(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 33 472 T2** 2006.01.12

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 739 355 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 33 472.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/00299**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 909 223.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/021601**
(86) PCT-Anmeldetag: **11.01.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **17.08.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.10.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **08.09.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.01.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C07K 14/81*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

179964	**11.01.1994**	**US**
208264	**10.03.1994**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Dyax Corp., Cambridge, Mass., US

(72) Erfinder:
MARKLAND, William, Milford, US; LADNER, Robert Charles, Ijamsville, US

(74) Vertreter:
Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler Wichmann Huhn, 81675 München

(54) Bezeichnung: **KALLIKREINHEMMENDE "KUNITZ-DOMÄNE"-PROTEINE UND DERIVATEN DAVON**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Technisches Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft neue Klassen von Proteinen und Proteinanaloga, die an humanes Plasmakallikrein binden oder dieses inhibieren.

Beschreibung des Standes der Technik

[0002] Kallikreine sind Serinproteasen, die sowohl in Geweben als auch im Plasma gefunden werden. Plasmakallikrein ist in die Kontakt-aktivierte (intrinsischer Weg) Koagulation, Fibrinolyse, Hypotonie und Entzündung einbezogen (siehe BHOO92). Diese Wirkungen von Kallikrein werden durch die Wirkungen dreier verschiedener physiologischer Substrate vermittelt: i) Faktor XII (Koagulation), ii) Pro-Urokinase/Plasminogen (Fibrinolyse), und iii) Kininogene (Hypotonie und Entzündung).

[0003] Die Kallikreinspaltung von Kininogenen resultiert in der Produktion von Kininen, kleinen hochpotenten bioaktiven Peptiden. Die Kinine wirken über Zelloberflächenrezeptoren, die auf einer Vielzahl von Zelltypen vorhanden sind. Intrazelluläre heterotrimere G-Proteine verbinden die Kininrezeptoren mit Second-Messenger-Signalwegen, einschließlich Stickoxid, Adenylylcyclase, Phospholipase A_2 und Phospholipase C. Zu den wichtigen physiologischen Wirkungen von Kininen gehören: (i) erhöhte vaskuläre Permeabilität; (ii) Vasodilatation; (iii) Bronchospasmus; und (iv) Schmerzinduktion. Folglich vermitteln Kinine den lebensbedrohlichen gefäßbedingten Schock und das Ödem, das mit einer Bakteriämie (Sepsis) oder einer Verletzung assoziiert ist, das Ödem und die Atemwegshyperreaktivität von Asthma und sowohl entzündungsbedingten als auch neurogenen Schmerz, der mit einer Gewebeverletzung assoziiert ist. Die Konsequenzen einer unangemessenen Plasmakallikreinaktivität und der resultierenden Kininproduktion werden in Patienten mit hereditärem Angioödem (HA) drastisch veranschaulicht. HA liegt aufgrund eines genetisch bedingten Mangels des C1-Inhibitors, dem endogenen Hauptinhibitor von Plasmakallikrein, vor. Die Symptome von HA schließen Ödem der Haut, subkutaner Gewebe und des Gastrointestinaltrakts sowie abdominale Schmerzen und Erbrechen ein. Fast ein Drittel der HA-Patienten sterben durch Ersticken aufgrund eines Ödems des Larynx und des oberen Atmungstrakts. Kallikrein wird als ein Zymogen (Präkallikrein) sekretiert, das als inaktives Molekül zirkuliert, bis es durch ein proteolytisches Ereignis aktiviert wird, welches die $+NH_3$-IVGGTNSS... Sequenz von Kallikrein (SEQ ID NR. 1) freisetzt. Humanes Plasmapräkallikrein wird in „Genebank" als Eintrag P03952 gefunden.

[0004] Reifes Plasmakallikrein enthält 619 Aminosäuren. Die Hydrolyse der Arg_{371}-Ile_{371}-Peptidbindung ergibt eine zweikettige Proteinase, die durch eine Disulfidbrücke verbunden ist. Die amino-terminale leichte Kette (248 Reste) trägt das katalytische Zentrum.

[0005] Der Hauptinhibitor von Plasmakallikrein (pKA) ist in vivo der C1-Inhibitor; siehe SCHM87, Seiten 27–28. C1 ist ein Serpin und bildet einen im Wesentlichen irreversiblen Komplex mit pKA. Obwohl von bovinem Pankreas-Trypsin-Inhibitor (BPTI) zuerst behauptet wurde, dass er mit einem K_i = 320 pM ein starker pKA-Inhibitor ist (AUER88), weist BERN93 darauf hin, dass sein K_i für pKA 30 nM (d.h. 30.000 pM) ist. Die G36S-Mutante hatte einen K_i von über 500 nM. Folglich besteht ein Bedarf für einen sicheren Kallikrein-Inhibitor. Die wesentlichen Eigenschaften eines solchen Mittels sind:

i. Neutralisation von relevantem/n Kallikreinenzym(en);
ii. hochaffine Bindung an Zielkallikreine, um die Dosis zu minimieren;
iii. Hohe Spezifität für Kallikrein, um Nebenwirkungen zu reduzieren; und
iv. Hoher Ähnlichkeitsgrad zu einem humanen Protein, um eine potenzielle Immunogenität und Organ-/Gewebetoxizität zu minimieren.

[0006] Die Kandidaten-Zielkallikreine, die inhibiert werden sollen, sind Chymotrypsin-homologe Serinproteasen.

Exzessives Bluten

[0007] Exzessives Bluten kann das Ergebnis von defizienter Koagulationsaktivität, erhöhter fibrinolytischer Aktivität oder einer Kombination von beiden sein. Bei den meisten Diathesen muss die Aktivität von Plasmin kontrolliert werden. Allerdings ist Plasmakallikrein (pKA) ein Aktivator von Plasminogen und ein potenter, selektiver pKA-Inhibitor kann die Plasminogenaktivierung verhindern. Von der klinisch vorteilhaften Wirkung von

BPTI bei der Reduktion des Blutverlusts wird angenommen, dass sie aus ihrer Inhibition von Plasmin (K_D ~ 0,3 nM) oder von Plasmakallikrein (K_D ~ 100 nM) oder beider Enzyme resultiert. Es wurde allerdings gefunden, dass BPTI ausreichend antigen wirkt, so dass eine zweite Verwendung einen Hauttest erfordert. Darüber hinaus sind die Dosen an BPTI, die zur Kontrolle einer Blutung benötigt werden, relativ hoch und der Wirkmechanismus ist nicht klar. Einige sagen, dass BPTI auf Plasmin wirkt, während andere sagen, dass es durch Inhibierung von Plasmakallikrein wirkt. FRAE89 berichtet, dass Dosen von ungefähr 840 mg an BPTI den Blutverlust bei 80 Patienten mit Operation am offenen Herzen auf fast die Hälfte reduzierten und dass die mittlere Transfusionsmenge um 74% erniedrigt war. Miles Inc. führte kürzlich Trasylol in den USA zur Reduktion von Blutungen bei Operation in den Markt ein (siehe Miles Produktbroschüre über Trasylol). LOHM93 schlägt vor, dass Plasmininhibitoren bei der Kontrolle von Blutungen bei Augenoperationen nützlich sein könnten. SHER89 berichtet, dass BPTI nützlich bei der Begrenzung von Blutungen bei Colonoperationen sein könnte.

[0008] Ein Kallikreininhibitor, der sehr viel potenter als BPTI ist und der fast identisch mit einer humanen Proteindomäne ist, bietet ein ähnliches therapeutisches Potenzial an, erlaubt die Dosis zu reduzieren und hat weniger Potenzial zur Antigenizität.

[0009] Mit rekombinanten DNA-Techniken kann man ein neues Protein durch Expression eines mutierten Gens eines Elternproteins erhalten. Verschiedene Strategien für das Auswählen von Mutationen zum Testen sind bekannt. Eine, die „Protein-Surgery", bezieht das Einführen einer oder mehrerer vorher bestimmter Mutationen in ein Gen der Wahl ein. Ein einzelnes Polypeptid von komplett vorherbestimmter Sequenz wird exprimiert und seine Bindungseigenschaften werden beurteilt.

[0010] Das andere Extrem stellt die zufällige Mutagenese mittels relativ unspezifischer Mutagene, wie z.B. Bestrahlung oder verschiedener chemischer Mittel, siehe Lehtovaara, E. P. Anmeld. 285,123, oder durch Expression von hoch degenerierter DANN, dar. Es ist auch möglich, eine Zwischenstrategie einzuschlagen, in welcher einige Reste konstant gehalten werden, andere zufällig mutiert werden und wieder andere in vorbestimmter Weise mutiert werden. Dieses wird „Variierung" genannt. Siehe Ladner, et al. USP 5,220,409.

[0011] DENN94a und DENN94b berichten von der Selektion von Kunitz-Domänen basierend auf APP-I zur Bindung an den Komplex von Gewebefaktor mit Faktor VII_a. Sie verwendeten nicht LACI-K1 als Eltern und auch nicht pKA als ein Ziel. Das bindende Molekül mit der höchsten Affinität, das sie erhielten, hatte einen K_D für sein Ziel von ungefähr 2 nM. Unsere Selektanten der ersten Runde zur Bindung an pKA haben eine Affinität von ungefähr 0,3 nM und unsere Selektanten der zweiten Runde sind bei ungefähr 0,1 nM (= 100 pM) oder besser.

[0012] Von Proteinen, die von einer bestimmten Spezies genommen wurden, wird angenommen, dass sie mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit eine Immunantwort verursachen, wenn sie Individuen dieser Spezies injiziert werden. Murine Antikörper sind hoch antigen beim Menschen. „Chimere" Antikörper mit humanen konstanten Domänen und murinen variablen Domänen sind entschieden weniger antigen. So genannte „humanisierte" Antikörper haben humane konstante Domänen und variable Domänen, in denen die CDRs von murinen Antikörpern aufgenommen wurden, wohingegen der Rahmen der variablen Domänen humanen Ursprungs ist. „Humanisierte" Antikörper sind viel weniger antigen als „chimere" Antikörper. In einem „humanisierten" Antikörper sind fünfzig bis sechzig Reste des Proteins nicht-humanen Ursprungs. Die erfindungsgemäßen Proteine umfassen in den meisten Fällen nur ungefähr sechzig Aminosäuren und für gewöhnlich gibt es zehn oder weniger Unterschiede zwischen dem gentechnisch veränderten Protein und dem Elternprotein. Obwohl Menschen sogar gegen humane Proteine, wie z.B. humanes Insulin, Antikörper entwickeln, tendieren solche Antikörper dazu, schwach zu binden und oft hindern sie das injizierte Protein nicht daran, seine beabsichtigte biologische Funktion zu zeigen. Die Verwendung eines Proteins aus der zu behandelnden Spezies garantiert nicht, dass es keine Immunantwort geben wird. Dennoch reduziert das Auswählen eines Proteins, welches in seiner Sequenz sehr nahe zu einem humanen Protein ist, das Risiko für eine starke Immunantwort im Menschen erheblich.

[0013] Kunitz-Domänen sind hochstabil und können in Hefe oder anderen Wirtsorganismen effizient hergestellt werden. Mindestens zehn humane Kunitz-Domänen wurden beschrieben. Obwohl von BPTI zu einer Zeit angenommen wurde, dass es ein potenter pKA-Inhibitor ist, gibt es gegenwärtig keine humanen Kunitz-Domänen, die pKA sehr gut inhibieren. Daher ist es eine Aufgabe dieser Erfindung, Sequenzen von Kunitz-Domänen bereitzustellen, die sowohl potente Inhibitoren von pKA sind als auch in ihrer Sequenz nahe an humanen Kunitz-Domänen sind.

[0014] Die Verwendung von ortsspezifischer Mutagenese, ob nicht zufällig oder zufällig, um mutante Bin-

dungsproteine mit verbesserter Eigenschaft zu erhalten, ist im Stand der Technik bekannt, garantiert aber nicht, dass die mutanten Proteine die gewünschte Zielspezifität oder -affinität haben werden. Unter der Voraussetzung der schwachen Anti-Kallikrein-Aktivität von BPTI wären Mutationen von BPTI oder anderen Kunitz-Domäne-Proteinen vor dieser Erfindung, einem bevorzugten Verfahren zum Erhalten eines starken Bindemoleküls, geschweige denn Inhibitors, von Kallikrein, nicht in Erwägung gezogen worden.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0015] Diese Erfindung betrifft neue BPTI-homologe Kunitz-Domänen, insbesondere LACI-Homologe, die ein oder mehrere Plasma- (und/oder Gewebe-)Kallikreine inhibieren, und die therapeutische und diagnostische Verwendung dieser neuen Proteine. Insbesondere betrifft diese Erfindung Kunitz-Domänen, die aus Kunitz-Domänen humanen Ursprungs und insbesondere aus der ersten Kunitz-Domäne von LACI abgeleitet sind; Kunitz-Domänen humanen Ursprungs sind wahrscheinlich nicht immunogen beim Menschen. Die erfindungsgemäßen Proteine inhibieren Plasmakallikrein (und/oder Gewebekallikrein) mit einem K_D von nicht mehr als 20 nM, vorzugsweise nicht mehr als 5 nM, weiter bevorzugt nicht mehr als ungefähr 300 pM und am meisten bevorzugt nicht mehr als ungefähr 100 pM.

[0016] Ein spezifischer, hoch affiner Inhibitor von Plasmakallikrein (und, wo benötigt, Gewebekallikrein) wird eine signifikante therapeutische Anwendbarkeit in allen pathologischen Zuständen, die durch Kallikrein vermittelt werden, und insbesondere solchen zeigen, die mit Kininen assoziiert sind. Der therapeutische Ansatz des Inhibierens der katalytischen Produktion von Kininen wird als bevorzugt gegenüber einem Antagonismus von Kininrezeptoren betrachtet, da Rezeptorantagonisten in Abwesenheit der Kallikreininhibition mit kontinuierlicher Kininbildung konkurrieren müssen. Bezeichnender Weise ist der genetisch bedingte Mangel an Plasmakallikrein gutartig und daher ist die Inhibition von Plasmakallikrein wahrscheinlich sicher. Wir haben kürzlich einen Lead-pKA-Inhibitor, bezeichnet mit KKII/3#6, entdeckt. Dieser Inhibitor ist eine Variante einer natürlich vorkommenden humanen Plasmaprotein-Kunitz-Domäne und zeigt signifikant größere Kallikrein-Bindepotenz als Trasylol. KKII/3#6 hat einen K_i für Kallikrein, welcher mehr als 100-fach über dem von sowohl Wildtyp-LACI als auch BPTI liegt und ungefähr 300 pM beträgt. Im Gegensatz dazu ist sein K_i für Plasmin 10 µM. Die Proteine KK2/#11 und KK2/#13 sind besonders bevorzugte pKA-Inhibitoren und haben einen K_i < 300 pM und wahrscheinlich weniger als 100 pM. Von einem reversiblen Inhibitor wird angenommen, dass er von größerer Einsetzbarkeit ist als ein irreversibler Inhibitor wie der C1-Inhibitor.

[0017] Der Transfer der Subsequenzen, die pKA-Bindung verleihen, auf andere Kunitz-Domänen, insbesonders humanen Kunitz-Domänen, ist offenbart.

