 0,04 unidades por ratón de mezcla de rhKLK1. 90 minutos después de la administración de rhKLK1, se sometió a prueba la glucemia en los ratones. En los animales con control negativo, la glucemia permaneció alta a 220 +/- 16 mg/dl. Los animales que recibieron 2 unidades de rhKLK1 tuvieron una disminución significativa en la glucemia de hasta 141 +/- 9 mg/dl ($p < 0,05$) en
30 comparación con el control. Los animales que recibieron 0,8 unidades por ratón tuvieron una disminución menos drástica pero todavía significativa en la glucemia de hasta 149 +/- 14 mg/dl ($p < 0,05$) en comparación con el control. No existe ninguna diferencia estadística en la glucemia en ratones que recibieron la menor dosis de rhKLK1 de 0,04 unidades por ratón (212 +/- 23 mg/dl) en comparación con el control. Por lo tanto, el tratamiento de ratones db/db diabéticos con rhKLK1 en una proporción de glicoformas de 52:47,5 da como resultado una disminución significativa
35 en la hiperglucemia.

Aunque se ha descrito la invención anterior con algo de detalle a modo de ilustración y ejemplo por fines de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para un experto en la técnica a la vista de las enseñanzas de la presente invención que se pueden realizar determinados cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

40 La anterior descripción detallada y ejemplos se han dado únicamente por claridad de comprensión. De las mismas no se debe entender ninguna limitación innecesaria. La invención no se limita a los detalles exactos mostrados y descritos, por lo que las variaciones obvias para un experto en la técnica estarán incluidas dentro de la invención definida por las reivindicaciones.

Listado de secuencias sin secuencias

SEQ ID NO: 1-2 secuencias de aminoácidos de la preproteína calicreína-1 tisular humana

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una primera forma madura y activa de un polipéptido de calicreína-1 tisular humana (KLK1) y una segunda forma madura y activa de un polipéptido de calicreína-1 tisular humana (KLK1),
 5 en la que el primer polipéptido de KLK1 tiene tres glicanos ligados a N unidos a los residuos 78, 84 y 141 como se define por SEQ ID NO: 1 y el segundo polipéptido de KLK1 tiene dos glicanos ligados a N unidos a los residuos 78 y 84 pero no a 141 como se define por SEQ ID NO:2; y
 en la que el primer polipéptido de KLK1 y el segundo polipéptido de KLK1 están presentes en la composición en una proporción que varía de 45:55 a 55:45.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la proporción del primer polipéptido de KLK1 y el segundo polipéptido de KLK1 en la composición es de 50:50.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho(s) polipéptido(s) de KLK1 comprende(n) los residuos aminoácidos 78-141 de SEQ ID NO: 1 o los residuos aminoácidos 78-141 de SEQ ID NO:2.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicho(s) polipéptido(s) de KLK1 comprende(n) los residuos aminoácidos 25-262 de SEQ ID NO:1 o los residuos aminoácidos 25-262 de
 15 SEQ ID NO:2.
5. La composición de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho(s) polipéptido(s) de KLK1 comprende(n) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con los residuos aminoácidos 25-262 de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que dicho(s) polipéptido(s) de KLK1 comprende(n) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con los residuos aminoácidos 25-
 20 262 de SEQ ID NO:2, y en la que dicho(s) polipéptido(s) de KLK1 comprende(n) E145 y/o A188.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicho(s) polipéptido(s) de KLK1 comprende(n) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con los residuos aminoácidos 25-262 de SEQ ID NO:2, y en la que dicho(s) polipéptido(s) de KLK1 comprende(n)
 25 Q145 y/o V188.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el/los polipéptido(s) de KLK1 consiste(n) en los residuos aminoácidos 25-262 de SEQ ID NO:1 o los residuos aminoácidos 25-262 de SEQ ID NO:2.
9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además un diluyente, adyuvante
 30 o vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la composición está sustancialmente libre de otras isoformas glicosiladas (glicoformas) de KLK1.
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la composición tiene niveles de endotoxina de menos de 1 UE/mg de proteína, proteína de célula huésped de menos de 100 ng/mg de proteína total, ADN de célula huésped de menos de 10 pg/mg de proteína total, y/o está sustancialmente libre de agregados (apareciendo más de aproximadamente un 95 % como un pico único por SEC HPLC).
 35
12. Un dispositivo que comprende una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el dispositivo es adecuado para administrar la composición por vía subcutánea.
13. El dispositivo de la reivindicación 12, en el que el dispositivo es una jeringuilla.
- 40 14. La jeringuilla de la reivindicación 13, que comprende además un montaje con aguja hipodérmica unido a la jeringuilla.
15. La jeringuilla de la reivindicación 14, en la que la aguja tiene una longitud de 1,27 cm (½ pulgadas) a 1,59 cm (5/8 pulgadas) y tiene un calibre de aproximadamente 25 a aproximadamente 31.

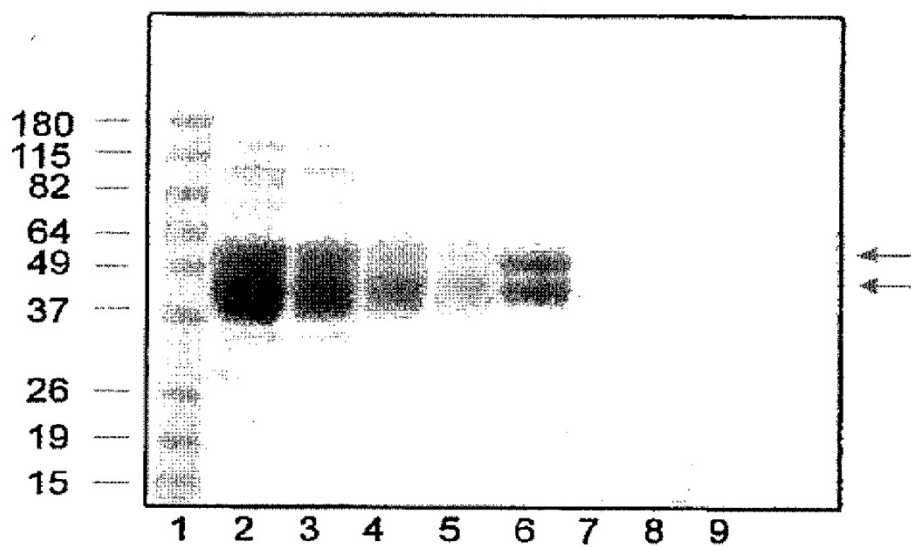


Figura 1

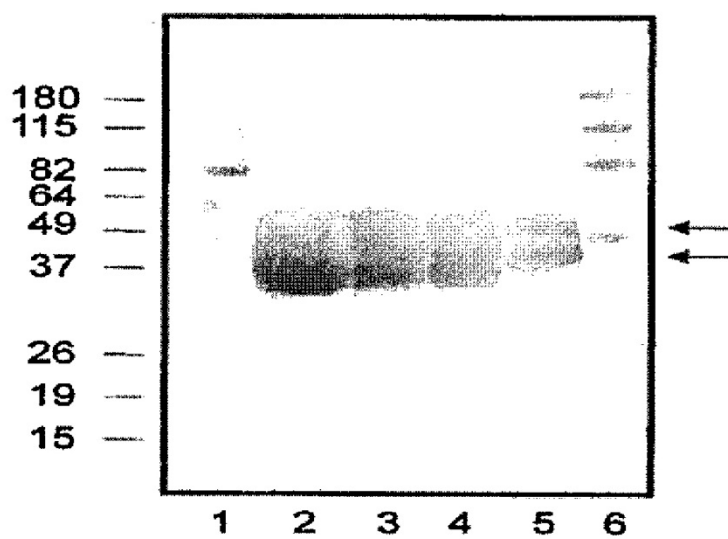


Figura 2

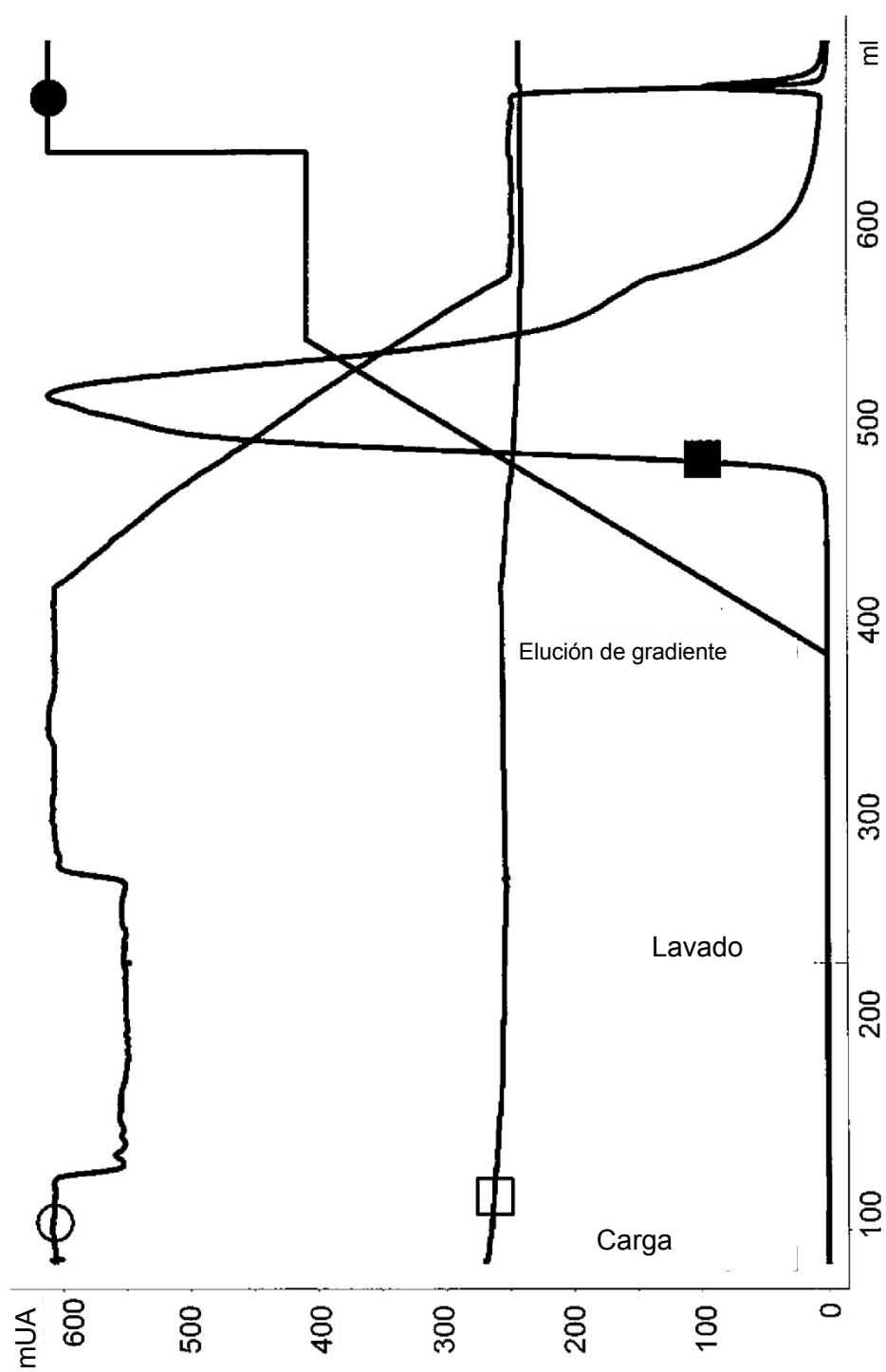


Figura 3A

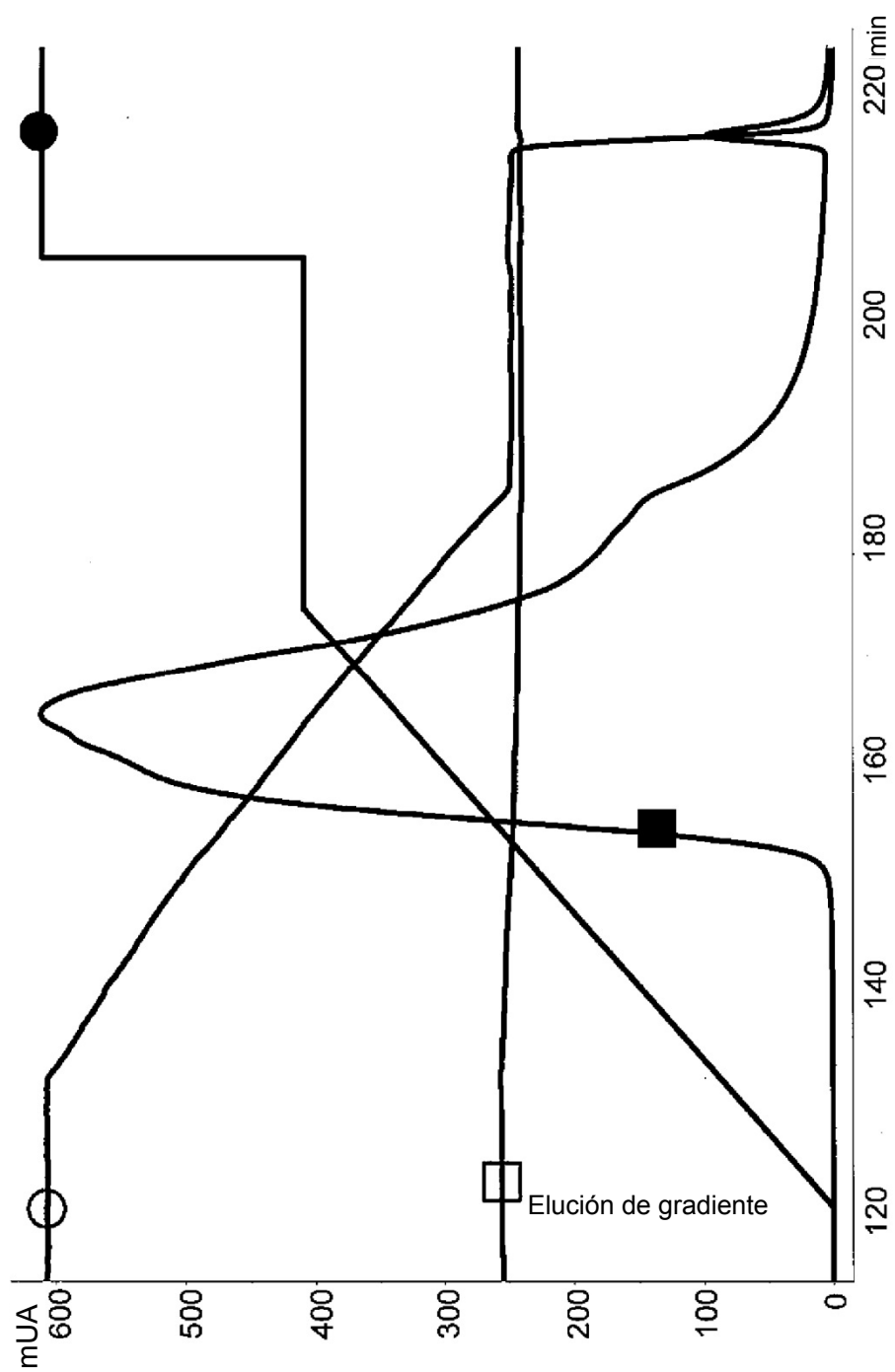


Figura 3B

Carril	Descripción de muestra	Muestra (μl)	4X LDS (μl)	Cantidad cargada en gel (μl)
1	Patrones PM	7	0	7
2	Carga de	22,5	7,5	20
3	Fracción A11	22,5	7,5	20
4	Fracción A12	22,5	7,5	20
5	Fracción B12	22,5	7,5	20
6	Fracción B11	22,5	7,5	20
7	Fracción B10	22,5	7,5	20
8	Fracción B5	22,5	7,5	20
9	Fracción B3	22,5	7,5	20
10	Fracción B1	22,5	7,5	20
11	Fracción C2	22,5	7,5	20
12	Fracción C12	22,5	7,5	20