[0018] Bevorzugte pKA-Inhibitoren der vorliegenden Erfindung erfüllen eine oder mehrere der folgenden Erfordernisse:

1) der Inhibitor inhibiert Plasma-Kallikrein mit einem K_i von nicht mehr als 20 nM, vorzugsweise 5 nM oder weniger, weiter bevorzugt 300 pM oder weniger, und am meisten bevorzugt 100 pM oder weniger,

2) der Inhibitor umfasst eine Kunitz-Domäne, welche den Anforderungen, die in Tabelle 14 mit den Nummern der Reste mit Bezugnahme auf BPTI gezeigt sind, entspricht,

3) der Inhibitor hat bei den Kunitz-Domäne-Positionen 12–21 und 32–39 einen der Aminosäuretypen, die für diese Position in Tabelle 15 aufgeführt sind, und

4) der Inhibitor ist im Wesentlichen homolog zu einer Referenzsequenz von im Wesentlichen humanem Ursprung, ausgewählt aus der Gruppe KKII/3#6, KK2/#11, KK2/#13, KK2/#1, KK2/#2, KK2/#3, KK2/#4, KK2/#6, KK2/#7, KK2/#8, KK2/#9, KK2/#10, KK2/#12, KK2con1, humanes LACI-K2, humanes LACI-K3, humanes Collagen α3 KuDom, humanes TFPI-2 DOMÄNE 1, humanes TFPI-2 DOMÄNE 2, humanes TFPI-2 DOMÄNE 3, K2, humane PRhumanes ITI-K1, humanes ITI-OTEASE NEXIN-II, humanes APP-I, DKI-1.2.1, DKI-1.3.1, DKI-2.1, DKI-3.1.1, DKI-3.2.1, DKI-3.3.1, DKI-4.1.1, DKI-4.2.1, DKI-4.2.2, DKI-5.1 und DKI-6.1.

NOMENKLATUR

[0019] Hierin werden Affinitäten als K_D ($K_D(A, B) = [A][B]/[A – B]$) bezeichnet. Ein numerisch kleinerer K_D spiegelt eine höhere Affinität wider. Für die Zwecke dieser Erfindung ist ein „Kallikrein-inhibierendes Protein" eines, das ein spezifiziertes Kallikrein mit einer K_i von ungefähr 20 nM oder weniger bindet und inhibiert. „Inhibition" bezieht sich auf ein Blockieren der katalytischen Aktivität von Kallikrein und ist daher in vitro in Tests, die chromogene oder fluorogene Substrate einsetzen, oder in Tests, die Makromoleküle einbeziehen, messbar.

[0020] Aminosäurereste werden auf drei Arten besprochen: der vollständige Name der Aminosäure, der Stan-

dard-Drei-Buchstaben-Code und der Standard-Ein-Buchstaben-Code. Der Text verwendet die vollständigen Namen und den Drei-Buchstaben-Code, wo die Klarheit dies erfordert.

A = Ala	G = Gly	M = Met	S = Ser
C = Cys	H = His	N = Asn	T = Thr
D = Asp	I = Ile	P = Pro	V = Val
E = Glu	K = Lys	Q = Gln	W = Trp
F = Phe	L = Leu	R = Arg	Y = Tyr

[0021] Für den Zweck dieser Erfindung sind „im Wesentlichen homologe" Sequenzen mindestens zu 51%, weiter bevorzugt zu mindestens 80% über jeden einzelnen spezifizierten Bereich identisch. Für diese Erfindung schließt „im Wesentlichen homolog" exakte Identität ein. Sequenzen sind noch „im Wesentlichen homolog", wenn sie in einem Bereich von mindestens 20 Aminosäuren ausreichend ähnlich sind (51% oder mehr), aber außerhalb des verglichenen Bereichs völlig unterschiedlich sind. Eine Insertion von einer Aminosäure in einer Sequenz relativ zu einer anderen zählt als eine Fehlpaarung. Am meisten bevorzugt sind nicht mehr als sechs Reste, die nicht an den Enden sind, verschieden. Vorzugsweise ist die Divergenz in der Sequenz, insbesondere in den spezifizierten Bereichen, in Form von „konservativen Modifikationen".

[0022] „Konservative Modifikationen" sind definiert als

(a) konservative Substitutionen von Aminosäuren, wie in Tabelle 9 definiert; und

(b) einzelne oder mehrfache Insertionen oder Deletionen von Aminosäuren an den Enden, den Domänengrenzen, in Loops oder anderen Abschnitten relativ hoher Beweglichkeit.

[0023] Vorzugsweise sind, außer an den Enden, nicht mehr als etwa sechs Aminosäuren an jedem Ort insertiert oder deletiert, und die Modifikationen sind außerhalb von Bereichen, von denen bekannt ist, dass sie wichtige Bindungsstellen enthalten.

Kunitz-Domänen

[0024] Hierin wird „Kunitz-Domäne" und „KuDom" austauschbar verwendet, um ein Homolog von BPTI (nicht von dem Kunitz-Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor) zu bezeichnen. Eine KuDom ist eine Domäne eines Proteins mit mindestens 51 Aminosäuren (und bis zu 61 Aminosäuren), enthaltend mindestens zwei und bevorzugt drei Disulfide. In dieser Schrift werden die Reste aller Kunitz-Domänen mit Bezugnahme zu BPTI nummeriert (d.h. Reste 1–58, Aminosäuresequenz in Tabelle 2). So ist der erste Cysteinrest Rest 5 und der letzte Cysteinrest ist 55. Eine Aminosäuresequenz soll für den Zweck dieser Erfindung als eine Kunitz-Domäne gelten, wenn sie mit drei oder weniger Fehlpaarungen an eine Sequenz, die in Tabelle 14 gezeigt wird, angelagert werden kann. Eine Insertion oder Deletion eines Restes soll als eine Fehlpaarung zählen. In Tabelle 14 meint „x" jede beliebige Aminosäure und meint „X" die Typen, die für diese Position aufgeführt sind. Disulfidbrücken verbinden mindestens zwei aus: 5 nach 55, 14 nach 38 und 30 nach 51. Die Zahl der Disulfide kann um eins erniedrigt sein, aber keines der Standard-Cysteine soll ungepaart bleiben. Daher wird, wenn ein Cystein verändert wird, ein kompensierendes Cystein an einer geeigneten Stelle zugefügt oder das Partnercystein wird auch durch ein Nicht-Cystein ausgetauscht (das Letztere wird allgemein bevorzugt). Zum Beispiel hat der Proteaseinhibitor aus der Nebendrüse der männlichen Drosophila funebris kein Cystein an Position 5, aber es hat ein Cystein an Position –1 (unmittelbar vor Position 1); wahrscheinlich bildet dies ein Disulfid mit CYS_{55}. Wenn Cys_{14} und Cys_{38} ersetzt werden, wird das Erfordernis von Gly_{12}, $(Gly\ oder\ Ser)_{37}$ und Gly_{36} fallen gelassen. Kein Rest bis viele Reste, einschließlich zusätzlicher Domänen (einschließlich andere KuDoms), können an jedes Ende einer Kunitz-Domäne angelagert werden.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0025] Proteaseinhibitoren, wie Kunitz-Domänen, wirken durch Bindung an das aktive Zentrum der Protease, so dass eine Peptidbindung (die „spaltbare Bindung"): 1) nicht gespalten, 2) sehr langsam gespalten oder 3) ohne Wirkung gespalten wird, da die Struktur des Inhibitors die Freisetzung oder Trennung der gespaltenen Abschnitte verhindert. In Kunitz-Domänen wirken Disulfidbrücken, indem sie das Protein zusammenhalten, sogar wenn exponierte Peptidbindungen gespalten werden. Von dem Rest auf der Aminoseite der spaltbare Bindung und sich fortbewegend von der Bindung werden die Reste gewöhnlicher Weise P1, P2, P3 usw. genannt. Die Reste, die auf die spaltbare Bindung folgen, werden P1', P2', P3' usw. genannt (SCHE67, SCHE68). Es ist

allgemein anerkannt, dass jede Serinprotease (einige Reste umfassende) Stellen S1, S2 usw. hat, die Seitengruppen und Hauptkettenatom der Reste P1, P2 usw. des Substrats oder Inhibitors erfassen, und Stellen S1', S2' usw. hat, die Seitengruppen und Hauptkettenatome von P1', P2' usw. des Substrats oder Inhibitors erfassen. Es ist die Wechselwirkung zwischen den S-Stellen und den P-Seitengruppen und den Hauptkettenatomen, die die Proteasespezifität im Hinblick auf Substrate und Inhibitorspezifität im Hinblick auf die Proteasen ergeben. Da das Fragment mit dem neuen Aminoterminus die Protease zuerst verlässt, haben sich viele Wissenschaftler, die Proteaseinhibitoren kleiner Molekülgrößen entwickeln, auf Verbindungen konzentriert, die die Stellen S1, S2, S3 usw. binden.

[0026] LASK80 gibt einen Überblick über Proteinproteaseinhibitoren. Einige Inhibitoren haben einige reaktive Zentren auf einer Polypeptidkette, und diese Domänen haben für gewöhnlich verschiedene Sequenzen, Spezifitäten und sogar Topologien. Es ist bekannt, dass das Austauschen von Aminosäuren in der P_5- bis P_5'-Region die Spezifität eines Inhibitors beeinflusst. Kürzlich wurde die Aufmerksamkeit auf den P1-Rest und die ihm nahen Reste fokussiert, da diese die Spezifität von einer Enzymklasse zu einer anderen verändern können. LASK80 schlägt vor, dass unter KuDoms Inhibitoren mit P1 = Lys oder Arg Trypsin inhibieren, jene mit P1 = Tyr, Phe, Trp, Leu und Met Chymotrypsin inhibieren, und jene mit P1 = Ala oder Ser wahrscheinlich Elastase inhibieren. LASK80 fährt fort, dass unter den Inhibitoren vom Kazal-Typ Inhibitoren mit P1 = Leu oder Met starke Elastase-Inhibitoren sind, und in der Bowman-Kirk-Familie Elastase mit P1 = Ala, aber nicht mit P1 = Leu inhibiert wird. Solche begrenzten Veränderungen stellen keine Inhibitoren mit wirklich hoher Affinität bereit (d.h. besser als 1 bis 10 nM).

[0027] KuDoms sind oben definiert. Die 3D-Struktur (bei hoher Auflösung) von BPTI (der archetypischen Kunitz-Domäne) ist bekannt. Eine der Röntgenstrukturen ist in der Brookhaven Protein Datenbank als „6PTI" hinterlegt. Die 3D-Struktur von einigen BPTI-Homologen (EIGE90, HYNE90) ist bekannt. Mindestens siebzig KuDom-Sequenzen sind bekannt. Bekannte humane Homologe schließen drei KuDoms von LACI (WUNT88, GIRA89, NOV089), zwei KuDoms des Inter-α-Trypsin-Inhibitors, APP-I (KIDO88), eine KuDom aus Kollagen, und drei KuDoms von TFPI-2 (SPRE94) ein.

LACI

[0028] Der Lipoprotein-assoziierte Koagulationsinhibitor (LACI) ist ein humanes Serum-Phosphoglycoprotein mit einem Molekulargewicht von 39 kDa (Aminosäuresequenz in Tabelle 1), enthaltend drei KuDoms. Wir bezeichnen hierin das Protein als LACI und die Kunitz-Domänen hiervon als LACI-K1 (Reste 50 bis 107), LACI-K2 (Reste 121 bis 178) und LACI-K3 (213 bis 270). Die cDNA-Sequenz von LACI ist in WUNT88 berichtet. GIRA89 berichten von Mutationsstudien, in welchen die P1-Reste einer jeden der drei KuDoms verändert wurden. LACI-K1 inhibiert Faktor VIIa (F. VII_a), wenn F.VII_a mit Gewebefaktor komplexiert ist und LACI-K2 inhibiert Faktor X_a. Es ist nicht bekannt, ob LACI-K3 irgendetwas inhibiert. Weder LACI noch eine der KuDoms von LACI ist ein potenter Plasmakallikreininhibitor.

[0029] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind KuDoms im Wesentlichen homolog mit LACI-K1, aber sie unterscheiden sich in einer Weise, die starke Plasmakallikrein-inhibitorische Aktivität, wie unten ausgeführt, verleiht. Andere erfindungsgemäße KuDoms sind homolog zu anderen natürlich vorkommenden KuDoms, insbesondere zu anderen humanen KuDoms. Zur Verwendung in Menschen werden die erfindungsgemäßen Proteine äußerst ähnlich zu der einen oder anderen humanen KuDom entwickelt, um das Risiko zu verringern, eine Immunantwort hervorzurufen.

[0030] Die Variierung eines Proteins wird typischerweise durch Herstellen einer entsprechenden variierten Mischung von DNA (mit variablen Kodons, variable Reste kodierend), Klonieren in geeignete Vektoren und Exprimieren der DNA in geeigneten Wirtszellen erreicht. Für ein gegebenes Proteinmolekül der Bibliothek ist die Wahl der Aminosäure für jeden variablen Rest, unter Berücksichtigung der obigen Voraussetzungen, zufällig, nämlich das Ergebnis des zufälligen Ereignisses, welche DNA dieses Proteinmolekül exprimiert.

ERSTE LACI-K1-BIBLIOTHEK GESCREENT AUF pKA-BINDUNG

[0031] Die Anmelder haben eine erste große Bibliothek von LACI-K1-Domänen (das Muster der Variierung ist in Tabelle 21 gezeigt) mit den in Tabelle 3 gezeigten Ergebnissen gescreent. In Tabelle 3 sind „Bibliotheksreste" jene, denen nach dem Zufallsprinzip erlaubt wurde, an dieser Position in der Bibliothek aufzutreten, und „bevorzugte Reste" sind jene, die an dieser Position in mindestens einer von 10 Varianten, die als an humanes Kallikrein bindend identifiziert wurden, erscheinen.

[0032] An den Resten 13, 16, 17, 18, 31 und 32 ist die Selektion sehr stark. An Position 34 ist die Selektion für entweder SER oder THR ziemlich stark. An Position 39 ist die Selektion für GLY stark. Position 19 scheint ziemlich tolerant zu sein.

[0033] Es sollte verstanden werden, dass die Anmelder nicht alle positiven Isolate in dieser oder anderen der hierin offenbarten Bibliotheken sequenziert haben, dass einige mögliche mutante Proteine nicht in der Bibliothek in nachweisbaren Mengen vorhanden gewesen sein könnten, und dass an einigen Positionen von nur einigen der möglichen Aminosäuren beabsichtigt war, in die Bibliothek aufgenommen zu werden.

ZWEITE BIBLIOTHEK VON LACI-K1 und SELEKTION NEUER KALLIKREIN-INHIBITOREN

[0034] Die Anmelder stellten eine zweite LACI-K1-Bibliothek wie in Tabelle 750 gezeigt her. Diese Bibliothek nutzt die Beobachtungen der ersten Selektion und erlaubt Variabilität an den Positionen 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19 und 21. Die Reste an Positionen 34 und 39 wurden auf S_{34} und G_{39} festgesetzt. Die Selektanten KK2/#1 bis KK2/#13, wie in Tabelle 2 gezeigt, wurden in der gleichen Weise wie in dem Beispiel-Abschnitt für das erste Screening beschrieben erhalten. Die Anmelder stellten die Proteine KK2/# 11 und KK2/# 13 in S. cerevisiae in dem Mata-System wie hierin beschrieben her. Vorläufige Messungen zeigen, dass diese Proteine sehr potente pKA-Inhibitoren mit K_i von weniger 300 pM und wahrscheinlich weniger als 100 pM sind.