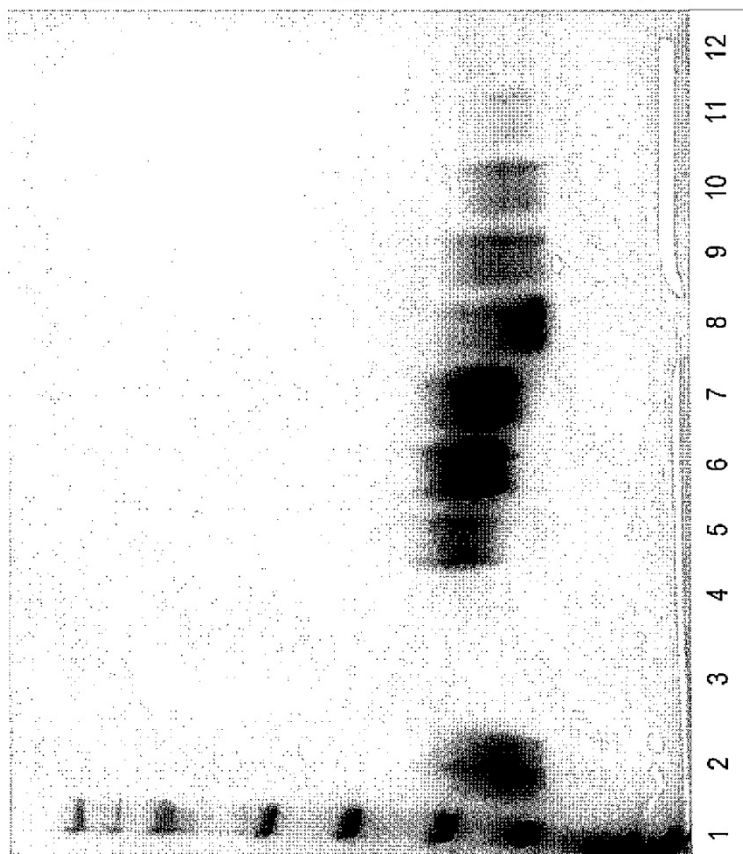


Figura 4

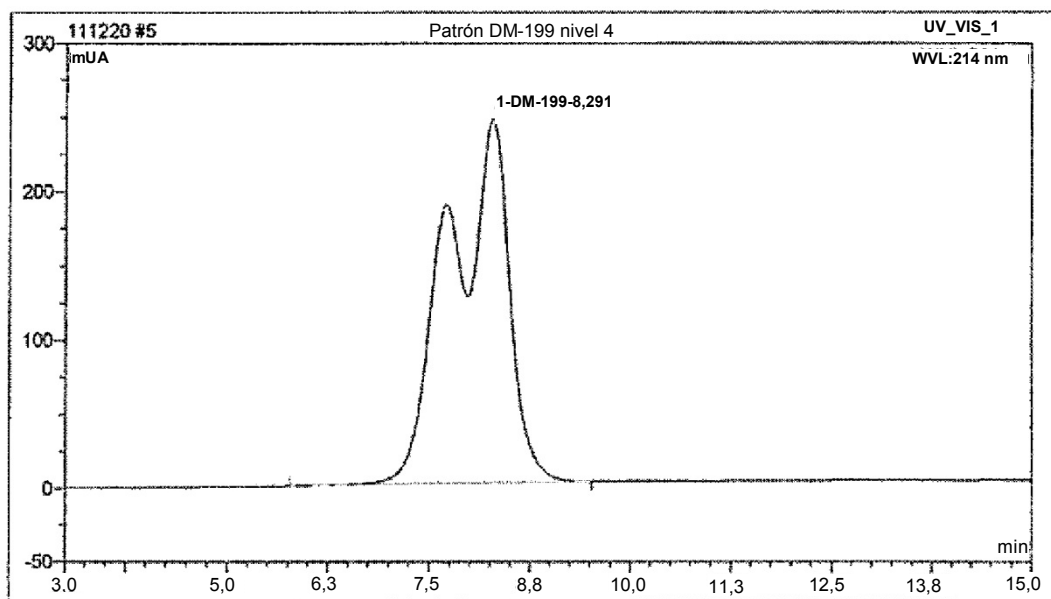