[0035] Unter Verwendung der ausgewählten Sequenzen und Bindungsdaten der ausgewählten KuDoms können wir eine Anleitung für eine hochaffine pKA-inhibierende KuDom schreiben, die auf andere humane KuDom-Eltern angewendet werden kann. Erstens muss die KuDom die Erfordernisse in Tabelle 14 erfüllen. Die Substitutionen, die in Tabelle 15 gezeigt sind, verleihen wahrscheinlich einer jeden KuDom eine pKA-inhibitorische Aktivität von hoher Affinität. Folglich ist ein Protein, das eine Sequenz enthält, die eine KuDom ist, wie in Tabelle 14 gezeigt, und die an jeder der Positionen 12–21 und 32–39 einen Aminosäuretyp enthält, wie in Tabelle 15 für diese Position gezeigt, wahrscheinlich ein potenter Inhibitor von humaner pKA. Weiter bevorzugt hätte das Protein einen Aminosäuretyp wie in Tabelle 15 für alle in Tabelle 15 aufgeführten Positionen gezeigt. Um das Potenzial für eine Immunantwort zu reduzieren, sollte man die eine oder andere humane KuDom als Elternprotein verwenden, um die Sequenz außerhalb der Binderegion zu erhalten.

[0036] Es ist wahrscheinlich, dass ein Protein, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die im Wesentlichen zu einem aus KK2/#13, KK2/#11 oder KKII/3#6 von Rest 5 bis einschließlich Rest 55 (wie in Tabelle 2 gezeigt) homolog ist und mit einer von KK2/#13, KK2/#11 oder KKII/3#6 bei Positionen 13–19, 31, 32, 34 und 39 identisch ist, humane pKA mit einem K_i von 5 nM oder weniger inhibieren wird. KK2/#13, KK2/#11 und KKII/3#6 unterscheiden sich von LACI-K1 jeweils an den Positionen 10, 8 und 7. Es ist nicht eindeutig, dass diese Substitutionen gleich wichtig bei der Förderung der pKA-Bindung und -Inhibition sind. Von den bekannten aufgeführten pKA-Inhibitoren kann man eine Reihe von Molekülen herstellen, die sukzessive in LACI-K1 zurückverwandelt werden. Es wird erwartet, dass die Moleküle weniger Affinität für pKA zeigen werden, aber auch weniger Potenzial für Antigenizität. Ein Fachmann kann ein Protein ausreichender Potenz und geringer Immunogenität aus dieser Sammlung auswählen. Es ist auch möglich, dass Substitutionen in einem der aufgeführten pKA-Inhibitoren durch Aminosäuren, die sich von LACI-K1 unterscheiden, die Immunogenität reduzieren, ohne die Affinität für pKA in einem solchen Ausmaß zu reduzieren kann, das das Protein zur Verwendung als Wirkstoff ungeeignet macht.

ENTWICKELTE KuDom-PKA-Inhibitoren

[0037] Hierin nachfolgend wird „DKI" einen „entwickelten PKA-Inhibitor" (Designed PKA-Inhibitor) bedeuten, das heißt KuDoms, die Aminosäuresequenzinformationen aus der SPI-Reihe von Molekülen, insbesondere KK2/#13, KK2/#11 und KKII/3#6, aufgenommen haben. Die Sequenzen einiger DKIs und ihrer Elternproteine sind in Tabelle 2 angegeben. Hierin nachfolgend bedeutet der Ausdruck „die Mutationen $XnnY_1$, $XnnY_2$, ... werden möglicherweise nicht benötigt", dass jede der Mutationen getrennt voneinander für nicht erforderlich befunden werden könnte. Das heißt, die Liste soll nicht als ein Block genommen werden, der zusammen angewandt wird, sondern als eine Liste von Dingen, die getestet werden soll. Genauso sind die Listen von zusätzlichen Mutationen einzeln zu testen.

[0038] Das Protein DKI-1.2.1 basiert auf humanem LACI-K2 und ist in Tabelle 2 gezeigt. Die Mutationen P11G, I13R, Y17A, I18H, T19P, Y21W, R32E, K34S und L39G verleihen wahrscheinlich hohe Affinität für pKA. Einige dieser Substitutionen sind möglicherweise nicht notwendig; insbesondere P11G und T19P könnten nicht erforderlich sein. Andere Mutationen, die die pKA-Affinität verbessern könnten, schließen E9A, D10E, G16A, Y21F und L39E ein.

[0039] Das Protein DKI-1.3.1 (Tabelle 2) basiert auf humanem LACI-K3. Die Mutationen R11D, L13P, N17A, E18H, N19P, R31E, K34S und S36G sind beabsichtigt, um hohe Affinität für pKA zu bewirken. Einige dieser Substitutionen könnten nicht erforderlich sein; insbesondere N19P könnte nicht erforderlich sein. Andere Veränderungen, die den K_D verbessern könnten, schließen D10E, F21 W und G39E ein.

[0040] Das Protein DKI-2.1 (Tabelle 2) basiert auf der humanen Kollagen α3 KuDom. Die Mutationen D16A, F17A, I18H, R32E und W34S verleihen wahrscheinlich hohe Affinität für pKA. Einige dieser Substitutionen könnten nicht erforderlich sein; insbesondere R32E könnte nicht erforderlich sein. Andere Mutationen, die die pKA-Affinität verbessern könnten, schließen K9A, D10E, D16G, K20R, R32T, W34V und G39E ein.

[0041] DKI-3.1.1 (Tabelle 2) ist abgeleitet von der humanen TFPI-2 Domäne 1. Die Austausche Y11G, L17A, L18H, R31E und L34S verleihen wahrscheinlich hohe Affinität für pKA. Die Mutation L34S könnte nicht erforderlich sein. Andere Mutationen, die die pKA-Bindung fördern könnten, schließen Y21 W, Y21F, Q32E, L34T, L34I und E39G ein.

[0042] DKI-3.2.1 (Tabelle 2) ist abgeleitet von der humanen TFPI-2 Domäne 2. Diese Elterndomäne enthält Insertionen nach Rest 9 (einen Rest) und 42 (zwei Reste). Von den Mutationen E15R, G16A, S17A, T18H, E19P, K32T und F34V ist beabsichtigt, dass sie Affinität für pKA verleihen. Wenn man einen pKA-Inhibitor auf Basis der TFPI-Domäne 2 benötigt, ist ein bevorzugter Weg, eine Bibliothek von Domänen herzustellen, die die angegebenen Substitutionen und viele andere erlauben, und dann die Bindemoleküle auszuwählen.

[0043] DKI-3.3.1 (Tabelle 2) ist abgeleitet von der humanen TFPI-2 Domäne 3. Die Substitutionen L13H, S15R und N17A verleihen wahrscheinlich hohe Affinität für pKA. Andere Mutationen, die die pKA-Bindung fördern könnten, schließen D10E, T19Q, Y21W, T36G und G39E ein.

[0044] DKI-4.1.1 (Tabelle 2) ist aus humanem ITI-K1 durch die Mutationen von S10D, M15R, M17A, T18H, Q34S und M39G. Die Mutationen M39G und Q34V könnten nicht erforderlich sein. Andere Mutationen, die die pKA-Bindung fördern sollten, schließen ein: G16A, M17N, S19Q, Y21W und Y21F.

[0045] DKI-4.2.1 (Tabelle 2) ist aus humanem ITI-K2 durch die Mutationen V10D, R11D, F17A, I18H, V31E, L32E, P34S und Q39E. Die Mutationen V31E, L32E und Q39E könnten nicht erforderlich sein. Andere Mutationen, die die pKA-Bindung fördern sollten, schließen ein: V10E, Q19P, L20R, W21F, P34I und Q39G. DKI-4.2.2 hat acht Mutationen: V10D, R11D, F17A, I18H, L20R, V31E, L32E und P34S.

[0046] DKI-5.1 ist von humanem APP-I (auch bekannt als Protease Nexin-II) durch die Mutationen M17A, I18H, S19P, A31E und P32E abgeleitet und ist wahrscheinlich ein potenter pKA-Inhibitor. Die Mutationen S19P, A31E und P32E könnten nicht erforderlich sein. Andere Mutationen, die die pKA-Bindung fördern könnten, schließen T11D ein.

[0047] DKI-6.1 ist aus HKI B9 KuDom (NORR93) durch fünf Substitutionen abgeleitet: K11D, Q15R, T16A, M17A, M18H, T19P und L32E. DKI-6.1 ist wahrscheinlich ein potenter pKA-Inhibitor. Die Mutationen L32E und T19P könnten nicht erforderlich sein.

[0048] Obwohl BPTI kein besonders guter pKA-Inhibitor ist, könnte es zu einem solchen gemacht werden. DKI-7.1 ist von BPTI durch die Mutationen Y10E, K15R, R17A, I18H, I19P, Q31E, T32E und R39E abgeleitet, die wahrscheinlich die Affinität für pKA erhöhen. Die Mutationen Y10E, K15R, I19P, Q31E, T32E und R39E könnten nicht erforderlich sein; die wirklich wichtigen Mutationen sind R17A und I18H.

MODIFIKATION VON KUNITZ-DOMÄNEN

[0049] KuDoms sind ziemlich klein; falls dies ein pharmakologisches Problem darstellen sollte, wie z.B. eine sehr schnelle Eliminierung aus dem Kreislauf, könnten zwei oder mehr solcher Domänen zusammengefügt werden. Ein bevorzugter Linker ist eine Sequenz einer oder mehrerer Aminosäuren. Ein bevorzugter Linker ist einer, der zwischen sich wiederholenden Domänen eines humanen Proteins gefunden wird, insbesondere die Linker, die in humanen BPTI-Homologen gefunden werden, von denen einer zwei Domänen (BALD85, ALBR83a, ALBR83b) und ein anderer drei (WUNT88) besitzt. Die Peptidlinker haben den Vorteil, dass das gesamte Protein durch rekombinante DNA-Techniken exprimiert werden kann. Es ist auch möglich, einen Nicht-Peptidyl-Linker zu verwenden, wie z.B. einen solchen, der gewöhnlich verwendet wird, um immunogene Konjugate zu bilden. Ein alternatives Mittel zur Erhöhung der Verweildauer von BPTI-ähnlichen KuDoms im Serum ist, sie an Polyethylenglycole zu binden, die so genannte PEGylierung (DAVI79).

WEGE ZUR VERBESSERUNG DER SPEZIFITÄT VON, ZUM BEISPIEL, KKII/3#7, KK2/#11 UND KK2/#13 FÜR PLASMA-KALLIKREIN:

[0050] Da wir einen großen Teil der Oberfläche von KKII/3#6, KK2/#11 und KK2/#13 komplementär zur Oberfläche von pKA gemacht haben, ist R_{15} für eine spezifische Bindung an pKA nicht wesentlich. Viele Enzyme in der Gerinnungs- und fibrinolytischen Kaskade schneiden vorzugsweise nach Arg oder Lys. Das Nichtbesitzen eines basischen Restes an der Position P1 könnte eine größere Spezifität verursachen. Die Variante KKII/3#7-K15A (gezeigt in Tabelle 27) mit einem ALA an P1 ist wahrscheinlich ein guter pKA-Inhibitor und könnte eine höhere Spezifität für pKA relativ zu anderen Proteasen als KKII/3#7 haben. Die Affinität von KKII/3#7-K15A für pKA ist wahrscheinlich niedriger als die Affinität von KKII/3#7 für pKA, aber der Verlust an Affinität für andere Arg/Lys-bevorzugende Enzyme ist wahrscheinlich größer und in vielen Anwendungen ist die Spezifität wichtiger als die Affinität. Andere Mutanten, die wahrscheinlich eine gute Affinität und sehr hohe Spezifität haben, schließen KK2/#13-R15A und KK2/#11-R15S ein. Dieser Ansatz könnte auch auf andere hochaffine pKA-Inhibitoren angewandt werden.

ART DER HERSTELLUNG

[0051] Die erfindungsgemäßen Proteine können durch jedes übliche Verfahren hergestellt werden, einschließlich

(a) nicht-biologische Synthese durch sequenzielles Koppeln der Aminosäurebestandteile,
(b) Herstellung durch rekombinante DNA-Techniken in einer geeigneten Wirtszelle, und
(c) Entfernen unerwünschter Sequenzen aus LACI und Koppeln von synthetischen Austauschsequenzen.

[0052] Die hierin offenbarten Proteine werden vorzugsweise rekombinant in einem geeigneten Wirt, wie z.B. Bakterien der Genera Bacillus, Escherichia, Salmonella, Erwinia, und Hefen der Genera Hansenula, Kluyveromyces, Pichia, Rhinosporidium, Saccharomyces und Schizosaccharomyces, oder kultivierten Säugerzellen, wie COS-1, hergestellt. Die weiter bevorzugten Wirte sind Mikroorganismen der Spezies Pichia pastoris, Bacillus subtilis, Bacillus brevis, Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli und Yarrowia lipolytica. Jeder Promotor, regulierbar oder konstitutiv, der in dem Wirt funktional ist, kann verwendet werden, um die Genexpression zu kontrollieren.

[0053] Vorzugsweise werden die Proteine sezerniert. Am meisten bevorzugt werden die Proteine aus konditioniertem Medium erhalten. Es ist nicht notwendig, dass die hierin beschriebenen Proteine sezerniert werden. Die Sekretion ist der bevorzugte Weg, da die Proteine mit höherer Wahrscheinlichkeit korrekt gefaltet werden, in konditioniertem Medium mit weniger Kontaminanten produziert werden können und weniger wahrscheinlich für Wirtszellen toxisch sind. Die Sekretion ist nicht erforderlich.

[0054] Wo es nicht einen bestimmten Grund gibt, Glycogruppen einzubeziehen, ziehen wir Proteine vor, die so entwickelt wurden, dass N-geknüpfte Glycosylierungsstellen fehlen, um das Potenzial für Antigenizität von Glycogruppen zu reduzieren, und so dass äquivalente Proteine in einer großen Vielzahl von Organismen exprimiert werden können, einschließlich: 1) E. coli, 2) B. subtilis, 3) P. pastoris, 4) S. cerevisiae und 5) Säugerzellen.

[0055] Es existieren einige Mittel, mit denen das Problem, dass Wirtszellen Proteasen herstellen, die das rekombinante Produkt abbauen, reduziert werden kann; siehe z.B. BANE90 und BANE91. VAND92 berichtet, dass die Überexpression der B. subtilis-Signalpeptidase in E. coli zu einer erhöhten Expression eines heterologen Fusionsproteins führt. ANBA88 berichtet, dass die Zugabe von PMSF (einem Serinprotease-Inhibitor) zu dem Kulturmedium die Ausbeute eines Fusionsproteins verbesserte.

[0056] Andere Faktoren, die die Produktion dieser und anderer hierin offenbarter Proteine beeinflussen könnten, schließen ein: 1) Kodon-Verwendung (Optimierung der Kodons für den Wirt ist bevorzugt), 2) Signalsequenz, 3) Aminosäuresequenz an den beabsichtigten Prozessierungsstellen, Vorhandensein und Lokalisation von Prozessierungsenzymen, Deletion, Mutation oder Inhibition verschiedener Enzyme, die das gentechnisch hergestellte Produkt verändern oder abbauen könnten und Mutationen, die den Wirt permissiver für die Sekretion machen (permissive Sekretionswirte sind bevorzugt).