Figura 5A

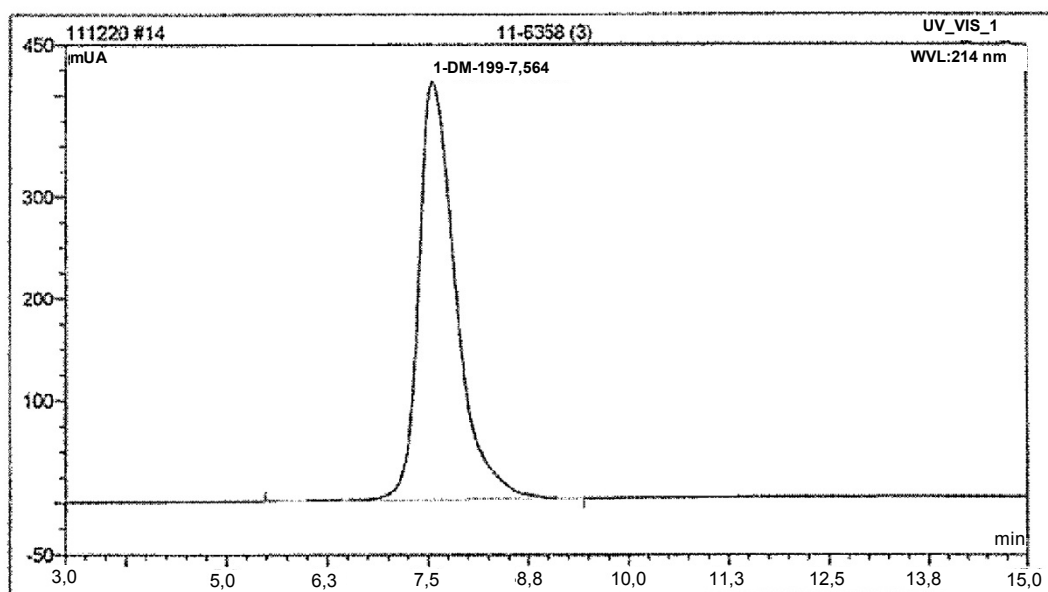


Figura 5B

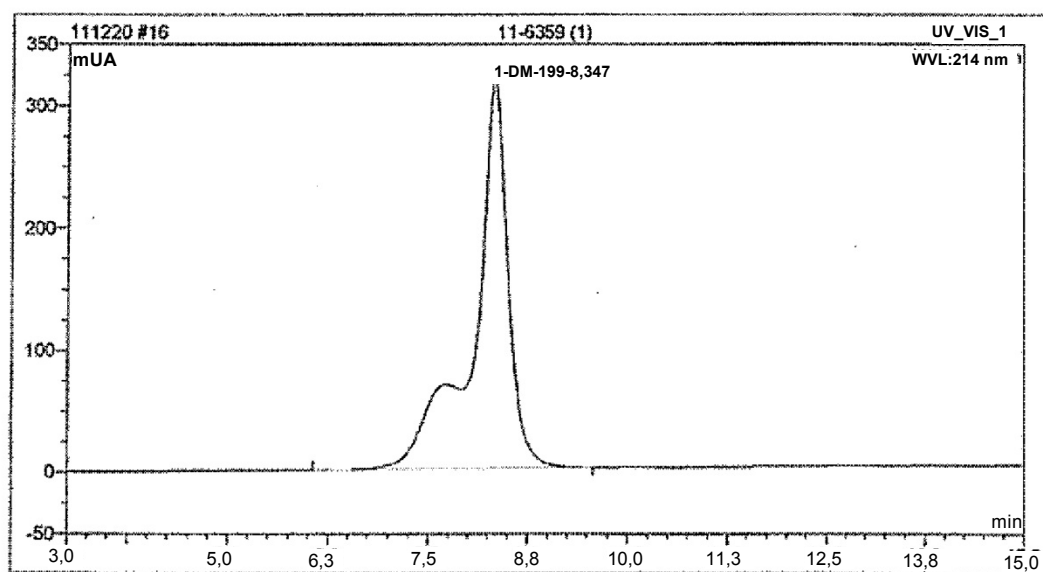