[0057] Nachschlagewerke für die allgemeinen Prinzipien der rekombinanten DNA-Technologie schließen ein Watson et al., Molecular Biology of the Gene, Band I und II, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, CA (1987); Darnell et al., Molecular Cell Biology, Scientific American Books, Inc., New York, N.Y. (1986); Lewin, Genes II, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1985); Old et al., Principles of Gene Mani-

pulation: An Introduction to Genetic Engineering, 2. Auflage, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989); und Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, NY, (1987, 1992). Diese Referenzen werden hierin vollständig durch Bezugnahme aufgenommen, wie dies für alle hierin zitierten Referenzen gilt.

HERSTELLUNG VON PEPTIDEN

[0058] Die chemische Polypeptidsynthese ist ein sich schnell entwickelndes Gebiet der Wissenschaft und Verfahren von Festphasen-Polypeptidsynthese sind in den folgenden Referenzen gut beschrieben, die hierdurch vollständig durch Bezugnahme aufgenommen werden: (Merrifield, J Amer Chem Soc 85: 2149–2154 (1963); Merrifield, Science 232: 341–347 (1986); Wade et al., Biopolymers 25: 521–537 (1986); Fields, Int J Polypeptide Prot Res 35: 161 (1990); MilliGen Report Nrn. 2 und 2a, Millipore Corporation, Bedford, MA, 1987) Ausubel et al., supra, und Sambrook et al., supra. Tan und Kaiser (Biochemistry, 1977, 16: 1531–41) synthetisierten vor achtzehn Jahren BPTI und ein Homolog.

[0059] Wie im Stand der Technik bekannt, beziehen solche Verfahren das Blockieren und Schützen reaktiver funktioneller Gruppen, wie freier Amino-, Carboxy- und Thiogruppen, ein. Nach der Bildung der Polypeptidbindung werden die Schutzgruppen entfernt. Folglich benötigt die Zugabe jedes Aminosäurerests einige Reaktionsschritte zum Schützen und Entschützen. Gegenwärtige Verfahren benützen Festphasensynthese, wobei die C-terminale Aminosäure kovalent an ein unlösliches Harzpartikel gebunden wird, das gefiltert werden kann. Die Reaktanten werden durch Waschen der Harzpartikel mit geeigneten Lösungsmitteln unter Verwendung eines automatisierten Geräts gewaschen. Verschiedene Verfahren, einschließlich des „tBoc"-Verfahrens und des „Fmoc"-Verfahrens sind im Stand der Technik gut bekannt. Siehe unter anderem Atherton et al., J Chem Soc Perkin Trans 1: 538–546 (1981) und Sheppard et al., Int J Polypeptide Prot Res 20: 451–454 (1982).

TESTS FÜR PLASMA-KALLIKREIN-BINDUNG UND -INHIBITION

[0060] Jedes geeignete Verfahren zum Testen der erfindungsgemäßen Verbindungen kann verwendet werden. Scatchard (Ann NY Acad Sci (1949) 51: 660–669) beschrieb ein klassisches Verfahren zum Messen und Analysieren der Bindung, welches auf Proteinbindung anwendbar ist. Dieses Verfahren benötigt ein relativ reines Protein und die Fähigkeit, zwischen gebundenem und ungebundenem Protein zu unterscheiden.

[0061] Ein zweites geeignetes Verfahren zum Messen der K_D besteht darin, die inhibitorische Aktivität gegen das Enzym zu messen. Wenn der zu messende K_D im Bereich zwischen 1 nM bis 1 μM liegt, benötigt dieses Verfahren chromogene oder fluorogene Substrate und mehrere 10 Mikrogramm bis Milligramm eines relativ reinen Inhibitors. Für die erfindungsgemäßen Proteine mit einem K_D im Bereich von 5 nM bis 50 pM reichen Nanogramm- bis Mikrogramm-Mengen des Inhibitors. Bei Verwendung dieses Verfahrens kann die Kompetition zwischen dem Inhibitor und dem Enzymsubstrat einen gemessenen K_i ergeben, das höher als der wahre K_i-Wert ist. Die hierin berichteten Messungen sind nicht korrigiert, da die Korrektur sehr klein wäre und jede Korrektur den K_i reduzieren würde. Wir benutzen hier den gemessenen K_i als direktes Maß für den K_D.

[0062] Ein drittes Verfahren zum Bestimmen der Affinität eines Proteins für ein zweites Material besteht darin, dass das Protein auf einer genetischen Verpackung wie M13 präsentiert wird und die Fähigkeit des Proteins, sich an ein immobilisiertes „zweites Material" anzulagern, gemessen wird. Dieses Verfahren ist hoch empfindlich, da genetische Verpackungen amplifiziert werden können. Wir erhalten zumindest semiquantitative Werte für die Bindungskonstanten durch Verwendung eines pH-Stufengradienten. Inhibitoren bekannter Affinität für die Protease werden verwendet, um Standardprofile zu erstellen, gegen welche andere von Phagen präsentierte Inhibitoren beurteilt werden. Jedes andere geeignete Verfahren zum Messen der Proteinbindung kann verwendet werden.

[0063] Vorzugsweise haben die erfindungsgemäßen Proteine einen K_D für pKA von höchstens ungefähr 5 nM, mehr bevorzugt höchstens ungefähr 300 pM und am meisten bevorzugt 100 pM oder weniger. Vorzugsweise ist die Bindung inhibitorisch, so dass der K_i mit dem K_D gleich ist. Der K_i von KKII/3#6 ist ungefähr 300 pM und die K_i-Werte von KK2/#11 und KK2/#13 sind weniger als 300 pM und wahrscheinlich weniger als 100 pM.

PHARMAZEUTISCHE VERFAHREN UND ZUBEREITUNGEN

[0064] Ein bevorzugtes Subjekt dieser Erfindung ist ein Säuger. Die Erfindung ist insbesondere zur Behandlung von Menschen verwendbar, aber auch für veterinärmedizinische Anwendungen geeignet.

[0065] Hierin schließt „Schutz" die „Vorbeugung", „Unterdrückung" und „Behandlung" ein. „Vorbeugung" bezieht die Verabreichung eines Wirkstoffs vor der Induktion einer Krankheit ein. „Unterdrückung" bezieht die Verabreichung eines Wirkstoffs vor dem klinischen Auftreten einer Krankheit ein. „Behandlung" bezieht die Verabreichung eines Wirkstoffs nach Auftreten einer Krankheit ein.

[0066] In der Human- und Veterinärmedizin kann es bisweilen unmöglich sein, zwischen „Vorbeugen" und „Unterdrücken" zu unterscheiden, da das/die induktive(n) Ereignisse) unbekannt oder latent sein kann/können oder der Patient erst nach dem Auftreten des/der induktiven Ereignisse/s untersucht wurde. Wir benutzen den Ausdruck „Prophylaxe" im Unterschied zu „Behandlung", um „Vorbeugen" und „Unterdrücken" einzubeziehen. Hierin schließt „Schutz" die „Prophylaxe" ein. Der Schutz muss nicht vollständig sein, um geeignet zu sein.

[0067] Die erfindungsgemäßen Proteine können durch jedes Mittel, systemisch oder topisch, verabreicht werden, um ein Subjekt vor einer Krankheit oder einem nachteiligen Zustand zu schützen. Zum Beispiel kann die Verabreichung einer solchen Zusammensetzung durch jede parenterale Route, durch Bolusinjektion oder sukzessive Perfusion erfolgen. Alternativ, oder gleichzeitig, kann die Verabreichung auf oralem Wege erfolgen. Eine geeignete Behandlungsweise umfasst das Verabreichen einer effektiven Menge des Proteins, verabreicht als einzelne Dosis oder als mehrere Dosen über einen Zeitraum von Stunden, Tagen, Monaten oder Jahren.

[0068] Die geeignete Dosis eines erfindungsgemäßen Proteins kann vom Alter, Geschlecht, Gesundheitszustand und dem Gewicht des Empfängers, der Art der gleichzeitigen Behandlung, falls vorhanden, der Häufigkeit der Behandlung und dem angestrebten Effekt abhängen. Allerdings kann die am meisten bevorzugte Dosierung an das einzelne Subjekt angepasst werden, wie es vom Fachmann verstanden und ohne übermäßiges Experimentieren durch Einstellung der Dosis auf im Stand der Technik bekannte Weise zu bestimmen sein wird.

[0069] Für Verfahren zum vorklinischen und klinischen Testen von Wirkstoffen, einschließlich Proteinen, siehe z.B. Berkow et al. Hrsg., The Merck Manual, 15. Auflage, Merck and Co., Rahway, N. J., 1987; Goodman et al., Hrsg., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, B. Auflage, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (1990); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3. Auflage, ADIS Press, LTD., Williams and Wilkins, Baltimore, MD, (1987); Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston (1985), wobei die Literaturstellen und die darin zitierten Literaturstellen hiermit durch Bezugnahme aufgenommen werden.

[0070] Zusätzlich zu einem hierin offenbarten Protein kann eine pharmazeutische Zusammensetzung pharmazeutisch geeignete Träger, Zusatz- oder Hilfsstoffe enthalten. Siehe z.B. Berker, supra, Goodman, supra, Avery, supra und Ebadi, supra.

IN-VITRO-DIAGNOSEVERFAHREN UND REAGENZIEN

[0071] Die erfindungsgemäßen Proteine können in vitro zu einer geeigneten Probe zugefügt werden, die Plasmakallikrein enthalten könnte, um vorhandene pKA zu messen. Um dieses zu tun, muss der Test ein „Signal-produzierendes System" (Signal Producing System, SPS) einschließen, welches ein detektierbares Signal bereitstellt, das von der Menge der vorhandenen pKA abhängt. Das Signal kann visuell oder mittels Instrumenten bestimmt werden. Mögliche Signale schließen die Produktion von farbigen, fluoreszierenden oder lumineszierenden Produkten, eine Veränderung der Eigenschaften der Absorption oder Emission von Strahlung durch einen Testbestandteil oder ein Testprodukt und die Präzipitation oder Agglutination eines Bestandteils oder Produkts ein.

[0072] Der Bestandteil des SPS, welcher am engsten mit dem diagnostischen Reagens assoziiert ist, wird „Marker" genannt. Ein Marker kann z.B. ein Radioisotop, ein Fluorophor, ein Enzym, ein Co-Enzym, ein Enzymsubstrat, eine elektronendichte Verbindung oder ein agglutinierbares Teilchen sein. Ein radioaktives Isotop kann unter Verwendung von beispielsweise einem γ-Counter oder einem Szintillationscounter oder durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Isotope, die besonders geeignet sind, sind ^{3}H, ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, ^{14}C und vorzugsweise ^{125}I. Es ist auch möglich, eine Verbindung mit einer fluoreszierenden Verbindung zu markieren. Wenn die fluoreszenzmarkierte Verbindung Licht mit der geeigneten Wellenlänge ausgesetzt wird, kann ihre Anwesenheit nachgewiesen werden. Zu den am häufigsten verwendeten Fluoreszenz-Markierungsverbindungen gehören Fluorescein-Isothiocyanat, Rhodamin, Phycoerythrin, Phycocyanin, Allophycocyanin, o-Phthaldehyd und Fluorescamin. Alternativ können Fluoreszenz-emittierende Metalle, wie ^{125}Eu oder andere Lanthanide, an das Bindungsprotein unter Verwendung von Gruppen, die solche Metalle chelieren, wie Diethlyentriaminpentaessigsäure oder Ethylendiamintetraessigsäure, angelagert werden. Die Proteine können auch

nachweisbar durch Koppeln an chemilumineszierende Verbindungen, wie Luminol, Isoluminol, theromatischer (engl.: theromatic) Acridiniumester, Imidazol, Acridiniumsalz und Oxalatester, markiert sein. Ebenso kann eine biolumineszierende Verbindung, wie Luciferin, Luciferase und Aequorin, zur Markierung des Bindungsproteins verwendet werden. Die Gegenwart eines biolumineszierenden Proteins wird durch Detektieren des Vorhandenseins von Lumineszenz bestimmt. Enzymmarker, wie Meerrettichperoxidase und alkalische Phosphatase, sind bevorzugt.

[0073] Es gibt zwei Grundtypen von Tests: heterogene und homogene. In heterogenen Tests beeinflusst die Bindung des Affinitätsmoleküls an den Analyten nicht den Marker; daher muss zur Bestimmung der Menge des Analyten der gebundene Marker von dem freien Marker getrennt werden. In homogenen Tests beeinflusst die Wechselwirkung sehr wohl die Aktivität des Markers, und der Analyt kann ohne Trennung gemessen werden.

[0074] Im Allgemeinen kann ein Kallikrein-Bindungsprotein (KBP) diagnostisch auf die gleiche Weise verwendet werden, in der ein anti-pKA-Antikörper verwendet wird. So kann es in Abhängigkeit von dem Testformat verwendet werden, um pKA oder, durch kompetitive Inhibition, andere Substanzen, die pKA binden, in einem Test zu untersuchen.

[0075] Die Probe wir normalerweise eine biologische Flüssigkeit, wie z.B. Blut, Urin, Lymphe, Samen, Milch, Liquor cerebrospinalis, oder ein Derivat hiervon, oder ein biologisches Gewebe, z.B. ein Gewebestück oder -homogenat, sein. Die Probe kann jede beliebige sein. Wenn die Probe eine biologische Flüssigkeit oder ein biologisches Gewebe ist, kann sie/es einem Menschen oder anderen Säuger, Vertebraten oder Tier, oder einer Pflanze entnommen werden. Die bevorzugte Probe ist Blut oder eine Fraktion oder ein Derivat hiervon.

[0076] In einer Ausführungsform wird das pKA-bindende Protein (KBP) immobilisiert, und dem pKA in der Probe wird erlaubt, mit einer bekannten Menge eines markierten oder spezifisch markierbaren pKA-Analogs zu kompetitieren. Das „pKA-Analog" ist ein Molekül, das in der Lage ist, mit pKA um die Bindung an dem KBP, welches pKA selbst einschließt, zu kompetitieren. Es kann bereits markiert sein oder anschließend durch spezifische Bindung des Markers an eine Gruppe, die das pKA-Analog von pKA unterscheidet, markiert werden. Die Phasen werden getrennt und das markierte pKA-Analog in einer Phase wird quantifiziert.

[0077] In einem „Sandwich-Test" werden sowohl ein unlöslich gemachtes pKA-bindendes Mittel (pKA-binding agent, KBA) als auch ein markiertes KBA eingesetzt. Der pKA-Analyt wird durch das unlöslich gemachte KBA eingefangen und durch das markierte KBA mit einem Tag versehen, was einen tertiären Komplex bildet. Die Reagenzien können in jeder Reihenfolge zu der Probe zugefügt werden. Die KBAs können gleich oder verschieden sein und nur ein KBA muss ein erfindungsgemäßes KBP sein (das andere kann z.B. ein Antikörper sein). Die Menge an markiertem KBA in dem tertiären Komplex ist direkt proportional zu der Menge des pKA in der Probe.

[0078] Die zwei oben beschriebenen Ausführungsformen sind beide heterogene Tests. Ein homogener Test erfordert nur, dass der Marker durch Bindung des KBP an pKA beeinflusst wird. Der pKA-Analyt kann als sein eigener Marker fungieren, wenn ein pKA-Inhibitor als ein diagnostisches Reagens verwendet wird.

[0079] Ein Marker kann direkt oder indirekt (z.B. durch einen markierten anti-KBP-Antikörper), kovalent (z.B. mit SPDP) oder nicht-kovalent, an das pKA-Bindungsprotein konjugiert werden, um ein diagnostisches Mittel herzustellen. In ähnlicher Weise kann das pKA-Bindungsprotein an einen Festphasenträger konjugiert werden, um ein diagnostisches Festphasen-(„Fänger")-Reagens zu bilden. Geeignete Träger schließen Glas, Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Dextran, Nylon, Amylasen und Magnetit ein. Der Träger kann für die Zwecke dieser Erfindung bis zu einem gewissen Grad löslich oder unlöslich sein. Das Trägermaterial kann jede Struktur besitzen, solange das gekoppelte Molekül in der Lage ist, pKA zu binden.

IN-VIVO-DIAGNOSTISCHE VERWENDUNGEN

[0080] Eine Kunitz-Domäne, die sehr fest an pKA bindet, kann für In-vivo-Bildgebung verwendet werden. Diagnostische Bildgebung von Krankheitsherden wurde als eine der größten kommerziellen Chancen für monoklonale Antikörper angesehen, aber diese Chance wurde nicht umgesetzt. Trotz beachtlicher Anstrengungen wurden nur zwei auf monoklonalen Antikörpern basierende Bildgebungsmittel zugelassen. Die enttäuschenden Ergebnisse, die mit monoklonalen Antikörpern erzielt wurden, sind in großem Maße begründet in:

i) Ungeeignete Affinität und/oder Spezifität;
ii) Schlechte Penetration zu den Zielstellen;
iii) Langsame Beseitigung (Clearance) von Nicht-Zielstellen;

iv) Immunogenität (die meisten sind murin); und
v) Hohe Produktionskosten und geringe Stabilität.

[0081] Diese Beschränkungen führten bei den meisten auf dem Gebiet der diagnostischen Bildgebung dazu, dass sie anfingen, Bildgebungsmittel auf Peptidbasis zu entwickeln. Während diese potenziell die Probleme der schlechten Penetration und langsamen Beseitigung lösen, besitzen Bildgebungsmittel auf Peptidbasis wahrscheinlich keine adäquate Affinität, Spezifität und In-vivo-Stabilität, um in den meisten Anwendungen brauchbar zu sein.

[0082] Gentechnisch hergestellte Proteine sind in einzigartiger Weise für die Anforderungen an ein Bildgebungsmittel geeignet. Insbesondere die außergewöhnliche Affinität und Spezifität, die durch gentechnisch veränderte kleine, stabile Proteindomänen humanen Ursprungs mit bekannten In-vivo-Beseitigungsraten und Mechanismen erhältlich sind, verbinden sich und stellen frühere, verlässlichere Ergebnisse, weniger Toxizität/Nebenwirkungen, geringere Herstellungs- und Lagerkosten und größere Einfachheit bei der Markerherstellung bereit. In der Tat sollte es möglich sein, das Ziel einer Bildgebung in Echtzeit mit gentechnischen Proteinbildgebungsmitteln zu erreichen. So kann ein Kallikrein-bindendes Protein, z.B. KKII/3#6, KK2/#11 und KK2/#13, zur Lokalisation von Stellen mit sehr hoher pKA-Aktivität verwendet werden.

[0083] Radioaktiv markierte Bindungsproteine können an einen Menschen oder ein Tier verabreicht werden. Die Verabreichung erfolgt typischerweise durch Injektion, z.B. intravenös oder arteriell, oder durch andere Mittel der Verabreichung, in einer Menge, die ausreicht, um anschließend eine dynamische und/oder statische Bildgebung unter Verwendung geeigneter Strahlungsnachweisgeräte zu ermöglichen. Die Dosierung entspricht der kleinsten Menge, die in der Lage ist, ein diagnostisch wirksames Bild bereitzustellen, und kann durch im Stand der Technik übliche Mittel unter Verwendung bekannter Strahlungsbildgebungsmittel als Richtschnur ermittelt werden.

[0084] Typischerweise wird die Bildgebung am gesamten Körper des Subjekts oder an dem Teil des Körpers oder dem Organ durchgeführt, der/das für den zu untersuchenden Zustand oder die Krankheit relevant ist. Das radioaktiv markierte Bindungsprotein wird angereichert. Die Menge des angereicherten radioaktiv markierten Bindungsproteins zu einem bestimmten Zeitpunkt in den relevanten Zielorganen kann dann quantifiziert werden.

[0085] Ein besonders geeignetes Strahlungsnachweisgerät ist eine Szintillationskamera, wie eine γ-Kamera. Das Nachweisgerät in der Kamera nimmt den radioaktiven Zerfall wahr und zeichnet ihn auf (und digitalisiert ihn wahlweise). Die digitalisierte Information kann dann auf jede geeignete Weise analysiert werden, von denen viele im Stand der Technik bekannt sind. Zum Beispiel kann bei einer Zeit-Aktivitäts-Analyse die Aufnahme durch Beseitigung des radioaktiv markierten Bindungsproteins durch die Zielorgane über die Zeit dargestellt werden.

[0086] Verschiedene Faktoren werden bei der Auswahl eines geeigneten Radioisotops in Betracht gezogen. Das Isotop wird ausgewählt: um eine gute Qualität der Auflösung bei der Bildgebung zu erlauben, um zu Diagnosezwecken bei Mensch und Tier sicher zu sein und vorzugsweise, um eine kurze Halbwertzeit zu besitzen, damit die Menge der Strahlung, der der Körper ausgesetzt wird, reduziert wird. Das verwendete Radioisotop sollte vorzugsweise pharmakologisch inert sein und die verabreichten Mengen sollten keine wesentliche physiologische Wirkung haben. Das Bindungsprotein kann mit verschiedenen Iodisotopen radioaktiv markiert sein, z.B, ^{123}I, ^{125}I oder ^{131}I (siehe zum Beispiel US-Patent 4,609,725). Die Menge der Markierung muss geeigneterweise überwacht werden.

[0087] In Anwendungen am Menschen kann es wünschenswert sein, andere Radioisotope als ^{125}I zur Markierung zu verwenden, um die dosimetrische Gesamtexposition auf den Körper zu reduzieren und die Nachweisbarkeit des markierten Moleküls zu optimieren. Im Hinblick auf die leichte klinische Verfügbarkeit für den Einsatz im Menschen sind als bevorzugte Radiomarker eingeschlossen: ^{99m}Tc, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{90}Y, ^{111}In, ^{113m}In, ^{123}I, ^{186}Re, ^{188}Re oder ^{211}At. Das radioaktiv markierte Protein kann durch verschiedene Verfahren hergestellt werden. Diese schließen beispielsweise Radiohalogenierung durch das Chloramin-T- oder Lactoperoxidaseverfahren und anschließende Reinigung durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie ein, siehe z.B. Gutkowska et al. in „Endocrinology and Metabolism Clinics of America: (1987) 16 (1): 183. Andere Verfahren zur radioaktiven Markierung können verwendet werden, wie z.B. IODOBEADS™.

[0088] Ein radioaktiv markiertes Protein kann durch jedes Verfahren verabreicht werden, das das aktive Mittel dazu befähigt, den Wirkort des Mittels in einem Säuger zu erreichen. Da Proteine verdaut werden, wenn sie

oral verabreicht werden, würde für gewöhnlich parenterale Verabreichung, i.e. intravenös, subkutan, intramuskulär, verwendet werden, um die Absorption zu optimieren.

[0089] Hochaffinitäts-, Hochspezifitäts-Inhibitoren sind auch zur In-vitro-Diagnose von übermäßiger humaner pKA-Aktivität verwendbar.

Andere Verwendungen

[0090] Die erfindungsgemäßen Kallikrein-Bindungsproteine können auch verwendet werden, um Kallikrein aus einer Flüssigkeit, z.B. Blut, zu reinigen. Hierfür wird KBP vorzugsweise auf einem Träger immobilisiert. Solche Träger schließen diejenigen ein, die bereits als verwendbar zum Herstellen von Festphase-Diagnostikreagenzien genannt wurden.

[0091] Proteine können als Molekulargewichtsmarker als Referenz bei der Trennung und Reinigung von Proteinen verwendet werden. Es kann nötig sein, dass die Proteine denaturiert werden müssen, um als Molekulargewichtsmarker zu dienen. Eine zweite allgemeine Verwendbarkeit von Proteinen ist die Verwendung von hydrolysierten Proteinen als eine Nahrungsquelle. Proteine können auch verwendet werden, um die Viskosität einer Lösung zu erhöhen.

[0092] Die erfindungsgemäßen Proteine können sowohl für jeden der zuvor genannten Zwecke als auch für therapeutische und diagnostische Zwecke, wie dies ausführlicher weiter oben in der Beschreibung diskutiert wurde, verwendet werden.

BEISPIEL 1: KONSTRUKTION EINER ERSTEN LACI-K1-BIBLIOTHEK

[0093] Eine synthetische Oligonukleotidduplex mit NsiI- und MluI-kompatiblen Enden wurde in einen Elternvektor (LACI:III) kloniert, welcher zuvor mit den beiden oben genannten Enzymen geschnitten wurde. Das resultierende ligierte Material wurde durch Elektroporation in den XLIMR (F^-) Escherichia coli-Stamm transfiziert und auf Amp-Platten ausplattiert, um Phagen-bildende Amp^R-Kolonien zu erhalten. Das Variierungsschema für Phase 1 fokussiert sich auf den P1-Bereich und betrifft die Reste 13, 16, 17, 18 und 19. Es ermöglicht $6{,}6 \times 10^5$ verschiedene DNA-Sequenzen ($3{,}1 \times 10^5$ verschiedene Proteinsequenzen). Die erhaltene Bibliothek bestand aus $1{,}4 \times 10^6$ unabhängigen cfu's, was ungefähr eine zweifache Repräsentation der gesamten Bibliothek darstellt. Der Phagenstock, der aus dieser Plattierung gebildet wurde, ergab einen Gesamttiter von $1{,}4 \times 10^{13}$ pfu's in ungefähr 3,9 ml, wobei jeder unabhängige Klon im Mittel 1×10^7 Mal im gesamten Phagenstock und $2{,}6 \times 10^6$ Mal pro ml vertreten war.

[0094] Um eine Variierung der Reste 31, 32, 34 und 39 (Phase II) zu ermöglichen, wurden synthetische Oligonukleotidduplexe mit MluI- und BstEII-kompatiblen Enden in zuvor geschnittene R_f DNA kloniert, welche aus einem der folgenden erhalten wurde:

i) der Elternkonstruktion,
ii) der Phase-I-Bibliothek, oder
iii) einem präsentierenden Phagen, welcher aus der ersten Phase aufgrund seiner Bindung an ein gegebenes Ziel ausgewählt wurde.

[0095] Das Variierungsschema für Phase II ermöglicht 4096 verschiedene DNA-Sequenzen (1600 verschiedene Proteinsequenzen) aufgrund der Veränderungen an den Resten 31, 32, 34 und 39. Die endgültige Phase-II-Variierung hängt von dem Variierungsniveau ab, welches nach drei Runden von Bindung und Elution mit einem gegebenen Ziel der Phase I erhalten bleibt.

[0096] Die kombinierte mögliche Variierung für beide Phasen entspricht $2{,}7 \times 10^8$ verschiedenen DNA-Sequenzen oder $5{,}0 \times 10^7$ verschiedenen Proteinsequenzen. Wenn vorher ausgewählte präsentierende Phagen als eine Quelle für R_f DNA für die Phase-II-Variierung verwendet werden, liegt das Endniveau der Variierung wahrscheinlich im Bereich von 10^5 bis 10^6.

BEISPIEL 2: SCREENEN DER LACI (K1)-BIBLIOTHEK AUF DIE BINDUNG AN KALLIKREIN

[0097] Das Gesamtschema zur Auswahl einer LACI-K1-Variante, die an eine gegebene Protease binden soll, bezieht die Inkubation der Phagen-präsentierenden Bibliothek mit den interessierenden Kallikreinkügelchen in einer gepufferten Lösung (PBS enthaltend 1 mg/ml BSA), gefolgt von einem Wegwaschen der ungebundenen oder schwach zurückgehaltenen präsentierenden Phagenvariante mit PBS enthaltend 0,1% Tween 20 ein. Die

Kallikreinkügelchen werden durch Koppeln von humanem Plasmakallikrein (Calbiochem, San Diego, CA, #420302) an Agarosekügelchen unter Verwendung von Reactigel (6×) (Pierce, Rockford, IL, #202606) hergestellt. Die stärker gebundenen präsentierenden Phagen werden mit einem Elutionspuffer mit niedrigem pH, typischerweise Citratpuffer (pH 2,0) enthaltend 1 mg/ml BSA eluiert, welcher sofort mit Tris-Puffer auf pH 7,5 neutralisiert wird. Dieses Verfahren stellt eine einzelne Runde der Selektion dar.

[0098] Der neutralisierte eluierte präsentierende Phage kann für beides benutzt werden:

i) um einen F^+ Stamm von E. coli zu inokulieren, um einen neuen präsentierenden Phagenstock zu bilden, der für anschließende Selektionsrunden verwendet werden kann (so genanntes konventionelles Screening), oder
ii) direkt für eine weitere anschließende Selektionsrunde mit den Proteasekügelchen verwendet werden (so genanntes Schnellscreening).

[0099] Typischerweise werden drei Runden eines der Verfahren oder eine Kombination der beiden durchgeführt, um zu einem endgültigen ausgewählten präsentierenden Phagen zu führen, von dem eine repräsentative Zahl sequenziert und auf seine Bindungseigenschaften entweder als Pools von präsentierenden Phagen oder als individuelle Klone analysiert wird.

[0100] Es werden zwei Phasen der Selektion durchgeführt, wobei jede aus drei Runden von Bindung und Elution besteht. Die Phase-I-Selektion verwendet die Phase-I-Bibliothek (variierte Reste 13, 16, 17, 18 und 19), die durch drei Runden von Bindung und Elution gegen eine Zielprotease gegangen war, um zu einer Subpopulation von Klonen zu führen. Die Rf DNA, die von dieser ausgewählten Subpopulation abgeleitet ist, wurde verwendet, um die Phase-II-Bibliothek (zusätzlich variierte Reste 31, 32, 34 und 39) zu bilden. Die $1{,}8 \times 10^7$ unabhängigen Transformanten wurden für jede der Phase-II-Bibliotheken erhalten. Die Phase-II-Bibliotheken wurden drei weiteren Runden von Bindung und Elution mit der gleichen Zielprotease unterzogen, um zu den endgültigen Selektanten zu führen.

[0101] Nach zwei Phasen der Selektion gegen humane Plasmakallikrein-Agarosekügelchen wurde eine Zahl (10) der endgültig ausgewählten präsentierenden Phagen sequenziert. Die Aminosäuresequenzen sind in Tabelle 2, Einträge KBPcon1 bis KKII/3#C, gezeigt.

[0102] Tabelle 23 zeigt, dass KkII/3(D) ein hochspezifischer Inhibitor von humanem Kallikrein ist. Der Phage, der das LACI-K1-Derivat KkII/3(D) zeigt, bindet an die Kallikreinkügelchen mindestens 50-fach stärker, als er an andere Proteaseziele bindet.

[0103] Vorläufige Messungen weisen darauf hin, dass KKII/3#6 ein potenter Inhibitor von pKA mit einem K_i wahrscheinlich von weniger als 500 pM ist.