Figura 5C

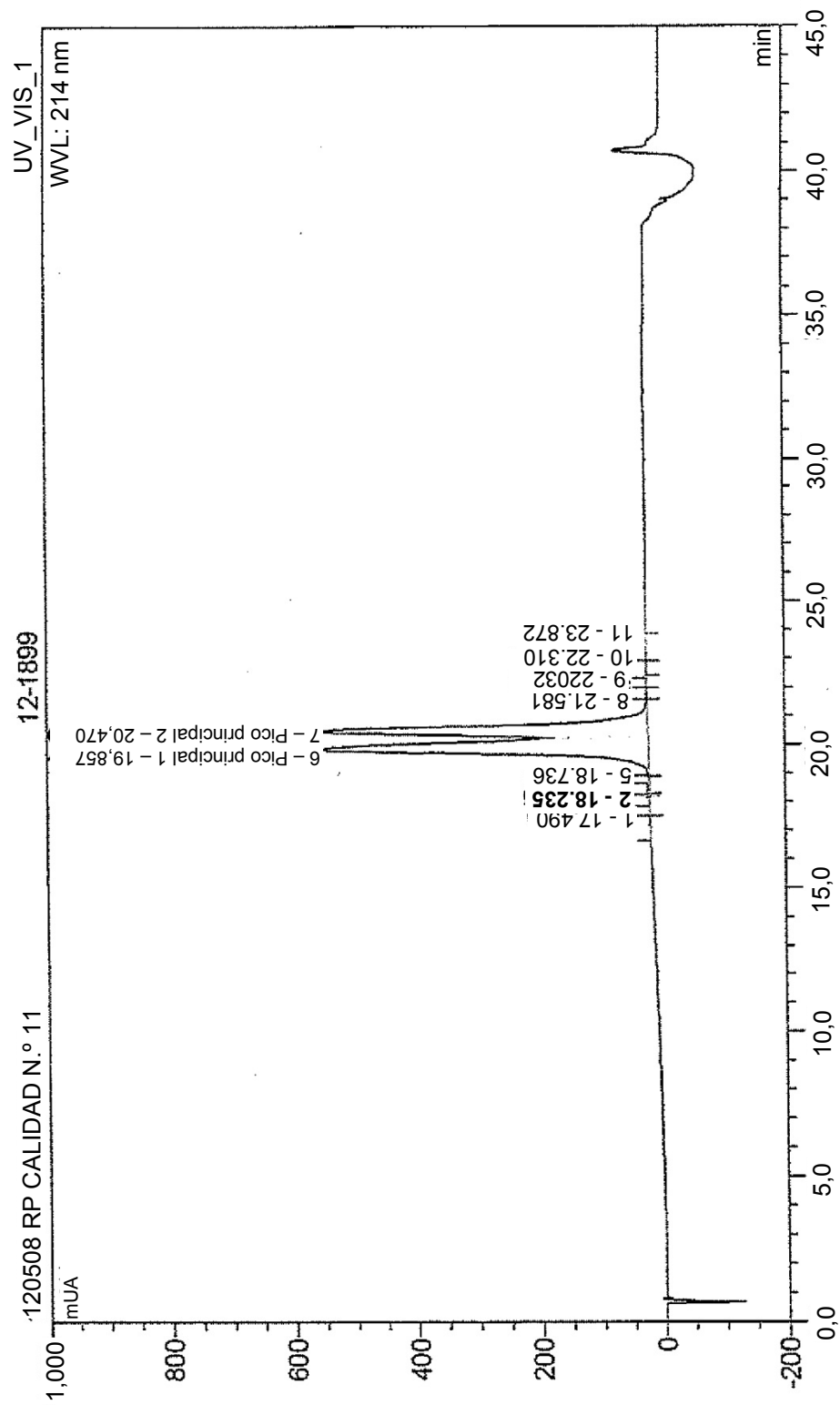


Figura 6