EXPRESSION, REINIGUNG UND KINETISCHE ANALYSE

[0104] Die drei Isolate KKII/3#6, KK2/#11 und KK2/#13 wurden in einen Hefeexpressionsvektor umkloniert. Der Hefeexpressionsvektor ist von pMFalpha8 abgeleitet (KURJ82 und MIYA85). Die varianten LACI-Gene wurden an einen Teil des matα-1-Gens fusioniert, was ein Hybridgen bestehend aus dem matα-1-Promotor-Signalpeptid und der Leadersequenz, welche an die LACI-Variante fusionierten waren, ergab. Die Klonierungsstelle ist in Tabelle 24 gezeigt. Bemerken Sie, dass das korrekt prozessierte LACI-K1-Variantenprotein wie in Tabelle 2 ausgeführt mit der Addition der Reste glu-ala-ala-glu an das N-terminale met angetroffen werden sollte (Rest 1 in Tabelle 2). Die Expression in S. cerevisiae ergab einen annehmbaren Ertrag, der für dieses System typisch ist. Das Hefe-exprimierte LACI (Kunitz-Domäne 1), BPTI und LACI-Varianten: KKII/3#6, KK2/#11 und KK2/#13 wurden durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Trypsin-Agarosekügelchen gereinigt.

[0105] Für die Herstellung in größerem Maßstab ist Pichia pastoris ein bevorzugter Wirt. Das am meisten bevorzugte Herstellungssystem in P. pastoris ist das Alkoholoxidasesystem. Von anderen wurde eine Anzahl von Proteinen in der Hefe Pichia pastoris hergestellt. Zum Beispiel produzierten Vedvick et al. (VEDV91) und Wagner et al. (WAGN92) Aprotinin mit dem Alkoholoxidasepromotor mittels Induktion durch Methanol als ein in das Kulturmedium sekretiertes Protein mit ≈ 1 mg/ml. Gregg et al. (GREG93) haben die Herstellung einer Reihe von Proteinen in P. pastoris in einer Übersicht dargestellt. Tabelle 1 von GREG93 zeigt Proteine, die in P. pastoris produziert wurden, sowie deren Ausbeute.

TABELLE 1: Sequenz des gesamten LACI:

```
    1   5         5         5         5         5
  1 MIYTMKKVHA LWASVCLLLN LAPAPLNAds eedeehtiit dtelpplklM
 51 HSFCAFKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFESLEEC
101 KKMCTRDnan riikttlqqe kpdfcfleed pgicrgyitr yfynnqtkqc
151 erfkyggclg nmnnfetlee cknicedgpn gfqvdnygtq lnavnnsltp
201 qstkvpslfe fhgpswcltp adrglcrane nrfyynsvig kcrpfkysgc
251 ggnennftsk qeclrackkg fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif
301 vknm    (SEQ ID NR. 18)
```

[0106] Die Signalsequenz (1–28) ist in unterstrichenen Großbuchstaben
LACI-K1 ist in Großbuchstaben
LACI-K2 ist unterstrichen
LACI-K3 ist fett

[0107] TABELLE 2 ist weiter unten.

Tabelle 3: Zusammenfassung der ersten Selektion der LACI-K1-Domänen auf die Bindung an pKA.

BPTI #	(Lac I)	Bibliotheksreste	Bevorzugte Reste
13	P	LHPR	HP
16	A	AG	AG
17	I	FYLHINA SCPRTVD G	NSA
18	M	alle	HL
19	K	LWQMKAG SPRTVE	QLP
31	E	EQ	E
32	E	EQ	EQ
34	I	alle	STI
39	E	alle	GEA

Tabelle 2: Sequenzen von Kunitz-Domänen, von denen einige humane pKA inhibieren.

Ident	Aminosäuresequenz 1111111111222222222333333333444444444555555555 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	SEQ ID NR.
BPTI	RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA	SEQ ID NR. 2
LACI-K1	mhsfcafkaddgpckaimkrfffniftrqceefiyggcegnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 3
KBPcon1	mhsfcafkaddgHckaNHQrfffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 4
KKII/3#1	mhsfcafkaddgHckASLPrfffniftrqcEEfIyggcEgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 5
KKII/3#2	mhsfcafkaddgPckANHLrfffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 6
KKII/3#3	mhsfcafkaddgHckANHQrfffniftrqcEEfTyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 7
KKII/3#4	mhsfcafkaddgHckANHQrfffniftrqcEQfTyggcAgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 8
KKII/3#5	mhsfcafkaddgHckASLPrfffniftrqcEEfIyggcGgnqmrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 9
KKII/3#6	mhsfcafkaddgHckANHQrfffnif&trqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 10
KKII/3#7	mhsfcafkaddgHckANHQrfffniftrqcEEfSyggcGgnqmrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 11
KKII/3#8	mhsfcafkaddgHckANHQrfffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 12
KKII/3#9	mhsfcafkaddgHckANHQrfffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 13
KKII/3#10	mhsfcafkaddgHckGAHLrfffniftrqcEEfIyggcEgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 14
KKI/3(a)	mhsfcafkaddgRckGAHLrfffniftrqceefiyggcegnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 15

Tabelle 2: Sequenzen von Kunitz-Domänen, von denen einige humane pKA inhibieren.

Ident	Aminosäuresequenz 1111111111222222222333333333444444444555555555 1234567890123456789012345678901234567890123456789	SEQ ID NR.
KKI/3(b)	mhsfcafkaddgPcKAIHLrfffnifitrqceefiyggcegnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 16
KKII/3#C	mhsfcafkaddgHcKANHQrfffnifitrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 17
KK2/#13	mhsfcafkaDGgRcRGAHPrWffnifitrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 19
KK2/#14	mhsfcafkaDGgRcRGAHPrWffnifitrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 20
KK2/#5	mhsfcafkaDDgPcRAAHPrWffnifitrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 21
KK2/#11	mhsfcafkaDDgPcRAAHPrWffnifitrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 22
KK2/#1	mhsfcafkaDVgRcRGAHPrWffnifitrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 23
KK2/#4	mhsfcafkaDVgRcRGAQPrFffnifitrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 24
KK2/#6	mhsfcafkaDDgScRAAHLrWffnifitrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 25
KK2/#10	mhsfcafkaEGgScRAAHQrWffnifitrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 26
KK2/#8	mhsfcafkaDDgPcRGAHLrFffnifitrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 27
KK2/#3	mhsfcafkaDDgHcRGALPrWffnifitrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 28
KK2/#9	mhsfcafkaDSgNcRGNLPrFffnifitrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 29
KK2/#7	mhsfcafkaDSgRcRGNHQrFffnifitrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 30

Tabelle 2: Sequenzen von Kunitz-Domänen, von denen einige humane pKA inhibieren.

Ident	Aminosäuresequenz 1111111111222222222333333333344444444455555555551234567890123456789012345678901234567890123456789	SEQ ID NR.
KK2/#12	mhsfcafkaDGgRcRAIQPrWffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 31
KK2con1	mhsfcafkaDDgRcRGAHPrWffnifttrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd	SEQ ID NR. 32
Humanes LACI-K2	KPDFCFLEEDPGICRGYITRYFYNNQTKQCERFKYGGCLGNMNNFETLEECKNICEDG	SEQ ID NR. 33
DKI-1.2.1	kpdfcfleedGgRcrgAHPrWfynnqtkqceEfSyggcGgnmnnfetleecknicedg	SEQ ID NR. 34
Humanes LACI-K3	GPSWCLTPADRGLCRANENRFYYNSVIGKCRPFKYSGCGGNENNFTSKQECLRACKKG	SEQ ID NR. 35
DKI-1.3.1	gpswcltpadDgPcraAHPrfyynsvigkcEpfSysgcggnennftskqeclrackkg	SEQ ID NR. 36
Humane Collagen α3 KuDom	ETDICKLPKDEGTCRDFILKWYYDPNTKSCARFWYGGCGGNENKFGSQKECEKVCAPV	SEQ ID NR. 37
DKI-2.1	etdicklpkdegtcrAAHlkwyydpntkscaEfSyggcggnenkfgsqkecekvcapv	SEQ ID NR. 38
TFPI-2 DOMÄNE 1	NAEICLLPLDYGPCRALLLRYYYDRYTQSCRQFLYGGCEGNANNFYTWEACDDACWRI	SEQ ID NR. 39
DKI-3.1.1	naeiclpldGgpcraAHlryyydrytqscEqfSyggcegnannfytweacddacwri	SEQ ID NR. 40
tfpi-2 DOMÄNE 2	VPKVCRLQVS- VDDQCEGSTEKYFFNLSSMTCEKFFSGGCHRNR- IENRFPDEATCMGFCAPK	SEQ ID NR. 41

Tabelle 2: Sequenzen von Kunitz-Domänen, von denen einige humane pKA inhibieren.

Ident	Aminosäuresequenz 1111111111222222222233333333344444444455555555551234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	
DKI-3.2.1	vpkvcrlqvs- vddqcRAAHPkyffnlssmtceEffsggchrnr- ienrfpdeatcmgfcapk	SEQ ID NR. 42
TFPI-2 DOMÄNE 3	IPSFCYSPKDEGLCSANVTRYYFNPRYRTCDAFTYTGCGGNDNNFVSREDCKRACAKA	SEQ ID NR. 43
DKI-3.3.1	ipsfcyspkdegHcRaAHQryyfnpryrtcdaftytgcggndnnfvsredckracaka	SEQ ID NR. 44
HUMANES ITI-K1	KEDSCQLGYSAGPCMGMTSRYFYNGTSMACETFQYGGCMGNGNNFVTEKECLQTCRTV	SEQ ID NR. 45
DKI-4.1.1	kedscqlgyDagpcRgAHPryfyngtsmacetfSyggcGgngnnfvtekeclqtcrtv	SEQ ID NR. 46
Humanes ITI-K2	TVAACNLPIVRGPCRAFIQLWAFDAVKGKCVLFPYGGCQGNGNKFYSEKECREYCGVP	SEQ ID NR. 47
DKI-4.2.1	tvaacnlpiDDgpcraAHqlwafdavkgkcEEfSyggcEgngnkfysekecreycgvp	SEQ ID NR. 48
DKI-4.2.2	tvaacnlpiDDgpcraAHqRwafdavkgkcEEfSyggcqgngnkfysekecreycgvp	SEQ ID NR. 49
HUMANES PROTEASE NEXIN-II	VREVCSFQAFTGPCRAMISRWYFDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNNFDTEEYCMAVCGSA	SEQ ID NR. 50
DKI-5.1	vrevcseqaetgpcraAHPrwyfdvtegkcEEfSyggcggnrnnfdteeycmavcgsa	SEQ ID NR. 51
HKI B9 Domäne	LPNVCAFPMEKGPCQTYMTRWFFNFETGECELFAYGGCGGNSNNFLRKEKCEKFCKFT	SEQ ID NR. 53
DKI-6.1	lpnvcafpmeDgpcRAAHPrwffnfetgeceEfayggcggnsnnflrkekcekfckft	SEQ ID NR. 54

Tabelle 2: Sequenzen von Kunitz-Domänen, von denen einige humane pKA inhibieren.		
	Aminosäuresequenz 1111111111222222222233333333334444444444555555555	
Ident	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	SEQ ID NR.
DKI-7.1	rpdfcleppEtgpcRaAHPryfynakaglcEEfvyggcGakrnnfksaedcmrtcgga	SEQ ID NR. 55

Tabelle 3 ist weiter oben angegeben.

TABELLE 8: Bindungsdaten für ausgewählte Kallikrein-bindende präsentierende Phagen.

Präsentierender Phage (a)	Gebundene Fraktion (b)	Relative Bindung (c)
LACI	$4{,}2 \times 10^{-6}$	1,0
BPTI	$2{,}5 \times 10^{-5}$	6,0
KKI/3(a)	$3{,}2 \times 10^{-3}$	761
KKI/3(b)	$2{,}2 \times 10^{-3}$	524
KKII/3#5	$3{,}9 \times 10^{-3}$	928
KKII/3#6	$8{,}7 \times 10^{-3}$	2071

(a) Klonale Isolate von präsentierenden Phagen. LACI-K1 ist das Elternmolekül, BPTI (boviner pankreatischer Trypsin-Inhibitor) ist eine Kontrolle und KKII/3 (5 und 6) und KKI/3 (a und b) wurden mittels Bindung an die Zielprotease, Kallikrein, ausgewählt.

(b) Die Anzahl der pfu's, welche nach einem Bindungsexperiment als eine Fraktion der eingesetzten Anzahl (10^{10} pfu's) eluiert wurde.

(c) Gebundene Fraktion relativ zu dem präsentierenden Eltern-Phagen, LACI-K1.

Tabelle 9: Konservative und semikonservative Substitutionen

Anfänglicher AS-Typ	Kategorie	Konservative Substitution	Semikonservative Substitution
A	klein unpolar oder leicht polar	G, S, T	N, V, P, (C)
C	freie SH	A, M, L, V, I	F, G
	Disulfid	nichts	nichts
D	sauer, hydrophil	E, N, S, T, Q	K, R, H, A
E	sauer, hydrophil	D, Q, S, T, N	K, R, H, A
F	aromatisch	W, Y, H, L, M	I, V, (C)
G	nur Gly-Konformation	nichts	nichts
	„normale“ Konformation	A, S, N, T	D, E, H, I, K, L, M, Q, R, V
H	amphoter aromatisch	Y, F, K, R	L, M, A, (C)
I	aliphatisch, verzweigter β-Kohlenstoff	V, L, M, A	F, Y, W, G, (C)
K	basisch	R, H	Q, N, S, T, D, E, A
L	aliphatisch	M, I, V, A	F, Y, W, H, (C)
M	hydrophob	L, I, V, A	Q, F, Y, W, (C), (R), (K), (E)
N	nicht-polar hydrophil	S, T, (D), Q, A, G, (E)	K, R
P	nicht flexibel	V, I	A, (C), (D), (E), F, H, (K), L, M, N, Q, (R), S, T, W, Y
Q	aliphatisch plus Amid	N, E, A, S, T, D	M, L, K, R
R	basisch	K, Q, H	S, T, E, D, A
S	hydrophil	A, T, G, N	D, E, R, K
T	hydrophil	A, S, G, N, V	D, E, R, K, I
V	aliphatisch, verzweigter β-Kohlenstoff	I, L, M, A, T	P, (C)
W	aromatisch	F, Y, H	L, M, I, V, (C)
Y	aromatisch	F, W, H	L, M, I, V, (C)

[0108] Der Wechsel von A, F, H, I, L, M, P, V, W oder Y nach C ist semikonservativ, wenn das neue Cystein als ein freies Thiol verbleibt.

[0109] Der Wechsel von M nach E, R, K ist semikonservativ, wenn die ionische Spitze der neuen Seitengruppe die Proteinoberfläche erreichen kann, während die Methylengruppen hydrophobe Kontakte bilden.

[0110] Der Wechsel von P zu einem aus K, R, E oder D ist semikonservativ, wenn die Seitengruppe auf oder nahe der Oberfläche des Proteins ist.

Tabelle 14: Definition einer Kunitz-Domäne (SEQ ID NR. 52)
1 2 3 4 5 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678 xxxxCxxxxxxGxCxxxxxxxXXXxxxxxxxCxxFxXXGCxXxxXxXxxxxxCxxxCxxx
Wobei:
X1, X2, X3, X4, X58, X57 und X56 abwesend sein können,
X21 = Phe, Tyr, Trp,
X22 = Tyr oder Phe,
X23 = Tyr oder Phe,
X35 = Tyr oder Trp,
X36 = Gly oder Ser,
X40 = Gly oder Ala,
X43 = Asn oder Gly, und
X45 = Phe oder Tyr

Tabelle 15: Substitution, um KuDoms hohe Affinität für pKA zu verleihen

Position	Bevorzugt	Erlaubt	Wahrscheinlich nicht funktionsfähig
10	**Asp, Glu**	**Ala, Gly, Ser, Thr**	**Lys, Asn, (Arg, Cys, Phe, His, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, Val, Trp, Tyr)**
11	**Asp, Gly, Ser, Val**	**Glu, Leu, Met, [Asn, Ile, Ala, Thr]**	**(Cys, Phe, His, Lys, Pro, Gln, Arg, Trp, Tyr)**
12	**Gly**	(Andere Aminosäuren NUR, wenn C_{14}-C_{38} Disulfid durch andere Aminosäuren ersetzt wird.)	

Tabelle 15: Substitution, um KuDoms hohe Affinität für pKA zu verleihen

Position	Bevorzugt	Erlaubt	Wahrscheinlich nicht funktionsfähig
13	**Arg, His, Pro, Asn, Ser**	**[Thr, Ala, Gly, Lys, Gln]**	**Phe, Tyr, Cys, Leu, Ile, Val, Asp (Glu, Met, Trp)**
14	**Cys**	(Andere Aminosäuren NUR, wenn C_{38} auch ausgetauscht wird.)	
15	**Arg, Lys**	**[Ala, Ser, Gly, Met, Asn, Gln]**	**(Cys, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Leu, Pro, Thr, Val, Trp, Tyr)**
16	**Ala, Gly**	**[Ser, Asp, Asn]**	**(Cys, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp, Tyr)**
17	**Ala, Asn, Ser, Ile**	**[Gly, Val, Gln, Thr**	**Cys, Asp, Phe, His, Pro, Arg, Tyr, (Glu, Lys, Met, Trp)**
18	**His, Leu, Gln**	**[Ala,**	**Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr**
19	**Pro, Gln, Leu**	**[Asn, Ile]**	**Ala, Glu, Gly, Met, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, (Cys, Asp, Phe, His, Tyr)**
20	**Arg**	**Leu, Ala, Ser, Lys, Gln, Val**	**(Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Met, Asn, Pro, Thr, Trp, Tyr)**

Tabelle 15: Substitution, um KuDoms hohe Affinität für pKA zu verleihen

Position	Bevorzugt	Erlaubt	Wahrscheinlich nicht funktionsfähig
21	**Trp, Phe**	[Tyr, His, Ile]	Cys, Leu (Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val)
31	**Glu**	[Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Thr]	(Arg, Lys, Cys, Phe, Gly, His, Met, Pro, Trp, Tyr)
32	**Glu, Gln**	[Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly, Val]	(Cys, Phe, His, Ile, Lys, Met, Arg, Trp, Tyr)
33	**Phe**	[Tyr]	andere 18 ausgeschlossen.
34	**Ser, Thr, Ile**	[Val, Ala, Asn, Gly, Leu]	Cys, Asp, Glu, Phe, His, Lys, Met, Pro, Gln, Arg, Trp, Tyr
35	**Tyr**	[Trp, Phe]	(andere 17)
36	**Gly**	Ser, Ala	(andere 17)
37	**Gly**	(Andere Aminosäuretypen nur erlaubt, wenn C_{14}-C_{38} durch andere Typen ersetzt wird.)	
38	**Cys**	(Andere Aminosäuren NUR, wenn C_{14} auch ausgetauscht wird.)	
39	**Gly, Glu, Ala**	[Ser, Asp]	Andere 15.

[0111] Unter den „Bevorzugten" sind die höchst bevorzugten Typen fett.

[0112] Unter den „Erlaubten" sind Typen, die tatsächlich nicht getestet, aber als annehmbar beurteilt wurden. Die in eckigen Klammern angegebenen Typen wurden erlaubt und nicht ausgewählt, aber sie sind zu den ausgewählten Typen so ähnlich, dass der Typ wahrscheinlich die pKA-Bindung nicht unterbindet. Solche Typen sind nicht bevorzugt, aber pKA-Bindungsproteine könnten solche Typen haben.

[0113] Unter „Wahrscheinlich nicht funktionsfähig" wurden die Typen ohne Klammern ausprobiert und keine Isolate hatten diesen Typ; die Typen in Klammern wurden nicht getestet, aber aus Überlegungen bezüglich der tatsächlich ausgeschlossenen Typen als ungeeignet beurteilt.

TABELLE 21: Erste Variierung von LACI-K1

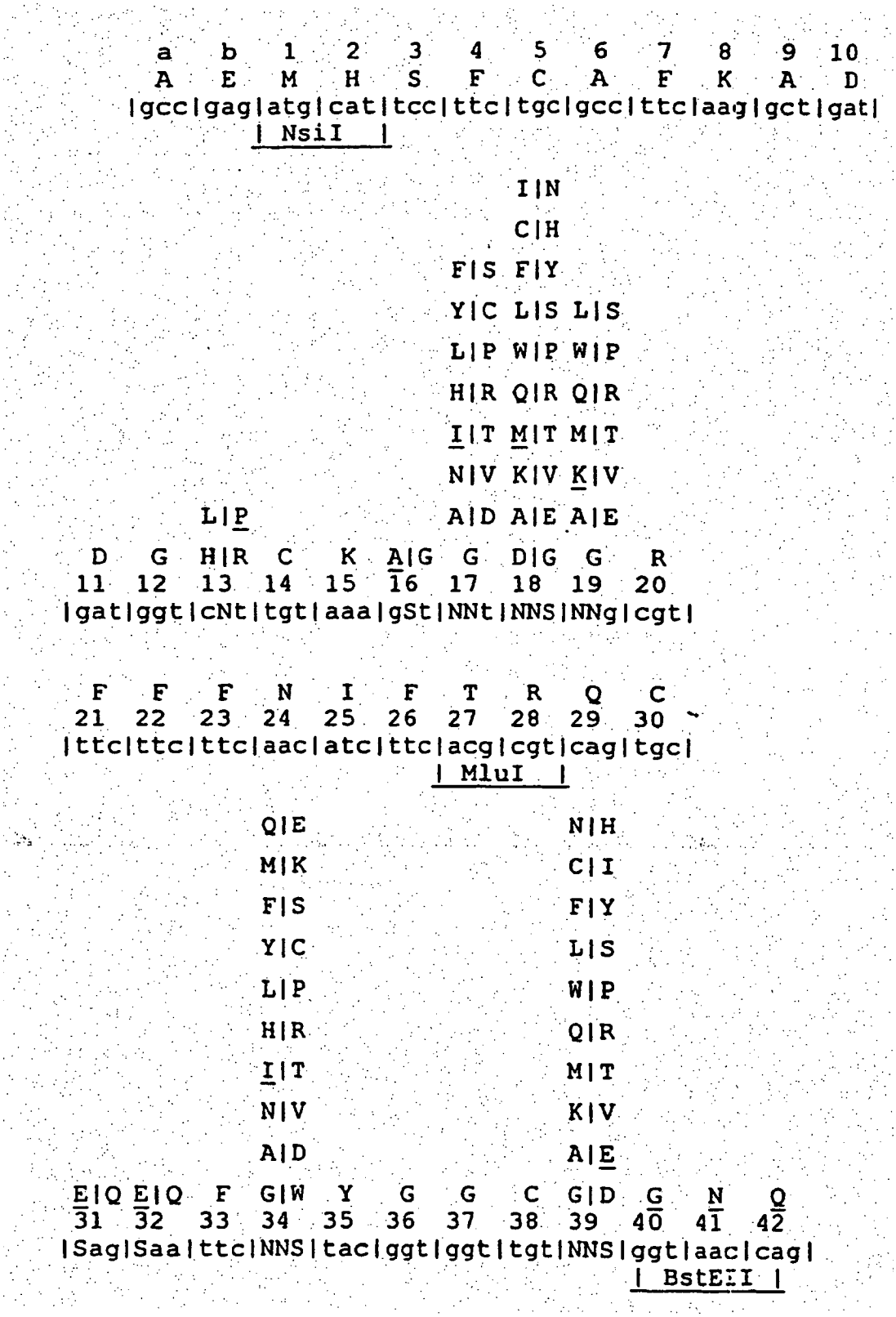
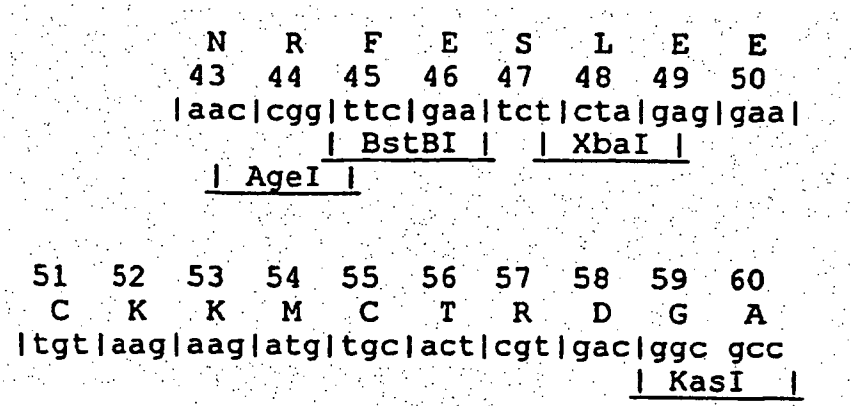


Tabelle 21, fortgesetzt



[0114] Der Abschnitt von NsiI bis MluI ergibt 65.536 DNA-Sequenzen und 31.200 Proteinsequenzen. Die zweite Gruppe der Variierung ergibt 21.840 und 32.768. Varianten. Diese Variierung kann auf einem Fragment mit MluI und einem der Enden AgeI, BstBI oder XbaI hinein gehen. Aufgrund der Nähe zwischen Kodon 42 und der 3'-Restriktionsschnittstelle wird man ein selbst-primendes Oligonukleotid herstellen, einfüllen und mit MluI und beispielsweise BstBI schneiden. Die Gesamtzahl der Varianten betrug $2{,}726 \times 10^9$ und $8{,}59 \times 10^9$.

[0115] Die DNA-Sequenz hat SEQ ID NR. 56.

[0116] Die Aminosäuresequenz hat SEQ ID NR. 57.

Tabelle 23: Spezifitätsergebnisse

Protein präsentiert auf M13 gIIIp	Getestetes immobilisiertes Enzym				
	Plasmin	Thrombin	pKA	Trypsin	Trypsin, 2 Wasch-schritte
LACI-K1	1	1	1	1	1
KkII/3(D)	3,4	1,5	196,0	2,0	1,4
BPTI	88,	1,1	1,7	0,3	0,8

[0117] Die Zahlen beziehen sich auf die relative Bindung der Phagen-präsentierenden Klone im Vergleich zu den präsentierenden Elternphagen.

[0118] Der KkII/3(D)(Kallikrein)-Klon behält die Affinität des Elternmoleküls für Trypsin bei. KkII/3(D) wurde für die Bindung an pKA ausgewählt.

TABELLE 24: Mat α S. cerevisiae Expressionsvektoren:

Matα1 (Mfα8)

```
          K   R   P   R                                  SEQ ID NR. 58
5'-...|AAA|AGG|CCT|CGA|G...-3'                           SEQ ID NR. 59
        | StuI  |
            | XhoI |
```

Matα2 (nach Einführung eines Linkers in die *Stu*I-geschnittene DNA)

```
                                                Aminosäuren: SEQ ID NR. 60
  K   R   E   A   A   E   P   W   G   A   .   .   L   E
5'|AAA|AGG|GAA|GCG|GCC|GAG|CCA|TGG|GGC|GCC|TAA|TAG|CTC|GAG|3'
          | EagI |  | StyI | KasI |              | XhoI |
                                                DNA: SEQ ID NR. 61
```

Matα-LACI-K1, Aminosäuren SEQ ID NR. 62, DNA: SEQ ID NR. 63

```
            a   b   c   d   1   2   3   4   5   6   7   8
  K   R   E   A   A   E   M   H   S   F   C   A   F   K
5'|AAA|AGG|GAA|GCG|GCC|GAG|atg|cat|tcc|ttc|tgc|gct|ttc|aaa|
          | EagI |  | NsiI  |

  9  10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20
  A   D   D   G   P   C   K   A   I   M   K   R
|gct|gat|gaC|ggT|ccG|tgt|aaa|gct|atc|atg|aaa|cgt|
        | RsrII |               | BspHI|

 21  22  23  24  25  26  27  28  29  30
  F   F   F   N   I   F   T   R   Q   C
|ttc|ttc|ttc|aac|att|ttc|acG|cgt|cag|tgc|
                  | MluI  |

 31  32  33  34  35  36  37  38  39  40  41  42
  E   E   F   I   Y   G   G   C   E   G   N   Q
|gag|gaA|ttC|att|tac|ggt|ggt|tgt|gaa|ggt|aac|cag|
   | EcoRI |                       | BstEII |

          43  44  45  46  47  48  49  50
           N   R   F   E   S   L   E   E
        |aac|cgG|ttc|gaa|tct|ctA|gag|gaa|
          |     | BstBI |  | XbaI |
          | AgeI |

 51  52  53  54  55  56  57  58  59  60
  C   K   K   M   C   T   R   D   G   A
|tgt|aag|aag|atg|tgc|act|cgt|gac|ggc|gcc|TAA|TAG|CTC|GAG|-3'
                          | KasI  |       | XhoI  |
```

[0119] Wir erwarten, dass die Matα-Präsequenz vor GLU_a-ALA_b- abgespalten wird.