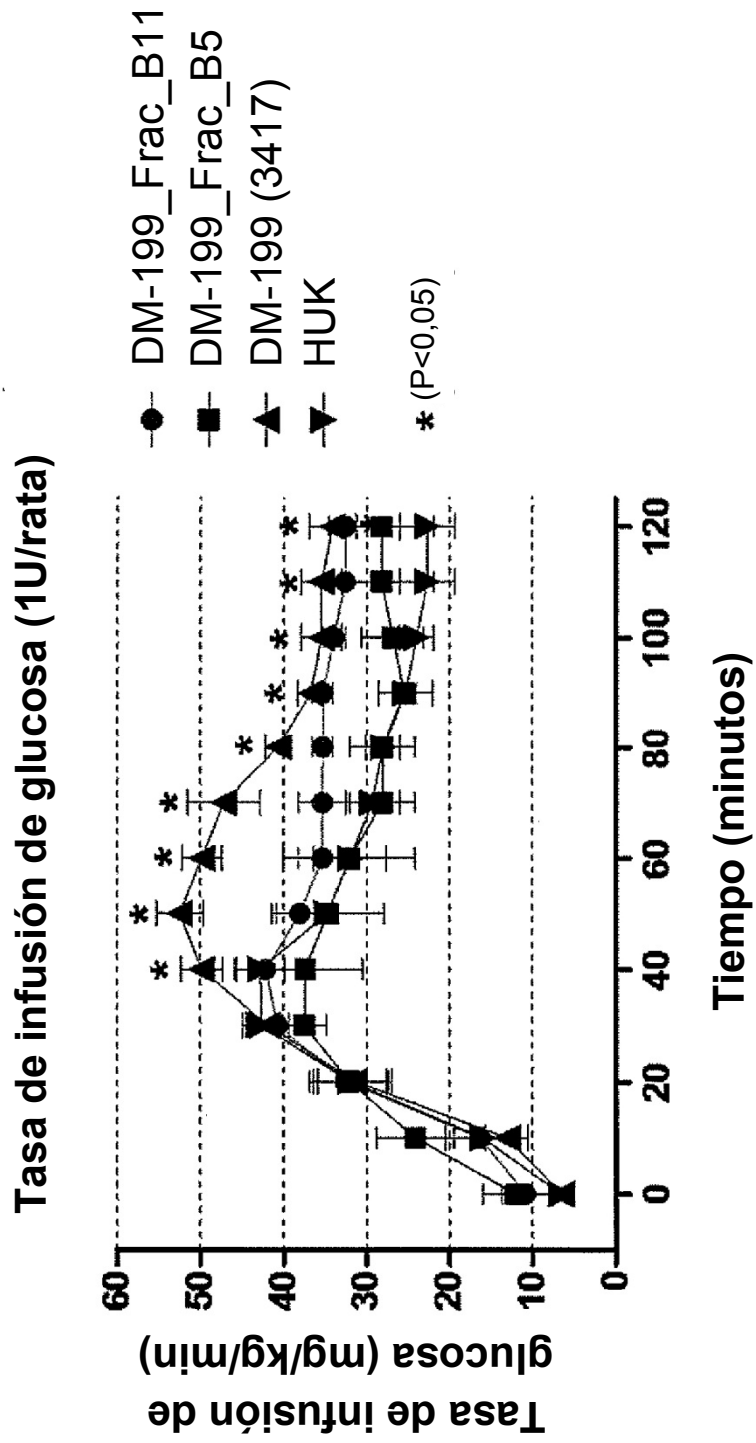


Figura 7

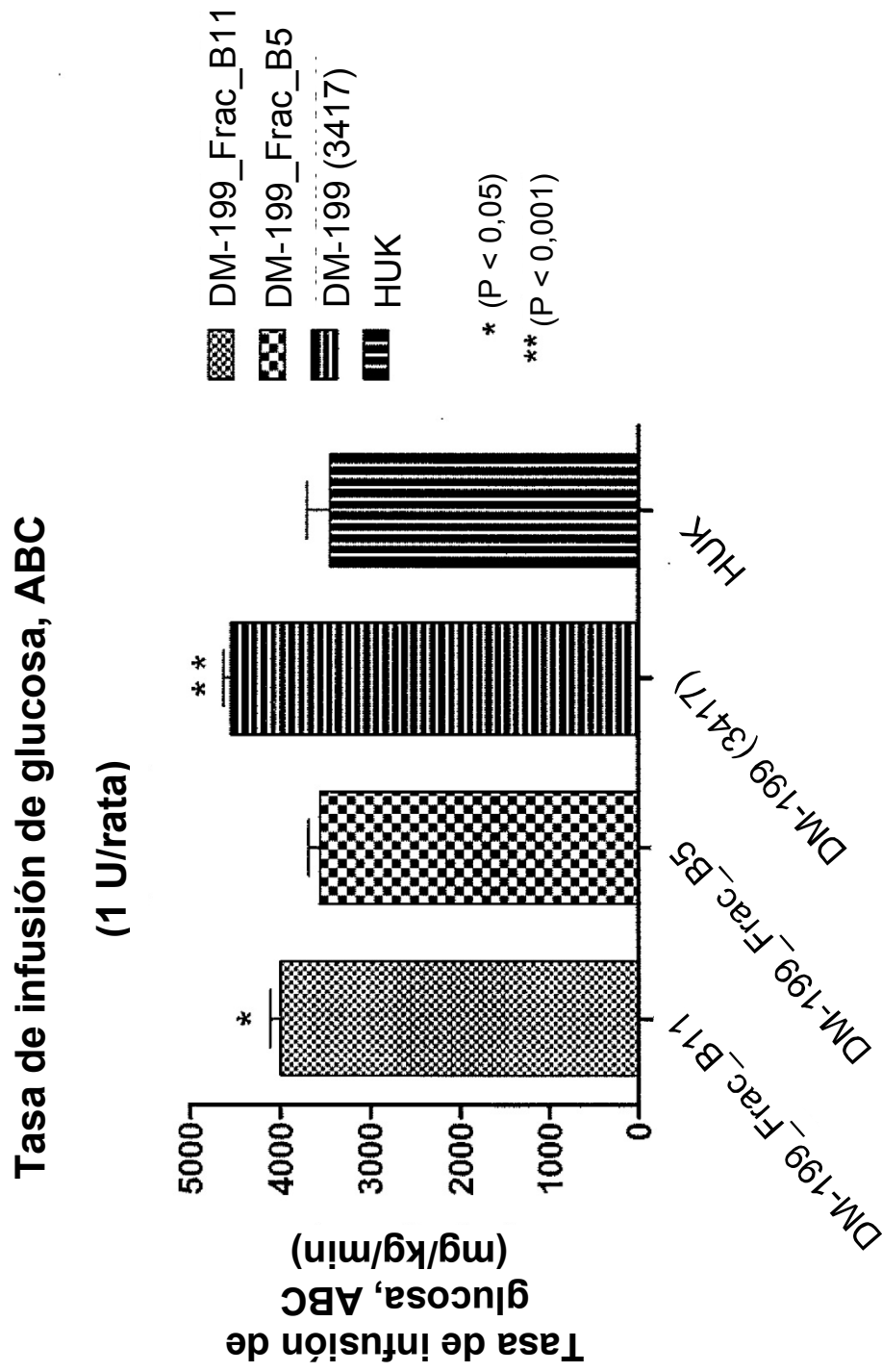


Figura 8