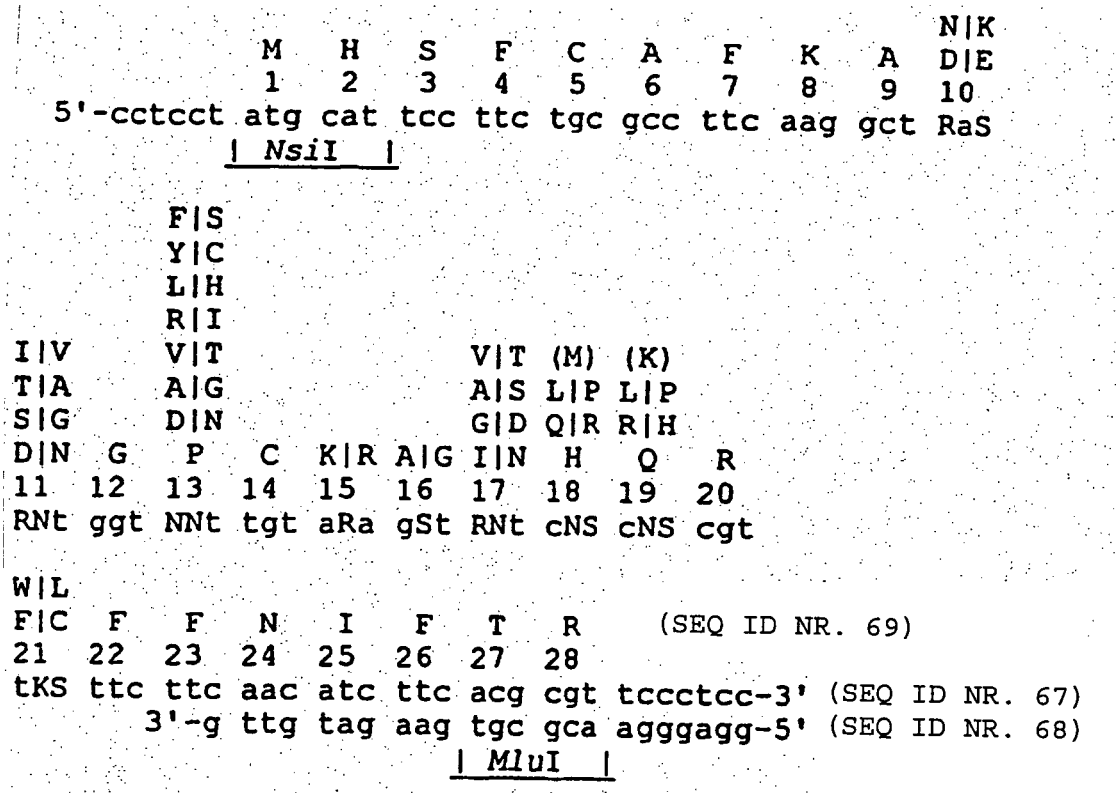
Tabelle 27: Hochspezifische Plasmakallikrein-Inhibitoren

LACI-K1 (SEQ ID NR. 3)
MHSFCAFKADDGPCKAIMKRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
KKII/3#7 (SEQ ID NR. 11)
mhsfcafkaddgHckANHQrfffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd
KKII/3#7-K15A (SEQ ID NR. 64)
mhsfcafkaddghcAanhqrfffniftrqceefsyggcggnqnrfesleeckkmctrd
KK2/#13-R15A (SEQ ID NR. 65)
mhsfcafkaDGgRcAGAHPrWffniftrqcEEfSyggcGgnqnrfesleeckkmctrd
KK2/#11-R15S (SEQ ID NR. 66)
mhsfcafkaddgpcSaahprwffniftrqceefsyggcggnqnrfesleeckkmctrd

Tabelle 49

	Rest Nummer											
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
LACI-K1	D	D	G	P	C	K	A	I	M	K	R	F
Konsensus von KKII/3-Selektanten	d	d	g	H	c	k	A	N	H	Q	r	f
KK-Bibliothek #2	NK DE	NI AD ST GV	g	FS YC LP HR IT NV AD G	c	KR	AG	NI AD ST GV	CL HP R	QL HP R	r	FW CL
KK2/#13	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KK2/#14	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KK2/#5	-	-	-	P	-	-	A	-	-	-	-	-
KK2/#11	-	-	-	P	-	-	A	-	-	-	-	-
KK2/#1	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KK2/#4	-	V	-	-	-	-	-	-	Q	-	-	F
KK2/#6	-	-	-	S	-	-	A	-	-	L	-	-
KK2/#10	E	G	-	S	-	-	A	-	-	Q	-	-
KK2/#8	-	-	-	P	-	-	-	-	-	L	-	F
KK2/#3	-	-	-	H	-	-	-	-	L	-	-	-
KK2/#9	-	S	-	N	-	-	-	N	L	-	-	F
KK2/#7	-	S	-	-	-	-	-	N	-	Q	-	F
KK2/#12	-	G	-	-	-	-	A	I	Q	-	-	-
Konsensus #2	D	D	g	R	c	R	G	A	H	P	r	W

Tabelle 750: DNA, die die Bibliothek KKF verkörpert.



[0120] Die RsrII- und BspHI-Schnittstellen, welche in dem präsentierten Eltern-LACI-K1-Gen (Tabelle 6) gefunden wurden, sind in der Bibliothek KKF nicht vorhanden.

[0121] Es gibt 1 536 000 Aminosäuresequenzen und 4 194 304 DNA-Sequenzen. Met_{18} und Lys_{19} sind in der Bibliothek KKF nicht erlaubt.

Literaturstellen:

ADEL86: Adelman et al., Blood (1986) 68(6): 1280–1284.
ALBR83a: Albrecht et al., Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem (1983) 364: 1697–1702.
ALBR83b: Albrecht et al., Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem (1983) 364: 1703–1708.
ANBA88: Anba et al., Biochimie (1988) 70(6): 727–733.
ANGL87: Angliker et al., Biochem J (1987) 241(3): 871–5.
AUER88: Auerswald et al., Bio Chem Hoppe-Seyler (1988), 369 (Ergänzungsband): 27–35.
BALD85: Balduyck et al., Biol Chem Hoppe-Seyler (1985) 366: 9–14.
BANE90: Baneyx & Georgiou, J Bacteriol (1990) 172(1): 491–494.
BANE91: Baneyx & Georgiou, J Bacteriol (1991) 173(8): 2696–2703.
BERN94: Berndt et al., Biochemistry (1993) 32: 4564–70.
BHOO92: Bhoola et al., Pharmacological Reviews (1992) 44(1): 1–80.
BROW91: Browne et al., Gene Bank Eintrag M74220.
BROZ90: Broze et al., Biochemistry (1990) 29: 7539–7546.
COLM87: Colman et al., Herausgeber, Hemostasis and Thrombosis, Zweite Auflage, 1987, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA.
COLM87a: Colman et al., Kapitel 1 aus COLM87.
DAVI79: Davis et al., US-Patent 4,179,337 (1979).
DENN94a: Dennis & Lazarus, J Biological Chem (1994) 269: 22129–22136.
DENN94b: Dennis & Lazarus, J Biological Chem (1994) 269: 22137–22144.
EIGE90: Eigenbrot et al., Protein Engineering (1990) 3(7): 591–598.
ELLI92: Ellis et al., Ann NY Acad Sci (1992) 667: 13–31.
FIDL94: Fidler & Ellis, Cell (1994) 79: 185–188.
FRAE89: Fraedrich et al., Thorac Cardiovasc Surg (1989) 37(2): 89–91.
GARD93: Gardell, Toxicol Pathol (1993) 21(2): 190–8.
GIRA89: Girard et al., Nature (1989) 338: 518–20.

GIRA91: Girard et al., J. BIOL. CHEM. (1991) 266: 5036–5041.
HOOV93: Hoover et al., Biochemistry (1993) 32: 10936–43.
HORT91: Hortin & Trimpe, J Biol Chem (1991) 266(11): 6866–71.
HYNE90: Hynes et al., Biochemistry (1990) 29: 10018–10022.
KEMP88b: Kemp & Bowen, Tetrahedron Letts (1988) 29: 5077–5080.
KIDO88: Kido et al., J Biol Chem (1988) 263: 18104–7.
KIDO90: Kido et al., Biochem & Biophys Res Comm (1990) 167(2) : 716–21.
KLIN91: Kline et al., Biochem Biophys Res Commun (1991) 177(3): 1049–55.
LASK80: Laskowski & Kato, Ann Rev Biochem (1980) 49: 593–626.
LEAT91: Leatherbarrow & Salacinski, Biochemistry (1991) 30(44): 10717–21.
LOHM93: Lohmann & J Marshall, Refract Corneal Surg (1993) 9(4): 300–2.
LUCA83: Lucas et al., J Biological Chem (1983) 258(7): 4249–56.
MANN87: Mann & Foster, Kapitel 10 aus COLM87.
MARC85: Advanced Organic Chemistry, Dritte Auflage March, J, John Wiley and Sons, New York, 1985; ISBN 0-471-88841-9.
MIYA85: Miyajima et al., Gene (1985) 37: 155–161.
NEUH89: Neuhaus et al., Lancet (1989) 2(8668): 924–5.
NOV089: Novotny et al., J. BIOL. CHEM. (1989) 264: 18832–18837.
PARK86: Park & Tulinsky, Biochemistry (1986) 25(14): 3977–3982.
PUTT89: Putterman, Acta Chir Scand (1989) 155(6–7): 367.
ROBB87: Robbins, Kapitel 21 aus COLM87.
SCHE67: Schechter & Berger. Biochem Biophys Res Commun (1967) 27: 157–162.
SCHE68: Schechter & Berger. Biochem Biophys Res Commun (1968) 32: 898–902.
SCHM87: Schmaier et al., Kapitel 2 aus COLM87.
SCHN86: Schnabel et al., Biol Chem Hoppe-Seyler (1986) 367: 1167–76.
SHER89: Sheridan et al., Dis Colon Rectum (1989) 32(6): 505–8.
TIAN92: Tian et al., Int J Pept Protein Res (1992) 40(2): 119–26.
VAND91: van der Logt et al., BIOCHEMISTRY (1991) 30: 1571–1577.
VAND92: van Dijl et al., EMBO J (1992) 11(8): 2819–2828.
VARA83: Varadi & Patthy, Biochemistry (1983) 22: 2440–2446.
VARA84: Varadi & Patthy, Biochemistry (1984) 23: 2108–2112.
WILS93: Wilson et al., Tetrahedron (1993) 49(17): 3655–63.
WUNT88: Wun et al., J. BIOL. CHEM. (1988) 263: 6001–6004.

Patentansprüche

1. Ein isoliertes Polypeptid umfassend eine Kunitz-Domänenstruktur umfassend die Aminosäuresequenz:
Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Cys-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Gly-Xaa13-Cys-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Xaa22-Xaa23-Xaa24-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Cys-Xaa31-Xaa32-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-G1y-Cys-Xaa39-Xaa40-Xaa41-Xaa42-Xaa43-Xaa44-Xaa45-Xaa46-Xaa47-Xaa48-Xaa49-Xaa50-Cys-Xaa52-Xaa53-Xaa54-Cys-Xaa56-Xaa57-Xaa58,
wobei:
Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 oder Xaa58 fehlen kann;
Xaa10 ausgewählt ist aus Asp, Glu, Ala, Gly, Ser, Thr;
Xaa11 ausgewählt ist aus Asp, Gly, Ser, Val, Glu, Leu, Met, Asn, Ile, Ala, Thr;
Xaa13 ausgewählt ist aus Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys, Gln;
Xaa15 ausgewählt ist aus Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn, Gln;
Xaa16 ausgewählt ist aus Ala, Gly, Ser, Asp, Asn;
Xaa17 ausgewählt ist aus Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln, Thr;
Xaa18 ausgewählt ist aus His, Leu, Gln, Ala;
Xaa19 ausgewählt ist aus Pro, Gln, Leu, Asn, Ile;
Xaa20 ausgewählt ist aus Arg, Leu, Ala, Ser, Lys, Gln, Val;
Xaa21 ausgewählt ist aus Trp, Phe, Tyr, His, Ile;
Xaa22 ausgewählt ist aus Tyr, Phe;
Xaa23 ausgewählt ist aus Tyr, Phe;
Xaa31 ausgewählt ist aus Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Thr;
Xaa32 ausgewählt ist aus Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly und Val;
Xaa33 ausgewählt ist aus Phe, Tyr;
Xaa34 ausgewählt ist aus Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly, Leu;
Xaa35 ausgewählt ist aus Tyr, Trp, Phe;

Xaa36 ausgewählt ist aus Gly, Ser, Ala;
Xaa39 ausgewählt ist aus Gly, Glu, Ala, Ser, Asp;
Xaa40 ausgewählt ist aus Gly, Ala;
Xaa43 ausgewählt ist aus Asn, Gly; und
Xaa45 ausgewählt ist aus Phe, Tyr,
wobei das Polypeptid Kallikrein inhibiert.

2. Polypeptid nach Anspruch 1, wobei:
Xaa10 ausgewählt ist aus Asp, Glu;
Xaa11 ausgewählt ist aus Asp, Gly, Ser, Val;
Xaa13 ausgewählt ist aus Arg, His, Pro, Asn, Ser;
Xaa15 ausgewählt ist aus Arg, Lys;
Xaa16 ausgewählt ist aus Ala, Gly;
Xaa17 ausgewählt ist aus Ala, Asn, Ser, Ile;
Xaa18 ausgewählt ist aus His, Leu, Gln;
Xaa19 ausgewählt ist aus Pro, Gln, Leu;
Xaa20 Arg ist;
Xaa21 ausgewählt ist aus Trp, Phe;
Xaa31 Glu ist;
Xaa32 ausgewählt ist aus Glu, Gln;
Xaa33 Phe ist;
Xaa34 ausgewählt ist aus Thr, Ile, Ser;
Xaa35 Tyr ist;
Xaa36 Gly ist und
Xaa39 ausgewählt ist aus Glu, Gly, Ala.

3. Polypeptid nach Anspruch 2, wobei:
Xaa 10 Asp ist;
Xaa11 ausgewählt ist aus Asp and Gly;
Xaa13 ausgewählt ist aus Arg und His;
Xaa 15 Arg ist;
Xaa16 ausgewählt ist aus Ala und Gly;
Xaa17 ausgewählt ist aus Ala und Asn;
Xaa18 His ist, und
Xaa19 ausgewählt ist aus Pro, Gln, Leu.

4. Polypeptid nach Anspruch 1 umfassend eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Ser Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:5),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Asn His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:6),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:7),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Gln Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:8),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Ser Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:9),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR: 10),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:14),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Lys Gly Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:15),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:19),

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

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:23),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala Gln Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:24),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Leu Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:25),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Gly Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Gln Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:26),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Gly Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:27),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Arg Gly Ala Leu Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:28),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Asn Cys Arg Gly Asn Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:29),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Arg Cys Arg Gly Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:30),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Ala Ile Gln Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ

ID NR:31),

und

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NR:32).

5. Polypeptid nach Anspruch 1, wobei das Polypeptid humanes Kallikrein mit einem K_i von 20 nanomolar oder weniger, vorzugsweise 5 nanomolar oder weniger inhibiert, gemessen durch kompetitive Inhibition des Enzyms um die Bindung daran zwischen dem Inhibitor und dem Enzymsubstrat.

6. Polypeptid nach Anspruch 5, wobei das Polypeptid humanes Kallikrein mit einem K_i von 300 picomolar oder weniger inhibiert, gemessen durch kompetitive Inhibition des Enzyms um die Bindung daran zwischen dem Inhibitor und dem Enzymsubstrat.

7. Verwendung eines Polypeptids gemäß irgendeinem der Ansprüche 1–6 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung oder Vorbeugung von Hypotonie, Entzündung, gefäßbedingtem Schock, Ödem, das mit einer Bakteriämie oder einer Verletzung assoziiert ist, Ödem und Atemwegshyperreaktivität von Asthma, entzündungsbedingtem und neurogenem Schmerz, der mit einer Gewebeverletzung assoziiert ist, hereditärem Angioödem und exzessivem Bluten.

8. Verfahren für das Testen auf die Gegenwart von Kallikrein umfassend: Hinzufügen eines Polypeptids gemäß irgendeinem der Ansprüche 1–6 in markierter oder unglöslich gemachter Form zu einer interessierenden Probe, und Bestimmen, ob ein Komplex aus dem Polypeptid und Kallikrein gebildet wird.

9. Verfahren zur Reinigung von Kallikrein aus einem Gemisch, das umfasst Inkontaktbringen des Gemisches mit einem Polypeptid gemäß irgendeinem der Ansprüche 1–6 in unlöslich gemachter Form, und Abtrennen des Polypeptid-gebundenen Kallikreins von den anderen Komponenten des Gemisches.

10. Polypeptid gemäß irgendeinem der Ansprüche 1–6 zur Verwendung bei der Behandlung oder Vorbeugung einer Störung, die durch exzessive Kallikrein-Aktivität charakterisiert ist.

11. Eine pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend das Polypeptid gemäß irgendeinem der Ansprüche 1–6 in einem pharmazeutisch verträglichen Trägerstoff.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen