

PÉPTIDO INHIBIDOR DE CALICREÍNA 5 (KLK5)

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un péptido, un
5 polinucleótido, un vector, una célula, un método para producir
el péptido, un péptido obtenido mediante ese método, un
conjugado que contiene el péptido, una composición que contiene
el péptido o el conjugado, una composición farmacéutica, la
composición farmacéutica para tratar o prevenir diversas
10 enfermedades, el uso del péptido o el conjugado para tratar o
prevenir diversas enfermedades, un método para tratar diversas
enfermedades que incluye el paso de administrar el péptido o
el conjugado, una composición para diagnosticar o probar varias
enfermedades que contienen el péptido o el conjugado, y
15 similares.

Antecedentes de la Invención

La calicreína 5 (KLK5) es una serina proteasa similar
a la tripsina (Clan PA, familia S1) y también se denomina
enzima tríptica del estrato córneo (SCTE, por sus siglas en
20 inglés). La calicreína 7 (KLK7) es una proteasa similar a la
quimotripsina (Clan PA, familia S1) y también se denomina
enzima quimotríptica del estrato córneo (SCCE, por sus siglas
en inglés). Además, la calicreína 14 (KLK14) es una proteasa
similar a la tripsina (Clan PA, familia S1). KLK5, KLK7 y KLK14
25 pertenecen a una familia de calicreínas tisulares compuesta

por 15 tipos de serina proteasas tipo tripsina o quimotripsinas altamente conservadas. KLK5 se expresa en las células y luego se convierte en KLK5 activo por autoactivación, mientras que KLK7 y KLK14 se expresan como preproenzimas inactivas y se
5 convierten en formas activas por escisión de sus preprosecuencias por proteasas representadas por KLK5 (literatura no de patente 1). Se ha observado expresión de KLK5 en la piel, y se ha informado que degrada factores relacionados con la adhesión celular tales como Desmogleína y Desmocolina
10 (literatura no de patente 2). KLK5, KLK7 y KLK14 son importantes para la descamación de la piel y están más implicados en la activación del receptor 2 activado por proteinasa (PAR-2, por sus siglas en inglés) (no literatura de patente 3). La activación de PAR-2 induce citocinas y
15 quimiocinas y mejora la inmunidad, las reacciones inflamatorias y similares.

El síndrome de Netherton es uno de los síndromes de ictiosis con inflamación severa de la piel, descamación, cabello anormal y síntomas alérgicos como asma y dermatitis
20 alérgica debido a herencia autosómica recesiva, y es una enfermedad rara (OMIM256500) (literatura no de patente 4). Dado que la dermatitis exfoliativa se desarrolla desde el momento del nacimiento, la deshidratación, infección o similares pueden ser causadas por un daño significativo a la función de barrera
25 de la piel y pueden ir acompañadas de un retraso en el

desarrollo. Aunque no se dispone de datos epidemiológicos detallados, se dice que se presenta una alta mortalidad posnatal. El síndrome de Netherton se desarrolla debido a la pérdida de función de un inhibidor de la serina proteasa (LEKTI, por sus siglas en inglés) después de una mutación de un gen (SPINK5, por sus siglas en inglés) que codifica para LEKTI expresado en células epiteliales de la piel. LEKTI se compone de 15 dominios inhibidores similares a Kazal. En pacientes con síndrome de Netherton, se ha encontrado una pluralidad de sitios de mutación en SPINK5 a través de la secuencia que codifica para cada dominio, y los síntomas y la gravedad cambian en asociación con los sitios de mutación (literatura no de patente 4 y 5).

Los ratones deficientes en SPINK5 (*Spink5*^{-/-}) exhiben síntomas cutáneos similares al síndrome de Netherton, y se observa una alta actividad proteasa de KLK5 y KLK7 en el epitelio de la piel (literatura no de patente 1). Aunque los ratones deficientes en SPINK5 mueren varias horas después del nacimiento, se ha reportado de una mejora de la mortalidad neonatal en ratones (*Spink5*^{-/-}*Klk5*^{-/-}) obtenida al cruzar ratones deficientes en KLK5 con ratones deficientes en SPINK5 (literatura no de patente 6). Además, en ratones *Spink5*^{-/-} *Klk5*^{-/-}, se han recuperado defectos graves de la barrera cutánea, defectos estructurales del epitelio, inflamación de la piel y similares observados en *Spink5*^{-/-}. Asimismo, los ratones con la

mutación SPINK5 $Spink5^{A135X/A135X}$ observada en pacientes con síndrome de Netherton muestran síntomas cutáneos similares al síndrome de Netherton y la muerte se observa dentro de las 12 horas posteriores al nacimiento, mientras que la barrera cutánea y los síntomas cutáneos graves mejoran en $Klk5^{-/-}$ $Spink5^{A135X/A135X}$ obtenido cruzando con ratones deficientes en KLK5 (literatura no de patente 7). Además, los síntomas cutáneos anormales se eliminan cruzando con ratones deficientes en KLK7 ($Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}Spink5^{A135X/A135X}$). Se ha informado de que los ratones transgénicos KLK5 también muestran síntomas cutáneos similares al síndrome de Netherton (literatura no de patente 8). Se observa una alta actividad de proteasas como tripsina y quimotripsina en el estrato córneo de pacientes con síndrome de Netherton y ratones modelo con síndrome de Netherton, y se sugiere que la familia de calicreínas ubicada aguas abajo, tal como KLK7 y KLK14, está relacionada con la actividad de proteasa en el estrato córneo, además de KLK5. De lo anterior, se considera que el síndrome de Netherton es causado por una mutación genética de SPINK5 y se desarrolla con actividad de proteasa KLK5, KLK7 o KLK14 anormalmente elevada en la córnea. Actualmente, no existe un agente terapéutico fundamental sino solo un tratamiento sintomático como la aplicación de humectantes.

También se ha sugerido que KLK5 está asociado con la rosácea, que es una enfermedad inflamatoria

crónica de la cara. En pacientes con rosácea, se ha informado un aumento de la expresión de KLK5 y del péptido antimicrobiano catelicidina. Aunque se desconocen los detalles de su etiología, se considera que KLK5 con
5 expresión elevada degrada la catelicidina, produciendo así un péptido que causa rosácea (literatura no de patente 9).

Hay varios reportes de que los polimorfismos de SPINK5 están asociados con la gravedad de la dermatitis atópica
10 (literatura no de patente 10 a 14). Se ha informado que, en la piel de pacientes con dermatitis atópica que tienen genes SPINK5 que codifican para LEKTI en los que el residuo de aminoácido 420 es lisina en ambos alelos, la expresión de Desmogleína1 está disminuida a nivel de proteína y la actividad
15 de proteasas, incluyendo KLK5 y KLK7, está aumentada, en comparación con el caso en donde el ácido glutámico está codificado en ambos alelos (literatura no de patente 15). Se considera que la activación de estas proteasas facilita la invasión de alérgenos debido a una disminución de la función
20 de barrera cutánea y crea una condición en donde se produce fácilmente una reacción inflamatoria.

SPINK2 (inhibidor de serina proteasa Kazal-tipo 2) está compuesto por un dominio similar a Kazal que tiene tres enlaces disulfuro y funciona como un inhibidor de
25 tripsina/acrosina (literatura no de patente 16), pero la

relación de SPINK2 y sus mutantes con enfermedades como Netherton síndrome, rosácea y dermatitis atópica no se han aclarado.

Lista de citas

5 Literaturas no de patente

Literatura no de patente 1: Ovaere P, *et al.*, publicado en 2009, Trends Biochem Sci., Vol. 34, No. 9: pp. 453, 463

10 Literatura no de patente 2: Descargues P, *et al.*, publicado en 2005, Nat Genet., Vol. 37, No. 1: pp.56, 65

Literatura no de patente 3: Rattenholl A, *et al.*, publicado en 2008, Drug News Perspect., Vol. 21, No. 7: pp. 369, 381

15 Literatura no de patente 4: Hovnanian A., publicado en 2013, Cell Tissue Res., Vol. 351, No. 2: pp.289, 300

Literatura no de patente 5: Sarri CA, *et al.*, publicado en 2017, Mol Diagn Ther., Vol. 21, No. 2: pp.137, 152

20 Literatura no de patente 6: Furio L, *et al.*, publicado en 2015, PLoS Genet., Vol. 11, número 9: e1005389

Literatura no de patente 7: Kasperek P, *et al.*, publicado en 2017, PLoS Genet., Vol. 13, número 1: e1006566

Literatura no de patente 8: Furio L, *et al.*, publicado en 2014, J Exp Med., Vol. 211, No. 3: pp.499, 513

25 Literatura no de patente 9: Yamasaki K, *et al.*,

publicado en 2007, Nat Med., Vol. 13, No. 8: pp.975, 980

Literatura no de patente 10: Nishio Y, *et al.*,
publicado en 2003, Genes Immun., Vol. 4, No. 7: pp. 515, 517

Literatura no de patente 11: Kusunoki T, *et al.*,
5 publicado en 2005, J Allergy Clin Immunol., Vol. 4, No. 7: pp.
515, 517

Literatura no de patente 12: Lan CC, *et al.*,
publicado en 2011, Exp Dermatol., Vol. 20, No. 12: pp.

Literatura no de patente 13: Kato A, *et al.*,
10 publicado en 2003, Br J Dermatol., Vol. 148, No. 4: pp. 665-
669

Literatura no de patente 14: Zhao LP, *et al.*,
publicado en 2012, J Eur Acad Dermatol Venereol., Vol. 26, No.
5: pp.

15 Literatura no de patente 15: Fortugno P, *et al.*,
publicado en 2012, Hum Mol Genet., Vol. 21, No. 19: pp.4187-
4200

Literatura no de patente 16: Chen T, *et al.*,
publicado en 2009, Proteins., Vol. 77, No. 1: pp.209, 219

20 Breve Descripción de la Invención

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar
un péptido inhibidor de KLK5 novedoso, un conjugado que
contenga el péptido, una composición farmacéutica que contenga
25 el péptido o el conjugado, y similares.

Solución al problema

La presente invención se refiere a:

- (1) Un péptido mutante de SPINK2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 61 (Figura 5 69) e inhibe la actividad proteasa de KLK5 humana activa;
- (2) El péptido de acuerdo con (1), en donde el péptido inhibe la actividad proteasa de KLK7 humana o KLK14 humana;
- (3) El péptido de acuerdo con (1), en donde el péptido inhibe selectivamente la KLK5 humana y, opcionalmente, la KLK7 10 o KLK14 humana;
- (4) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), en donde Xaa16 (X_1) es Ala, Asp, Gly, Gln, Leu, Ser o Thr;
- (5) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en donde Xaa17 (X_2) es Arg, Glu, Asn, Gln o Ser;
- 15 (6) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (5), en donde Xaa18 (X_3) es Asp, Gln, Ile, Thr, Trp o Tyr;
- (7) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (6), en donde Xaa19 (X_4) es Arg, Gly, Met, Gln o Thr;
- (8) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a 20 (7), en donde Xaa20 (X_5) es Asp, Glu, Leu, Lys, Thr o Tyr;
- (9) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (8), en donde Xaa21 (X_6) es Glu, Gly, His, Leu, Ser, Gln o Tyr;
- (10) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (9), en donde Xaa22 (X_7) es Asp, Gly, Gln, Ser o Tyr;
- 25 (11) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a

(10), en donde Xaa24 (X_8) es Ala, Asp, Glu, Gly, Asn, Ser o Thr;

(12) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (11), en donde Xaa25 (X_9) es Arg o Lys;

5 (13) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (12), en donde Xaa26 (X_{10}) es Asp, Glu, Gln, Ser, o Val;

(14) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (13), en donde Xaa27 (X_{11}) es Phe o Tyr;

(15) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a
10 (14), en donde Xaa28 (X_{12}) es Asp o Glu;

(16) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (15), en donde el péptido comprende los aminoácidos en las posiciones 1 a 63 en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID N0s.: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20
15 (Figuras 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28);

(17) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), en donde Xaa16 (X_1) es Gly, Met o Tyr;

(18) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (17), en donde Xaa17 (X_2) es Glu, Gln o Thr;

20 (19) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), (17) y (18), en donde Xaa18 (X_3) es His, Met o Tyr;

(20) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (17) a (19), en donde Xaa19 (X_4) es Ala, Arg, Lys o Gln;

(21) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a
25 (3) y (17) a (20), en donde Xaa20 (X_5) es Gly, Arg o Ser;

- (22) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (17) a (21), en donde Xaa21 (X_6) es Arg, Lys, Gln o Ser;
- (23) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (17) a (22), en donde Xaa22 (X_7) es Gly;
- 5 (24) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (17) a (23), en donde Xaa24 (X_8) es His, Thr o Tyr;
- (25) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (17) a (24), en donde Xaa25 (X_9) es His o Tyr;
- (26) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a
10 (3) y (17) a (25), en donde Xaa26 (X_{10}) es Asp, Glu o His;
- (27) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (17) a (26), en donde Xaa27 (X_{11}) es Tyr;
- (28) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (17) a (27), en donde Xaa28 (X_{12}) es Asp o Glu;
- 15 (29) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (17) a (28), en donde el péptido comprende los aminoácidos en las posiciones 1 a 63 en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID N0s.: 22, 24, 26 y 28 (Figuras 30, 32, 34 y 36);
- 20 (30) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), en donde Xaa16 (X_1) es Gly, Ser o Tyr;
- (31) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (30), en donde Xaa17 (X_2) es Asp o Gln;
- (32) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a
25 (3), (30) y (31), en donde Xaa18 (X_3) es Thr o Val;

(33) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (30) a (32), en donde Xaa19 (X_4) es Thr o Val;

(34) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (30) a (33), en donde Xaa20 (X_5) es Glu o Thr;

5 (35) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (30) a (34), en donde Xaa21 (X_6) es His o Thr;

(36) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (30) a (35), en donde Xaa22 (X_7) es Tyr;

10 (37) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (30) a (36), en donde Xaa24 (X_8) es Asn o Ser;

(38) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (30) a (37), en donde Xaa25 (X_9) es Arg;

(39) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (30) a (38), en donde Xaa26 (X_{10}) es Asp o Glu;

15 (40) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (30) a (39), en donde Xaa27 (X_{11}) es Tyr;

(41) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (30) a (40), en donde Xaa28 (X_{12}) es Asp;

20 (42) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) y (30) a (41), en donde el péptido comprende los aminoácidos en las posiciones 1 a 63 en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID NOs.: 30 y 32 (Figuras 38 y 40);

25 (43) El péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (42), en donde el péptido tiene tres enlaces disulfuro y tiene

una estructura tridimensional caracterizada por incluir una estructura de bucle, una hélice α y una lámina β ;

(44) Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos
5 del péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (43);

(45) Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con (44);

(46) Una célula que comprende el polinucleótido de acuerdo con (44) o el vector de acuerdo con (45) o produce el
10 péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (43);

(47) Un método para producir un péptido mutante de SPINK2, que comprende los pasos (i) y (ii) siguientes: (i) cultivar la célula de acuerdo con (46); y (ii) recolectar el péptido mutante de SPINK2 del cultivo;

15 (48) Un método para producir el péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (43), que comprende un paso de preparación del péptido mediante síntesis química o traducción *in vitro*;

(49) Un péptido mutante de SPINK2 obtenido por el
20 método de acuerdo con (47) o (48);

(50) Un conjugado que comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (43) y (49) en donde el péptido está unido por uno y opcionalmente más de un resto;

(51) El conjugado de acuerdo con (50), en donde uno
25 o más restos opcionales comprenden un segundo péptido que no

es el mutante de SPINK2;

(52) El conjugado de acuerdo con (51), en donde el segundo péptido está ubicado en el lado amino-terminal del mutante de SPINK2;

5 (53) El conjugado de acuerdo con (51), en donde el segundo péptido está situado en el lado carboxi-terminal del mutante de SPINK2;

(54) El conjugado de acuerdo con cualquiera de (51) a (53), en donde el segundo péptido es un anticuerpo o un
10 fragmento del mismo y comprende una o más regiones Fc;

(55) El conjugado de acuerdo con (54), en donde la o cada región Fc es una región Fc de inmunoglobulina humana, o un fragmento de la misma;

(56) El conjugado de acuerdo con (54) o (55), en
15 donde la o cada región Fc es una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD y/o IgE, o un fragmento de la misma;

(57) El conjugado de acuerdo con cualquiera de (54) a (56), en donde la o cada región Fc es una región Fc de IgG1 humana, o un fragmento de la misma;

20 (58) El conjugado de acuerdo con (57), en donde la o cada región Fc de la IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 87 (Figura 95);

(59) El conjugado de acuerdo con cualquiera de (54) a (57), en donde la o cada región Fc es una región Fc tipo
25 salvaje o mutante;

(60) El conjugado de acuerdo con cualquiera de (51) a (59), en donde el conjugado comprende de uno a varios ácidos aspárticos y/o ácidos glutámicos añadidos al extremo amino-terminal del mismo;

5 (61) El conjugado de acuerdo con cualquiera de (50) a (60), en donde el conjugado comprende la secuencia de aminoácidos descrita en (i) o (ii) más adelante: (i) la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID NOS.: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y
10 96 (Figuras 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68 y 106); o (ii) la secuencia de aminoácidos de un conjugado que es 90% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en (i) anteriormente e inhibe la actividad proteasa de KLK5;

15 (62) El conjugado de acuerdo con cualquiera de (51) a (61), en donde el mutante de SPINK2 y el segundo péptido están unidos entre sí mediante un enlazador;

(63) El conjugado de acuerdo con (62), en donde el enlazador es un tercer péptido que no es el mutante de SPINK2
20 ni el segundo péptido;

(64) Un método para producir el conjugado de acuerdo con cualquiera de (50) a (63), que comprende los pasos (i) y (ii) más adelante: (i) cultivar una célula que comprenda un polinucleótido que comprenda una secuencia de nucleótidos que
25 codifique para una secuencia de aminoácidos del conjugado o un

vector en el que se inserte el polinucleótido; y (ii) recolectar un conjugado de péptido mutante de SPINK2 o un resto de péptido comprendido en el conjugado del cultivo;

(65) Un método para producir el conjugado de péptido mutante de SPINK2 de acuerdo con cualquiera de (50) a (63), que comprende un paso de preparar el conjugado o un resto peptídico comprendido en el conjugado mediante síntesis química o traducción *in vitro*;

(66) Un conjugado de péptido mutante de SPINK2 obtenido por el método de acuerdo con (64) o (65);

(67) Un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo que se une al péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (43) y (49);

(68) Una composición que comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (43) y (49), el polinucleótido de acuerdo con (44), el vector de acuerdo con (45), la célula de acuerdo con (46), el conjugado de acuerdo con cualquiera de (50) a (63) y (66), y/o el anticuerpo o el fragmento de unión del mismo de acuerdo con (67);

(69) Una composición farmacéutica que comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (43) y (49), el polinucleótido de acuerdo con (44), el vector de acuerdo con (45), la célula de acuerdo con (46), y/o el conjugado de acuerdo con cualquiera de (50) a (63) y (66);

(70) La composición farmacéutica de acuerdo con (69),

para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con KLK5;

(71) La composición farmacéutica de acuerdo con (70),
en donde la enfermedad relacionada con KLK5 es síndrome de
Netherton, dermatitis atópica, rosácea, lesión cutánea
5 inducida por UV, psoriasis, asma, lesión de la médula espinal,
cáncer o esófago de Barrett;

(72) La composición farmacéutica de acuerdo con
cualquiera de (69) a (71), para uso en combinación con un
producto farmacéutico adicional;

10 (73) Una composición para ensayo o diagnóstico que
comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de (1) a (43) y
(49), el polinucleótido de acuerdo con (44), el vector de
acuerdo con (45), la célula de acuerdo con (46), el conjugado
de acuerdo con cualquiera de (50) a (63) y (66), y/o el
15 anticuerpo o el fragmento de unión del mismo de acuerdo con
(67);

(74) El método de acuerdo con cualquiera de (47),
(48), (64) y (65), que comprende un paso de llevar a cabo
purificación por afinidad usando el anticuerpo o el fragmento
20 de unión del mismo de acuerdo con (67);

(75) Un método para identificar un péptido mutante
de SPINK2 inhibidor de KLK5, que comprende los pasos (i) a
(iii) siguientes: (i) incubar una proteasa KLK5 y un sustrato
en presencia y ausencia de un péptido mutante de SPINK2 de
25 prueba; (ii) medir la actividad proteasa de KLK5 en presencia

y ausencia del péptido mutante de SPINK2 de prueba; y (iii) determinar que el péptido sea positivo cuando la actividad proteasa de KLK5 en presencia del péptido sea menor que la actividad proteasa de KLK5 en ausencia del péptido;

5 (76) Un método para identificar un compuesto inhibidor de KLK5, que comprende los pasos (i) a (iii) más adelante, usando un péptido que comprenda la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID NOs.: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 (Figuras 14, 10 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40) o un conjugado que comprenda el péptido como compuesto de referencia: (i) incubar una proteasa KLK5 y un sustrato en presencia y ausencia de un compuesto de prueba; (ii) medir la actividad proteasa de KLK5 en presencia y ausencia del 15 compuesto de prueba; y (iii) determinar que el compuesto de prueba sea positivo cuando la actividad de proteasa de KLK5 en presencia del compuesto de prueba sea menor que la actividad de proteasa de KLK5 en ausencia del compuesto de prueba;

 (77) Un método para identificar un compuesto 20 inhibidor de KLK5, que comprende los pasos (i) a (iii) siguientes: (i) medir una actividad inhibidora de proteasa contra KLK5 de un compuesto de prueba; (ii) medir una actividad inhibidora de proteasa contra KLK5 de un compuesto de referencia que sea un péptido que comprenda la secuencia de 25 aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID NOs.: 6, 8,

10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 (Figuras 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40) o un conjugado que comprenda el péptido; y (iii) determinar que el compuesto de prueba sea positivo cuando la actividad inhibidora de proteasa contra KLK5 del compuesto de prueba sea equivalente o superior a la actividad inhibidora de proteasa contra KLK5 del compuesto de referencia;

(78) Un método para medir la actividad de la proteasa KLK5, que comprende los pasos (i) y (ii) siguientes, usando un péptido que comprenda la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID N0s.: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 (Figuras 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40) o un conjugado que comprenda el péptido como compuesto de referencia: (i) incubar una proteasa KLK5 con un sustrato y, opcionalmente, otro componente; y (ii) medir una cantidad del sustrato y/o una cantidad de un producto después del paso (i);

(79) Un péptido mutante de SPINK2 inhibidor de KLK5 o un conjugado de péptido mutante de SPINK2, que tiene una constante de disociación (K_D) para KLK5, medida por análisis de resonancia de plasmón de superficie inmovilizando el péptido o el conjugado y agregando KLK5 al mismo, de 1×10^{-9} M o menos;

(80) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID N0.: 34 (Figura 42);

(81) Un conjugado que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 36 (Figura 44);

(82) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 38 (Figura 46);

(83) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 40 (Figura 48);

(84) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 42 (Figura 50);

(85) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 44 (Figura 52);

(86) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 46 (Figura 54);

(87) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 48 (Figura 56);

(88) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 50 (Figura 58);

(89) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 52 (Figura 60);

(90) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 54 (Figura 62);

(91) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 56 (Figura 64);

(92) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 58 (Figura 66);

(93) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 60 (Figura 68); y

(94) Un conjugado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 96 (Figura 106).

Efectos adecuados de la invención

Un péptido proporcionado por la presente invención,
5 un conjugado que contiene el péptido y una composición farmacéutica que contiene el péptido o el conjugado tienen actividad inhibidora de KLK5 y son útiles para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con KLK5 (que se describirán más adelante).

10 Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 incluye vistas para comparar las similitudes en las secuencias de aminoácidos de KLK5, KLK7 y KLK14 humanos.

La Figura 2 incluye gráficas que muestran la
15 actividad inhibidora de KLK5 (concentración inhibidora del 50%: IC_{50}) de cada péptido inhibidor de KLK5, usando la tasa de degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar la actividad inhibidora de KLK5 se usó KLK5 con una concentración final de 10 nM y Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D
20 Systems, Inc., ES011) con una concentración final de 100 μ M.

La Figura 3A incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada péptido inhibidor con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar la actividad inhibidora de la tripsina bovina, se
25 usaron tripsina (Pierce, 20233) con una concentración final de

5 nM y un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) con una concentración final de 100 μ M. Para evaluar la actividad inhibidora de la tripsina humana, se usaron tripsina (Sigma-Aldrich Co. LLC, T6424) con una
5 concentración final de 1 nM y un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) con una concentración final de 100 μ M. Para evaluar la actividad inhibidora de la α -quimotripsina bovina, se usaron quimotripsina (Worthington Biochemical Corporation, LS001434) con una concentración final
10 de 10 nM y un sustrato péptido Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3120-v) con una concentración final de 100 μ M.

La Figura 3B incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada péptido inhibidor con proteasas,
15 usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar la actividad inhibidora de la quimotripsina humana, se usaron quimotripsina (Sigma-Aldrich Co. LLC, C8946) con una concentración final de 10 nM y un sustrato péptido Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3120-v) con una
20 concentración final de 10 μ M. Para evaluar la actividad inhibidora de la triptasa humana, se usaron triptasa (Sigma-Aldrich Co. LLC, T7063) con una concentración final de 1 nM y un sustrato péptido Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3107-v) con una concentración final de 100 μ M. Para
25 evaluar la actividad inhibidora de la quimasa humana, se usaron

quimasa (Sigma-Aldrich Co. LLC, C8118) con una concentración final de 100 nM y un sustrato péptido Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3120-v) con una concentración final de 100 μ M.

5 La Figura 3C incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada péptido inhibidor con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar la actividad inhibidora de la plasmina humana, se usaron plasmina (Sigma-Aldrich Co. LLC, P1867) con una
10 concentración final de 50 nM y un sustrato péptido Boc-Val-Leu-Lys-MCA (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3104-v) con una concentración final de 100 μ M. Para evaluar la actividad inhibidora de la trombina humana, se usaron trombina (Sigma-Aldrich Co. LLC, T6884) con una concentración final de 1 nM y
15 un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) con una concentración final de 100 μ M. Para evaluar la actividad inhibidora de la elastasa de neutrófilos humanos, se usaron elastasa de neutrófilos (Enzo Life Sciences, BML-SE284) con una concentración final de 0.00001 U/ μ L y un sustrato
20 péptido Suc (OMe)-Ala-Ala-Pro-Val-MCA (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3153-v) con una concentración final de 100 μ M.

 La figura 3D incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada péptido inhibidor con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice.
25 Para evaluar la actividad inhibidora de la matriptasa humana,

se usaron matriptasa (R&D Systems, Inc., 3946-SE) con una concentración final de 1 nM y un sustrato péptido Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES014) con una concentración final de 100 μ M. Para evaluar la actividad inhibidora de la proteína

5 C humana, se usaron proteína C (Sigma-Aldrich Co. LLC, P2200) con una concentración final de 100 nM y un sustrato péptido Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3112-v) con una concentración final de 100 μ M. Para evaluar la actividad inhibidora de tPA humano, se usaron tPA (Sigma-Aldrich Co. LLC,

10 T0831) con una concentración final de 10 nM y un sustrato péptido Pyr-Gly-Arg-MCA (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3145-v) con una concentración final de 100 μ M.

La Figura 3E incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada péptido inhibidor con proteasas,

15 usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar la actividad inhibidora de uPA humana, se usaron uPA (Sigma-Aldrich Co. LLC, U0633) con una concentración final de 2 nM y un sustrato péptido Pyr-Gly-Arg-MCA (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3145-v) con una concentración final de 100

20 μ M. Para evaluar la actividad inhibidora de la calicreína plasmática humana, se usaron calicreína plasmática (R&D Systems, Inc., 2497-SE) con una concentración final de 0.125 μ g/mL y un sustrato péptido Z-Phe-Arg-MCA (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3095-v) con una concentración final de 100 μ M.

25 La Figura 3F incluye gráficas para evaluar la

reactividad cruzada de cada péptido inhibidor con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar la actividad inhibidora de KLK1 humana, se usaron hKLK1 (R&D Systems, Inc., 2337-SE) con una concentración final
5 de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y un sustrato péptido Pro-Phe-Arg-MCA (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3096-v) con una concentración final de 100 μM . Para evaluar la actividad inhibidora de KLK2 humana, se usaron hKLK2 (R&D Systems, Inc., 4104-SE) con una concentración final de 2 $\mu\text{g/mL}$ y un sustrato péptido Pro-Phe-Arg-MCA (PEPTIDE
10 INSTITUTE, INC., 3096-v) con una concentración final de 100 μM . Para evaluar la actividad inhibidora de KLK4 humana, se usaron hKLK4 (R&D Systems, Inc., 1719-SE) con una concentración final de 1 $\mu\text{g/mL}$ y un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) con una concentración final de 100 μM .

15 La Figura 3G incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada péptido inhibidor con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar la actividad inhibidora de KLK7 humana, se usaron hKLK7 con una concentración final de 1 $\mu\text{g/mL}$ y un sustrato
20 péptido Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys (Dnp)-NH₂ (R&D Systems, Inc., ES002) con una concentración final de 20 μM . Para evaluar la actividad inhibidora de KLK8 humano, se usaron hKLK8 (UniProt: 060259, preparado por los inventores) con una concentración final de 5 nM y un sustrato péptido Boc-
25 Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) con una

concentración final de 100 μM . Para evaluar la actividad inhibidora de KLK12 humana, se usaron hKLK12 (R&D Systems, Inc., 3095-SE) con una concentración final de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) con una concentración final de 100 μM .

La Figura 3H incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada péptido inhibidor con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar la actividad inhibidora de KLK13 humana, se usaron hKLK13 (R&D Systems, Inc., 2625-SE) con una concentración final de 0.5 $\mu\text{g/mL}$, un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) con una concentración final de 100 μM y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm. Para evaluar la actividad inhibidora de KLK14 humana, se usaron hKLK14 con una concentración final de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ y un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) con una concentración final de 100 μM .

La Figura 4 es una vista que muestra un complejo de péptido inhibidor de KLK5/KLK5 obtenido por análisis de la estructura cristalina de rayos X. El péptido inhibidor K51034 se une a una región que contiene el sitio activo KLK5.

La Figura 5 incluye gráficas que muestran la actividad inhibidora de KLK5 (IC_{50}) de cada fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5, usando la tasa de degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar la actividad

inhibidora de KLK5 se usó KLK5 con una concentración final de 10 nM y Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) con una concentración final de 100 μ M.

La Figura 6A incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada fusión de péptido inhibidor Fc con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar las actividades inhibidoras de tripsina bovina, tripsina humana y α -quimotripsina bovina, se usaron las mismas condiciones que en la Figura 3A.

La Figura 6B incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada fusión de péptido inhibidor Fc con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar las actividades inhibidoras de quimotripsina humana, triptasa humana y quimasa humana, se usaron las mismas condiciones que en la Figura 3B.

La Figura 6C incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada fusión de péptido inhibidor Fc con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar las actividades inhibidoras de plasmina humana, trombina humana y elastasa de neutrófilos humanos, se usaron las mismas condiciones que en la Figura 3C.

La Figura 6D incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada fusión de péptido inhibidor Fc con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar las actividades inhibidoras de matriptasa

humana, proteína C humana y tPA humano, se usaron las mismas condiciones que en la Figura 3D.

La Figura 6E incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada fusión de péptido inhibidor Fc con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar las actividades inhibidoras de uPA humano y calicreína en plasma humano, se usaron las mismas condiciones que en la Figura 3E.

La Figura 6F incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada fusión de péptido inhibidor Fc con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar las actividades inhibidoras de KLK1 humana, KLK2 humana y KLK4 humana, se usaron las mismas condiciones que en la Figura 3F.

La Figura 6G incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada fusión de péptido inhibidor Fc con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar las actividades inhibidoras de KLK7 humana, KLK8 humana y KLK12 humana, se usaron las mismas condiciones que en la Figura 3G.

La Figura 6H incluye gráficas para evaluar la reactividad cruzada de cada fusión de péptido inhibidor Fc con proteasas, usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar las actividades inhibidoras de KLK13 humana y KLK14 humana, se usaron las mismas condiciones que en

la Figura 3H.

La Figura 7 es una gráfica que muestra un grupo administrado por fusión de péptido inhibidor de KLK5 Fc que suprime la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) en ratones modelo Crusty2. Con la mutación hetero (+/-) SPINK5, no se desarrolló inflamación de la piel, pero con la mutación homo (+/+) SPINK5, la inflamación de la piel se desarrolló fuertemente, lo que elevó el TEWL. La administración de la fusión del péptido Fc a los ratones Crusty2 con la mutación homo (+/+) SPINK5 mejoró la dermatitis y redujo la TEWL. El número de casos de ratones Crusty2 (+/-) fue de 9, y el número de casos de ratones Crusty2 (+/+) fue de 12, en cada uno del grupo al que se administró PBS y al grupo al que se administró D1-K50055-Fc. Las barras de error de la figura muestran errores estándar.

La Figura 8 incluye vistas para comparar las identidades de secuencia en SPINK2, D8 y D9 humanos de SPINK5 y SPINK9 humanos. Se sabe que D8 y D9 de SPINK5 humano y SPINK9 humano tienen actividades inhibitoras de KLK5 humano, pero se ve que las identidades de secuencia de aminoácidos con SPINK2 humana, para las cuales no hay informes sobre la actividad inhibidora de KLK5 humana, son bajas casos.

La Figura 9 es la secuencia de aminoácidos de SPINK2 humana (SEC. ID NO.: 1).

La Figura 10 es la secuencia de aminoácidos de KLK5

humana (SEC. ID NO.: 2).

La Figura 11 es la secuencia de aminoácidos de KLK7 humana (SEC. ID NO.: 3).

La Figura 12 es la secuencia de aminoácidos de KLK14 humana (SEC. ID NO.: 4).

La Figura 13 es la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5 K50032 (SEC. ID NO.: 5).

La Figura 14 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5 K50032 (SEC. ID NO.: 6).

La Figura 15 es la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5 K50055 (SEC. ID NO.: 7).

La Figura 16 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5 K50055 (SEC. ID NO.: 8).

La Figura 17 es la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5 K51072 (SEC. ID NO.: 9).

La Figura 18 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5 K51072 (SEC. ID NO.: 10).

La Figura 19 es la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5 K50016 (SEC. ID NO.: 11).

La Figura 20 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5 K50016 (SEC. ID NO.: 12).

La Figura 21 es la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5 K51034 (SEC. ID NO.: 13).

La Figura 22 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5 K51034 (SEC. ID NO.: 14).

La Figura 23 es la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5 K50062 (SEC. ID NO.: 15).

La Figura 24 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5 K50062 (SEC. ID NO.: 16).

5 La Figura 25 es la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5 K51090 (SEC. ID NO.: 17).

La Figura 26 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5 K51090 (SEC. ID NO.: 18).

10 La Figura 27 es la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5 K50098 (SEC. ID NO.: 19).

La Figura 28 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5 K50098 (SEC. ID NO.: 20).

La Figura 29 es la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 K51028 (SEC. ID NO.: 21).

15 La Figura 30 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 K51028 (SEC. ID NO.: 22).

La Figura 31 es la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 K51005 (SEC. ID NO.: 23).

20 La Figura 32 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 K51005 (SEC. ID NO.: 24).

La Figura 33 es la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 K50031 (SEC. ID NO.: 25).

La Figura 34 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 K50031 (SEC. ID NO.: 26).

25 La Figura 35 es la secuencia de nucleótidos del

péptido inhibidor de KLK5/KLK7 K51057 (SEC. ID NO.: 27).

La Figura 36 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 K51057 (SEC. ID NO.: 28).

La Figura 37 es la secuencia de nucleótidos del
5 péptido inhibidor de KLK5/KLK14 K51069 (SEC. ID NO.: 29).

La Figura 38 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 K51069 (SEC. ID NO.: 30).

La Figura 39 es la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 K50015 (SEC. ID NO.: 31).

10 La Figura 40 es la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 K50015 (SEC. ID NO.: 32).

La Figura 41 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50032dN-Fc (SEC. ID NO.: 33).

15 La Figura 42 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50032dN-Fc (SEC. ID NO.: 34).

La Figura 43 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50055-Fc (SEC. ID
20 NO.: 35).

La Figura 44 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50055-Fc (SEC. ID NO.: 36).

La Figura 45 es la secuencia de nucleótidos de la
25 fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K51072-Fc (SEC. ID

NO.: 37).

La Figura 46 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K51072-Fc (SEC. ID NO.: 38).

5 La Figura 47 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50016dN-Fc (SEC. ID NO.: 39).

La Figura 48 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50016dN-Fc (SEC. ID NO.: 40).

La Figura 49 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K51034-Fc (SEC. ID NO.: 41).

La Figura 50 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K51034-Fc (SEC. ID NO.: 42).

La Figura 51 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50062-Fc (SEC. ID NO.: 43).

20 La Figura 52 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50062-Fc (SEC. ID NO.: 44).

La Figura 53 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K51090-Fc (SEC. ID NO.: 45).

25

La Figura 54 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K51090-Fc (SEC. ID NO.: 46).

La Figura 55 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50098dN-Fc (SEC. ID NO.: 47).

La Figura 56 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50098dN-Fc (SEC. ID NO.: 48).

La Figura 57 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K51028-Fc (SEC. ID NO.: 49).

La Figura 58 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K51028-Fc (SEC. ID NO.: 50).

La Figura 59 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K51005-Fc (SEC. ID NO.: 51).

La Figura 60 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K51005-Fc (SEC. ID NO.: 52).

La Figura 61 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K50031-Fc (SEC. ID NO.: 53).

La Figura 62 es la secuencia de aminoácidos de la

fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K50031-Fc (SEC. ID NO.: 54).

La Figura 63 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K51057-Fc (SEC. ID NO.: 55).

La Figura 64 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K51057-Fc (SEC. ID NO.: 56).

La Figura 65 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 D3-K51069dN-Fc (SEC. ID NO.: 57).

La Figura 66 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 D3-K51069dN-Fc (SEC. ID NO.: 58).

La Figura 67 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 D3-K50015-Fc (SEC. ID NO.: 59).

La Figura 68 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 D3-K50015-Fc (SEC. ID NO.: 60).

La Figura 69 es la fórmula del péptido mutante de SPINK2 (SEC. ID NO.: 61).

La Figura 70 es la secuencia de nucleótidos del cebador 1 (SEC. ID NO.: 62).

La Figura 71 es la secuencia de nucleótidos del

cebador 2 (SEC. ID NO.: 63).

La Figura 72 es la secuencia de nucleótidos del
cebador 3 (SEC. ID NO.: 64).

La Figura 73 es la secuencia de nucleótidos del
5 cebador 4 (SEC. ID NO.: 65).

La Figura 74 es la secuencia de nucleótidos del
cebador 5 (SEC. ID NO.: 66).

La Figura 75 es la secuencia de nucleótidos del
cebador 6 (SEC. ID NO.: 67).

10 La Figura 76 es la secuencia de nucleótidos del
cebador 7 (SEC. ID NO.: 68).

La Figura 77 es la secuencia de nucleótidos del
cebador 8 (SEC. ID NO.: 69).

La Figura 78 es la secuencia de nucleótidos del
15 cebador 9 (SEC. ID NO.: 70).

La Figura 79 es la secuencia de nucleótidos del
cebador 10 (SEC. ID NO.: 71).

La Figura 80 es la secuencia de nucleótidos del
cebador 11 (SEC. ID NO.: 72).

20 La Figura 81 es la secuencia de nucleótidos del
cebador 12 (SEC. ID NO.: 73).

La Figura 82 es la secuencia de nucleótidos del
cebador 13 (SEC. ID NO.: 74).

La Figura 83 es la secuencia de nucleótidos del
25 cebador 14 (SEC. ID NO.: 75).

La Figura 84 es la secuencia de nucleótidos del cebador 15 (SEC. ID NO.: 76).

La Figura 85 es el péptido sustrato KLK7 (la secuencia de aminoácidos se muestra en SEC. ID NO.: 77).

5 La Figura 86 es el péptido sustrato de α -quimotripsina bovina (la secuencia de aminoácidos se muestra en SEC. ID NO.: 78).

La Figura 87 es el péptido sustrato de elastasa de neutrófilos (la secuencia de aminoácidos se muestra en SEC. ID
10 NO.: 79).

La Figura 88 es el péptido sustrato de la proteína C humana (la secuencia de aminoácidos se muestra en SEC. ID NO.: 80).

La Figura 89 es la secuencia de nucleótidos del
15 cebador 16 (SEC. ID NO.: 81).

La Figura 90 es la secuencia de nucleótidos del cebador 17 (SEC. ID NO.: 82).

La Figura 91 es la secuencia de nucleótidos del cebador 18 (SEC. ID NO.: 83).

20 La Figura 92 es la secuencia de nucleótidos del cebador 19 (SEC. ID NO.: 84).

La Figura 93 es la secuencia de nucleótidos del cebador 20 (SEC. ID NO.: 85).

La Figura 94 es la secuencia de nucleótidos del
25 cebador 21 (SEC. ID NO.: 86).

La Figura 95 es la secuencia de aminoácidos de Fc de IgG1 humana (SEC. ID NO.: 87).

La Figura 96 es la secuencia de aminoácidos de D8 de SPINK5 humana (SEC. ID NO.: 88).

5 La Figura 97 es la secuencia de aminoácidos de D9 de SPINK5 humana (SEC. ID NO.: 89).

La Figura 98 es la secuencia de aminoácidos de SPINK9 humana (SEC. ID NO.: 90).

La Figura 99 es la secuencia de aminoácidos de KLK5
10 de ratón (SEC. ID NO.: 91).

La Figura 100 es la secuencia de aminoácidos de KLK7 de ratón (SEC. ID NO.: 92).

La Figura 101 es la secuencia de aminoácidos de KLK14 de ratón (SEC. ID NO.: 93).

15 La Figura 102 incluye gráficas para evaluar la actividad inhibidora de KLK5 de cada fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 ($n = 3$, Media $\pm$ SD), usando la tasa de degradación de un sustrato peptídico como índice, para calcular las constantes de inhibición K_i . Para evaluar la actividad
20 inhibidora de KLK5 se usó KLK5 con una concentración final de 10 nM y Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) con una concentración final de 100 μ M.

La Figura 103A incluye diagramas para evaluar la actividad inhibidora de KLK5 de cada fusión Fc del péptido
25 inhibidor de KLK5, usando la degradación de Desmogleína1 humana

como índice. Para evaluar la actividad inhibidora de KLK5, se usaron KLK5 con una concentración final de 1 μ M y proteína quimera Fc Desmogleína-1 humana recombinante (R&D Systems, Inc., 944-DM-100) con una concentración final de 1 μ M. El análisis se llevó a cabo mediante Western blot usando Anticuerpo Desmogleína 1 (aa471-499) (LSBio, LS-C167542) e IgG anti-conejo, Fragmento de burro F(ab')₂ ligado a HRP (GE healthcare, NA9340V).

La Figura 103B incluye diagramas para evaluar la actividad inhibidora de KLK5 de cada fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5, usando la degradación de Desmocollin1 humana como índice. Para evaluar la actividad inhibidora de KLK5, se usaron KLK5 con una concentración final de 0.2 μ M y proteína Desmocollin-1 humana recombinante con una etiqueta His C-terminal (R&D Systems, Inc., 4955-DC-050) con una concentración final de 2 μ M. El análisis se llevó a cabo mediante Western blot usando Penta His HRP Conjugate (QIAGEN, 34460).

La Figura 104 es la secuencia de nucleótidos del cebador 22 (SEC. ID NO.: 94).

La Figura 105 es la secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D1-K50055-Fc (SEC. ID NO.: 95).

La Figura 106 es la secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D1-K50055-Fc (SEC. ID NO.: 96).

La Figura 107A es una gráfica que muestra la actividad inhibidora de KLK5 (IC_{50}) de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D1-K50055-Fc, usando la tasa de degradación de un sustrato peptídico como índice. Para evaluar la actividad
5 inhibidora de KLK5 se usaron KLK5 con una concentración final de 10 nM y Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) con una concentración final de 100 μ M.

La Figura 107B es una gráfica para evaluar la reactividad cruzada de la fusión Fc del péptido inhibidor de
10 KLK5 D1-K50055-Fc con KLK7, usando la tasa de degradación de un sustrato peptídico como índice. Se usaron las mismas condiciones que en la Figura 3G.

La Figura 107C es una gráfica para evaluar la reactividad cruzada de la fusión Fc del péptido inhibidor de
15 KLK5 D1-K50055-Fc con KLK14, usando la tasa de degradación de un sustrato peptídico como índice. Se usaron las mismas condiciones que en la Figura 3H.

Descripción Detallada de la Invención

1. Definición

20 En la presente invención, el término "gen" significa una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de una proteína o una hebra complementaria de la misma. El significado de "gen" incluye una asociación monocatenaria,
25 bicatenaria o triple o más de una cadena de ADN y una cadena

de ARN, y una mezcla de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos en una cadena y doble o triple o más moléculas de ácido nucleico de cadena que contienen tales cadenas.

5 En la presente invención, "gen", "polinucleótido" y "moléculas de ácido nucleico" tienen el mismo significado y no están limitados en absoluto por el número de ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos, nucleósidos y similares, que son sus unidades constituyentes. Por ejemplo, ADN, ARN,
10 ARNm, ADNc, ARNc, sonda, oligonucleótido, cebador y similares también se incluyen dentro del alcance de estos términos. Las "moléculas de ácido nucleico" pueden abreviarse como "ácidos nucleicos".

 En la presente invención, "polipéptido", "péptido" y
15 "proteína" tienen el mismo significado.

 En la presente invención, un péptido que reconoce la molécula objetivo X o se une a la molécula objetivo X (en lo sucesivo, la acción de reconocimiento o unión se denominará colectivamente como "actividad de unión a X") puede denominarse
20 "péptido de unión a X". Además, un péptido que reconoce la molécula objetivo X o se une a la molécula objetivo X e inhibe o suprime una o más actividades o funciones de la molécula objetivo X (en adelante, la acción inhibidora o supresora se denominará colectivamente actividad inhibidora de X ") puede
25 denominarse "péptido inhibidor de X".

En la presente invención, "SPINK2" significa inhibidor de serina proteasa Kazal-tipo 2, que es una proteína de 7 kDa compuesta por un dominio similar a Kazal que tiene tres enlaces disulfuro. SPINK2 se deriva preferiblemente de seres humanos. En la presente invención, SPINK2 humana (SEC. ID NO.: 1, Figura 9) se denominará simplemente "SPINK2", a menos que se indique lo contrario.

En la presente invención, "KLK5" es una proteína compuesta por un propéptido N-terminal y un dominio activo de proteasa y que tiene actividades proteasas tipo tripsina y quimotripsina con cadenas de azúcar tipo N añadidas en tres sitios. KLK5 se deriva preferiblemente de seres humanos. En la presente invención, la KLK5 humana (SEC. ID NO.: 2, Figura 10) puede denominarse simplemente "KLK5", a menos que se indique lo contrario.

En la presente invención, "KLK7" es una proteína compuesta por un propéptido N-terminal y un dominio similar a tripsina que tiene actividad proteasa, con una cadena de azúcar tipo N añadida. KLK7 se deriva preferiblemente de seres humanos. En la presente invención, la KLK7 humana (SEC. ID NO.: 3, Figura 11) puede denominarse simplemente "KLK7", a menos que se indique lo contrario.

En la presente invención, "KLK14" también se denomina neuropsina y es una proteína compuesta por un propéptido N-terminal y un dominio similar a tripsina que tiene actividad

proteasa, con una cadena de azúcar tipo N añadida. KLK14 se deriva preferiblemente de seres humanos. En la presente invención, la KLK14 humana (SEC. ID NO.: 4, Figura 12) puede denominarse simplemente "KLK14", a menos que se indique lo
5 contrario.

En la presente invención, "KLK5 tipo precursor" significa pro-KLK5, que está compuesto por un propéptido y un dominio que tiene actividad proteasa. "KLK5 activo" significa KLK5 activo, que está compuesto por un dominio que tiene
10 actividad de proteasa. La KLK5 activa se deriva preferiblemente de seres humanos.

En la presente invención, "KLK7 tipo precursor" significa pro-KLK7, que está compuesto por un propéptido y un dominio que tiene actividad proteasa. "KLK7 activo" significa
15 KLK7 activo, que está compuesto por un dominio que tiene actividad proteasa. La KLK7 activa se deriva preferiblemente de seres humanos.

En la presente invención, "KLK14 tipo precursor" significa pro-KLK14, que está compuesto por un propéptido y un
20 dominio que tiene actividad proteasa. "KLK14 activo" significa KLK14 activo, que está compuesto por un dominio que tiene actividad de proteasa. El KLK14 activo se deriva preferiblemente de seres humanos.

En la presente invención, "péptido inhibidor de
25 KLK5", "péptido inhibidor de KLK5/KLK7" o "péptido inhibidor

de KLK5/KLK14" significa un péptido que inhibe o suprime una o más actividades o funciones de KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14, respectivamente.

El alcance de los términos "péptido inhibidor de
5 KLK5", "péptido inhibidor de KLK5/7" y "péptido inhibidor de
KLK5/KLK14" incluye fragmentos de ese péptido y conjugados
formados por la adición o unión de otros restos al péptido o
fragmentos. de los mismos que mantienen la actividad inhibidora
(de unión) de KLK5, la actividad inhibidora (de unión) de
10 KLK5/KLK7 o la actividad inhibidora (de unión) de KLK5/KLK14,
respectivamente. Es decir, "péptido inhibidor de KLK5",
"péptido inhibidor de KLK5/KLK7" o "péptido inhibidor de
KLK5/KLK14" incluye fragmentos, aductos y formas modificadas
(tal como conjugados) de ese péptido que mantienen la actividad
15 inhibidora (de unión) de KLK5, la actividad inhibidora (de
unión) de KLK5 y la actividad inhibidora (de unión) de KLK7, o
la actividad inhibidora (de unión) de KLK5 y la actividad
inhibidora (de unión) de KLK14, respectivamente.

En la presente invención, "sitios" a los que se une
20 el péptido, es decir, "sitios" reconocidos por el péptido,
significan secuencias de aminoácidos parciales consecutivas o
intermitentes o estructuras parciales de orden superior en las
moléculas objetivo a las que el péptido se une o reconoce. En
la presente invención, tales sitios pueden denominarse epítomos
25 o sitios de unión en las moléculas objetivo.

En la presente invención, las "células" incluyen diversas células derivadas de individuos animales, células subcultivadas, células cultivadas primarias, líneas celulares, células recombinantes, levaduras y microorganismos.

5 En la presente invención, "mutante de SPINK2" significa un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos formada sustituyendo uno o más aminoácidos con aminoácidos diferentes de los del tipo salvaje, suprimiendo uno o más aminoácidos del tipo salvaje, o insertando uno o más
10 aminoácidos que no se encuentran en el tipo salvaje (que se denominarán en lo sucesivo colectivamente "mutación"), en la secuencia de aminoácidos del SPINK2 tipo salvaje. Los "mutantes SPINK2" que tienen la actividad inhibidora de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5 y la actividad inhibidora de KLK7
15 (actividad inhibidora de KLK5/KLK7), o la actividad inhibidora de KLK5 y la actividad inhibidora de KLK14 (actividad inhibidora de KLK5/KLK14) se incluyen en péptidos inhibidores, péptidos inhibidores de KLK5/KLK7 o péptidos inhibidores de KLK5/KLK14. En la presente invención, la "inserción" puede
20 incluirse dentro del alcance de la "adición".

En la presente invención, "varios" en "uno a varios" significa tres a diez.

En la presente invención, la frase "hibridación en condiciones rigurosas" significa hibridación en una solución
25 que contiene 5 × SSC a 65°C y luego lavar en una solución

acuosa que contiene $2 \times \text{SSC}$ -SDS al 0.1% a 65°C durante 20 minutos, en una solución acuosa que contiene $0.5 \times \text{SSC}$ -0.1% SDS a 65°C durante 20 minutos, y en una solución acuosa que contiene $0.2 \times \text{SSC}$ -0.1% SDS a 65°C durante 20 minutos, o
5 hibridación en condiciones equivalentes a las condiciones anteriores. SSC significa una solución acuosa de NaCl 150 mM-citrato de sodio 15 mM, y " $n \times \text{SSC}$ " significa SSC de concentración n veces mayor.

En la presente invención, los términos "específico"
10 y "especificidad" tienen el mismo significado que "selectivo" y "selectividad", respectivamente, y son intercambiables. Por ejemplo, un péptido inhibidor específico de KLK5 tiene el mismo significado que un péptido inhibidor selectivo de KLK5, y un péptido inhibidor específico de KLK5 y KLK7 tiene el mismo
15 significado que un péptido inhibidor selectivo de KLK5 y KLK7, respectivamente.

2. Péptido

2-1. Aminoácido

El término "aminoácido" significa un compuesto
20 orgánico que contiene un grupo amino y un grupo carboxilo, y preferiblemente significa un α -aminoácido contenido como unidad constituyente en una proteína, más preferiblemente en una proteína natural. En la presente invención, los ejemplos más adecuados del aminoácido incluyen Ala, Arg, Asn, Asp, Cys,
25 Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr,

Trp, Tyr y Val, y el término "aminoácido" significa estos 20 aminoácidos en total, a menos que se indique lo contrario. Un total de estos 20 aminoácidos se puede llamar "aminoácidos naturales". El péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención contienen preferiblemente un aminoácido natural.

En la presente invención, los "residuos de aminoácido" pueden abreviarse como "aminoácidos".

Además, en la presente invención, el aminoácido puede ser un L-aminoácido, un D-aminoácido o una mezcla de los mismos (DL-aminoácido) pero significa L-aminoácido a menos que se indique lo contrario.

Los aminoácidos naturales se pueden clasificar, por ejemplo, en los siguientes grupos en función de las propiedades de sus cadenas laterales comunes:

(1) Grupo de aminoácidos hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu e Ile;

(2) Grupo de aminoácidos hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn y Gln;

(3) Grupo de aminoácidos ácidos: Asp y Glu;

(4) Grupo de aminoácidos básicos: His, Lys y Arg;

(5) Grupo de aminoácidos que afectan la orientación de la cadena principal: Gly y Pro; y

(6) Grupo de aminoácidos aromáticos: Trp, Tyr y Phe.

Sin embargo, la clasificación de los aminoácidos naturales no se limita a estos grupos.

En la presente invención, los aminoácidos naturales pueden sufrir una sustitución de aminoácidos conservadora.

5 El término "sustitución de aminoácidos conservadora" significa una sustitución con un aminoácido funcionalmente equivalente o similar. Una sustitución de aminoácidos conservadora en un péptido da como resultado un cambio estático en la secuencia de aminoácidos del péptido. Por ejemplo, uno o
10 más aminoácidos que tienen la misma polaridad actúan de manera funcionalmente equivalente, dando como resultado un cambio estático en la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, una sustitución dentro de un grupo puede considerarse conservadora en estructura y función. Sin embargo, como
15 resultará obvio para los expertos en la técnica, el papel desempeñado por un residuo de aminoácido específico se puede determinar en el contexto de la estructura tridimensional de las moléculas que contengan el aminoácido. Por ejemplo, un residuo de cisteína puede tomar una forma oxidada (disulfuro)
20 menos polar, en comparación con la forma reducida (tiol). Un resto alifático largo de una cadena lateral de arginina puede formar una característica importante desde el punto de vista estructural y funcional. Además, una cadena lateral que contenga un anillo aromático (tal como triptófano, tirosina y
25 fenilalanina) puede contribuir a interacciones ion-aromáticas

o interacciones catión-pi. En tal caso, incluso si los aminoácidos que tienen estas cadenas laterales están sustituidos con aminoácidos que pertenecen al grupo ácido o no polar, pueden ser estructural y funcionalmente conservadores.

5 Los residuos como prolina, glicina y cisteína (forma disulfuro) pueden tener un efecto directo sobre la estructura tridimensional de la cadena principal y, a menudo, no pueden sustituirse sin distorsión estructural.

La sustitución de aminoácidos conservadora incluye
10 sustituciones específicas (L. Lehninger, Biochemistry, 2a edición, pp. 73-75, Worth Publisher, Nueva York (1975)) y sustituciones típicas basadas en la similitud en las cadenas laterales, tal como se muestra más adelante:

(1) Grupo de aminoácidos no polares: alanina (que en
15 lo sucesivo se denominará "Ala" o simplemente "A"), valina (que en lo sucesivo se denominará "Val" o simplemente "V"), leucina (que en lo sucesivo se denominará "Leu" o simplemente "L"), isoleucina (que se denominará en lo sucesivo "Ile" o simplemente "I"), prolina (que en lo sucesivo se denominará
20 "Pro" o simplemente "P"), fenilalanina ("Phe" o simplemente "F"), triptófano (que en lo sucesivo se denominará "Trp" o simplemente "W") y metionina (que en lo sucesivo se denominará "Met" o simplemente "M");

(2) Grupo de aminoácidos polares sin carga: glicina
25 (que en lo sucesivo se denominará "Gly" o simplemente "G"),

serina (que en lo sucesivo se denominará "Ser" o simplemente "S"), treonina (que se denominará en lo sucesivo como "Thr" o simplemente "T"), cisteína (que se denominará en lo sucesivo como "Cys" o simplemente "C"), tirosina (que se denominará en lo sucesivo como "Tyr" o simplemente "Y"), asparagina (que en lo sucesivo se denominará "Asn" o simplemente "N") y glutamina (que en lo sucesivo se denominará "Gln" o simplemente "Q");

(3) Grupo de aminoácidos ácidos: ácido aspártico (que en lo sucesivo se denominará "Asp" o simplemente "D") y ácido glutámico (que en lo sucesivo se denominará "Glu" o simplemente "E"); y

(4) Grupo de aminoácidos básicos: lisina (que en lo sucesivo se denominará "Lys" o simplemente "K"), arginina (que en lo sucesivo se denominará "Arg" o simplemente "R") e histidina (que se denominará en lo sucesivo "His" o simplemente "H").

En la presente invención, el aminoácido puede ser un aminoácido distinto de un aminoácido natural. Ejemplos de los mismos pueden incluir aminoácidos que se encuentran en péptidos o proteínas naturales, tales como selenocisteína, N-formilmetionina, pirrolidina, ácido piroglutámico, cistina, hidroxiprolina, hidroxilisina, tiroxina, O-fosfoserina, desmosina, β -alanina, sarcosina, ornitina, creatina, ácido γ aminobutírico, opina, teanina, ácido tricolomínico, ácido kaínico, ácido domoico y ácido acromélico, y otros aminoácidos

que no se encuentran en el mundo natural, tal como los aminoácidos N-terminales protegidos, incluidos norleucina, Ac-aminoácido, Boc-aminoácido, Fmoc-aminoácido, Trt-aminoácido y Z-aminoácido, aminoácidos protegidos C-terminal que incluyen
5 el aminoácido t-butil éster, bencil éster, ciclohexil éster y fluorenil éster, diamina, ω aminoácido, β aminoácido, γ aminoácido, derivados Tic de aminoácidos y ácido aminofosfónico. Sin embargo, no hay limitación para estos, y los aminoácidos distintos de los 20 "aminoácidos naturales"
10 mencionados anteriormente se denominarán colectivamente "aminoácidos no naturales" en la presente invención por conveniencia de la descripción.

2-2. Péptido inhibidor de KLK5, péptido inhibidor de KLK5/KLK7 y péptido inhibidor de KLK5/KLK14

15 El péptido de la presente invención tiene una actividad inhibidora de KLK5, una actividad inhibidora de KLK5/KLK7 o una actividad inhibidora de KLK5/KLK14.

KLK5, KLK7 y KLK14 a los que se dirige el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 y el
20 péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención se derivan preferiblemente de animales vertebrados, más preferiblemente mamíferos, además preferiblemente primates, óptimamente humanos. KLK5, KLK7 y KLK14 pueden purificarse a partir de tejidos o células, o prepararse mediante métodos
25 conocidos por los expertos en la técnica como métodos para

preparar proteínas tales como recombinación de genes, traducción *in vitro* y síntesis de péptidos. Una secuencia señal, una región Fc de una inmunoglobulina, una etiqueta, una etiqueta y similares se pueden unir a KLK5, KLK7 y KLK14. La actividad inhibidora de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5/KLK7 y la actividad inhibidora de KLK5/KLK14 pueden evaluarse usando las actividades de proteasa de KLK5, KLK5 y KLK7, y KLK5 y KLK14, como índices. Por ejemplo, cuando se permite que KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14, o un fragmento funcional del mismo coexista con un sustrato y el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención o un candidato de la misma, inhibición de KLK5, inhibición de KLK5/KLK7 o inhibición de KLK5/KLK14 ocurre cuando la actividad proteasa de KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14 es 70% o menos, 50% o menos, 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos, 5% o menos, 1% o menos, o 0%, en comparación con eso en presencia del control o en ausencia del inhibidor o el candidato del mismo. La actividad inhibidora es 30% o más, 50% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 99% o más, o 100%, respectivamente. La actividad inhibidora de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5/KLK7 y la actividad inhibidora de KLK5/KLK14 pueden variar dependiendo de las condiciones de reacción, el tipo de sustrato, la concentración y similares. Las condiciones de reacción pueden ejemplificarse mediante las descritas en

los Ejemplos, pero no se limitan a estos ejemplos. La actividad enzimática se puede evaluar agregando un péptido sustrato o una proteína sustrato a KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14 a una cierta concentración y dejándola reaccionar durante un
5 cierto tiempo y luego detectando la fluorescencia del péptido sustrato o la proteína de sustrato mediante SDS-PAGE, Western blot, cromatografía líquida o similares. Como amortiguador, se pueden usar amortiguador de fosfato salino (que se denominará en lo sucesivo "PBS"), amortiguador tris (tris 50 mM, pH 7 a
10 8.5, por ejemplo, pH 7.5) y similares, y pueden añadirse sales tales como NaCl (0 a 200 mM, por ejemplo, 200 mM), CaCl_2 (0 a 10 mM, por ejemplo, 2 mM), ZnCl_2 y Brij-35. Sin embargo, no hay limitación para estos.

La actividad inhibidora de KLK5, la actividad
15 inhibidora de KLK5/KLK7 y la actividad inhibidora de KLK5/KLK14 pueden representarse cada una por una constante de inhibición K_i . La actividad de la proteasa se mide añadiendo un péptido sustrato a una enzima a una determinada concentración y dejándola reaccionar durante un tiempo determinado y luego
20 detectando la fluorescencia del péptido sustrato. A partir de la actividad de proteasa en cada concentración de sustrato, la velocidad máxima de reacción $V_{\max}$ y la constante de Michaelis K_m se calculan de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten (Michaelis L, *et al.* (2011) *Biochemistry.*, Vol. 50, No. 39,
25 pp. 8264-8269). Además, la constante de inhibición K_i se

calcula a partir de la actividad de la proteasa cuando cada inhibidor se añade a una enzima a una determinada concentración de acuerdo con la ecuación de Morrison (Morrison JF. (1969) Biochim Biophys Acta., Vol. 185, No. 2, pp. 269-286). Ejemplos
5 del software usado para el cálculo pueden incluir GraphPad Prism (GraphPad Software Inc).

El sustrato de proteasa de KLK5, KLK7 y KLK5, o KLK5 y KLK14 no está específicamente limitado y puede ser un sustrato endógeno, un sustrato exógeno, un sustrato sintético
10 o similar. Los ejemplos del sustrato endógeno humano de KLK5 pueden incluir cininógeno o calistatina de bajo peso molecular, colágeno, desmogleína, desmocolina y catelicidina. Los ejemplos del sustrato endógeno humano de KLK7 pueden incluir Pro-KLK3, fibronectina y colágeno. Los ejemplos del sustrato
15 endógeno humano de KLK14 pueden incluir tPA, fibronectina y colágeno. También se puede usar como sustrato la gelatina obtenida mediante la desnaturalización térmica del colágeno. El sustrato sintético no está específicamente limitado, pero los ejemplos del mismo pueden incluir PFR-AMC y Boc-VPR-AMC.
20 En la presente invención, la actividad inhibidora de KLK5 (IC_{50} o K_i) del péptido inhibidor de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5 del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 y la actividad inhibidora de KLK5 y la actividad inhibidora de KLK14 del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 son cada una de 1 μM o menos,
25 preferiblemente 300 nM o menos, más preferiblemente 100 nM o

menos, más preferiblemente 30 nM, más preferiblemente 10 nM o menos. La actividad inhibidora de KLK7 del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 es preferiblemente de 1000 nM o menos, más preferiblemente 300 nM o menos, más preferiblemente 100 nM, además preferiblemente 30 nM o menos. Además, la clasificación del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 puede hacerse por el grado relativo de actividad inhibidora de KLK5 y la actividad inhibidora de KLK7 o la actividad inhibidora de KLK14 (cada una representada por IC_{50} o K_i). Los péptidos se clasifican preferiblemente en tres grupos: (i) la actividad inhibidora de KLK5 es menos de 0.5 veces la actividad inhibidora de KLK7 o la actividad inhibidora de KLK14; (ii) la actividad inhibidora de KLK5 es más de 0.5 veces y menos de 2 veces la actividad inhibidora de KLK7 o la actividad inhibidora de KLK14; y (iii) la actividad inhibidora de KLK5 es 2 veces o más la actividad inhibidora de KLK7 o la actividad inhibidora de KLK14, y los péptidos deseados pueden seleccionarse de estos grupos de acuerdo con su aplicación, tal como tratamiento.

Además, el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención preferiblemente no inhibe o suprime las actividades de proteasa distintas de KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14, respectivamente, o el grado de inhibición o supresión de las otras actividades de proteasa es preferiblemente

relativamente débil. En otras palabras, la actividad inhibidora de proteasa del péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención tiene preferiblemente una alta

5 especificidad de KLK5, especificidad de KLK5/KLK7 o especificidad de KLK5/KLK14. El péptido de la presente invención preferiblemente no inhibe o suprime las actividades de proteasas tales como KLK1, KLK2, KLK3, KLK4, KLK6, KLK8, KLK9 a KLK13, KLK15, quimotripsina, triptasa, quimasa,

10 plasmina, trombina, elastasa, matriptasa proteína C, activador de plasminógeno tisular (tPA, por sus siglas en inglés), activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA, por sus siglas en inglés) y calicreína plasmática, o el grado de inhibición o supresión de los mismos es relativamente débil. Ese péptido

15 preferido de la presente invención no exhibe efectos secundarios causados por inhibir o suprimir las actividades de otras proteasas y es adecuado para usarse como agente terapéutico o profiláctico para enfermedades relacionadas con KLK5 (que se describirán más adelante). Además, el péptido

20 inhibidor específico de KLK5 de la presente invención preferiblemente no inhibe o suprime las actividades de proteasa de KLK7 y KLK14, o el grado de inhibición o supresión de las mismas es relativamente débil; el péptido inhibidor específico de KLK5/KLK7 de la presente invención preferiblemente no inhibe

25 o suprime la actividad proteasa de KLK14, o el grado de

inhibición o supresión de la misma es relativamente débil; y el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención preferiblemente no inhibe o suprime las actividades de proteasa de KLK7, o el grado de inhibición o supresión de las mismas es
5 relativamente débil.

Inhibidores que tienen baja especificidad para KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14 e inhiben las actividades de proteasa de otras KLK además de KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14, es decir, los inhibidores no selectivos pueden causar
10 efectos secundarios cuando sean administrados a humanos (Coussens, LM, *et al.*, Science, Vol. 295, No. 5564, pp. 2387-2392 (2002); Bissett, D, *et al.*, J. Clin. Oncol., Vol. 23, No. 4, pp. 842-849 (2005)). Mientras tanto, los inhibidores que tienen alta especificidad para KLK5, KLK5/KLK7 o KLK5/KLK14,
15 es decir, péptidos inhibidores específicos de KLK5, péptidos inhibidores específicos de KLK5/KLK7 o péptidos inhibidores específicos de KLK5/KLK14 pueden evitar efectos secundarios como descritos anteriormente y, por lo tanto, son adecuados para su uso en el tratamiento y la prevención de enfermedades
20 relacionadas con KLK5 (que se describirán más adelante).

El péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención pueden ser competitivos en la unión del sustrato de proteasa a KLK5, KLK5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14.

25 Como se describió anteriormente, KLK5, KLK7 y KLK14

a los que se dirige el péptido de la presente invención se derivan de animales vertebrados, preferiblemente mamíferos, más preferiblemente primates, además preferiblemente humanos, pero pueden derivarse de animales no humanos, por ejemplo, roedores tales como ratas y ratones y primates como los monos cynomolgus, los titíes comunes y los monos rhesus. Los péptidos con actividad inhibidora contra KLK5, KLK5 y KLK7 de origen animal no humano, o KLK5 y KLK14 pueden usarse, por ejemplo, para diagnosticar, probar, tratar o prevenir enfermedades relacionadas con KLK5 en animales no humanos. Además, cuando tales péptidos también inhiben KLK5, KLK5 y KLK7 humanos, o KLK5 y KLK14, ensayos farmacológicos y ensayos farmacocinéticos usando animales no humanos como modelos de patología animal, ensayos de seguridad y ensayos de toxicidad usándolos como animales sanos, y similares se pueden llevar a cabo en investigación no clínica y desarrollo de péptidos como agentes terapéuticos o profilácticos para enfermedades relacionadas con KLK5 (que se describirán más adelante).

Además, el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 y el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención tienen ventajas tales como bajo peso molecular, producción comparativamente fácil (que se describirá más adelante), excelentes propiedades físicas tales como almacenamiento estabilidad y termoestabilidad, y una amplia gama de opciones para la vía de administración, método

de administración, formulación, etc., cuando se usan como composiciones farmacéuticas (que se describirán más adelante), en comparación con otros biopolímeros como los anticuerpos usados en este campo como productos farmacéuticos y agentes de diagnóstico. Además, la semivida en sangre cuando se usa como composición farmacéutica se puede ajustar para que sea más larga aplicando un método conocido tal como la adición de biopolímeros y polímeros para aumentar el peso molecular del péptido de la presente invención. El péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 y el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención tienen un peso molecular de menos de 10,000, preferiblemente menos de 8,000, más preferiblemente de aproximadamente 7,000 a 7,200, Además, restos de bucle variable compuestos de Cys15 a Cys31 en SEC. ID NO.: 61 (Figura 69) o restos compuestos de Cys15 a Cys63 (en adelante, denominados "restos que contienen seis residuos de Cys") que tienen una actividad inhibidora de KLK5, actividad inhibidora de KLK5/KLK7 o actividad inhibidora de KLK5/KLK14 también se incluyen dentro del péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención, respectivamente. Los restos de bucle variable tienen un peso molecular de menos de 2,500, preferiblemente de aproximadamente 1,800 a 2,000, y los restos que contienen seis Cys tienen un peso molecular de menos de 6,000, preferiblemente de aproximadamente 5,300 a 5,500.

El péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención es un mutante de SPINK2 (que en lo sucesivo puede abreviarse como "mutante de SPINK2") en donde la columna vertebral de SPINK2 se mantiene al menos parcialmente, y reconoce preferiblemente un péptido parcial, una estructura parcial de orden superior o similar de KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14 o se une a los mismos (en adelante, la acción de reconocimiento o unión se denominará colectivamente como "actividad de unión al objetivo").

La unión del mutante de SPINK2 a KLK5, KLK7 o KLK14 en la presente invención puede medirse o determinarse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como ELISA, análisis de resonancia de plasma superficial (en adelante, denominado "SPR"), interferometría BioLayer (en lo sucesivo, denominada "BLI"), calorimetría de valoración isotérmica (en lo sucesivo, denominada "ITC"), citometría de flujo e inmunoprecipitación.

Los ejemplos de ELISA incluyen un método para detectar el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 que reconoce y se une a KLK5, KLK5/KLK7 o KLK5/KLK14 inmovilizado en una placa. Los anticuerpos para la fase sólida que reconocen KLK5, KLK5/KLK7 o KLK5/KLK14, o una etiqueta fusionada a KLK5, KLK5/KLK7 o KLK5/KLK14 se pueden usar para inmovilizar KLK5,

KLK5/KLK7 o KLK5/KLK14, que no sea biotina-estreptavidina. Anticuerpos marcados para la detección que reconocen el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14, o una etiqueta fusionada con el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 pueden usarse para detectar el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14, que no sea estreptavidina marcada. Los métodos que se pueden llevar a cabo para el análisis bioquímico, tal como HRP, fosfatasa alcalina y FITC, se pueden usar para el etiquetado, además de la biotina. Para la detección usando una etiqueta de enzima, se pueden usar sustratos cromogénicos tales como TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), BCIP (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo), p-NPP (fosfato de p-nitrofenilo), OPD (o-fenilendiamina), ABTS (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y sustrato quimioluminiscente SuperSignal ELISA Pico (Thermo Fisher Scientific), sustratos de fluorescencia tal como el sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu® (Thermo Fisher Scientific), y sustratos de quimioluminiscencia. Pueden usarse lectores de placas de absorción, lectores de placas de fluorescencia, lectores de placas de luminiscencia, contadores de centelleo líquido RI y similares para medir señales de detección.

El método de medición mediante análisis SPR puede

ser cualquiera de: un método para inmovilizar el péptido mutante de SPINK2 en un chip sensor y añadir una molécula objetivo tal como KLK5 para medir la unión entre los dos; y un método para inmovilizar una molécula objetivo tal como KLK5 en un chip sensor y agregar el péptido mutante de SPINK2 para medir la unión entre los dos. Se prefiere el primero. Para inmovilizar el mutante de SPINK2 contenido en el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo, puede usarse un método directo o un método de captura. Se prefiere este último.

En el método directo, la hidrofobicidad del mutante de SPINK2, los grupos amino-terminal y carboxi-terminal de SPINK2 y similares pueden usarse para la inmovilización directa. En el método de captura, anticuerpos que reconozcan el conjugado o una etiqueta fusionada al conjugado, proteína A, proteína G o similares, se pueden usar para la inmovilización, distintos de biotina-estreptavidina. Se añade una molécula objetivo, tal como KLK5 diluida usando un amortiguador de ensayo, al chip sensor en donde se inmoviliza el mutante de SPINK2, y se observa la señal de SPR a lo largo del tiempo para obtener sensogramas de unión. Posteriormente, se agrega un amortiguador de ensayo, que no contiene moléculas objetivo, tal como KLK5, y se observa la señal de SPR a lo largo del tiempo para obtener sensorgramas de disociación. La afinidad de unión se analiza usando los sensogramas obtenidos, para calcular una constante de disociación K_D . Los dispositivos usados para el análisis SPR

pueden incluir BIAcore (R) (GE healthcare), ProteOn (R) (BioRad), SPR-Navi (R) (BioNavisOy), Spreeta (R) (Texas Instruments), SPRi-PlexII (R) (HORIBA, Ltd.) y Autolab SPR (R) (Metrohm). Los dispositivos usados para BLI pueden incluir
5 Octet (R) (Pall).

Los ejemplos de inmunoprecipitación incluyen un método para detectar KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14 reconocidos y unidos al péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14
10 inmovilizado en perlas. Con respecto a las perlas, se pueden usar perlas magnéticas, perlas de agarosa y similares. Para inmovilizar el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7, o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14, pueden usarse anticuerpos que reconozcan tal péptido o una etiqueta
15 fusionada al péptido, proteína A, proteína G o similares, a diferencia de biotina-estreptavidina. Las perlas se separan mediante un imán, centrifugación o similar, y el KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14 precipitados junto con las perlas se detectan mediante SDS-PAGE o Western blot. Para detectar KLK5,
20 KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14, se pueden usar anticuerpos marcados para la detección que reconozcan una etiqueta fusionada con KLK5, KLK7 o KLK14, o KLK5, KLK7 o KLK14 y similares, distintos de la estreptavidina marcada. Los métodos que se pueden llevar a cabo para el análisis bioquímico, tal como HRP, fosfatasa
25 alcalina y FITC, se pueden usar para el etiquetado, además de

la biotina. Para la detección usando una etiqueta de enzima, se puede usar el mismo sustrato que se usa en ELISA. Para medir señales de detección, se pueden usar ChemiDoc® (BioRad), LuminoGraph (ATTO) y similares.

5 En la presente invención, "reconocimiento específico", es decir, "unión específica" significa unión que no es adsorción no específica. Los ejemplos de criterios para determinar si la unión es específica o no pueden incluir la actividad de unión EC_{50} en ELISA. Los ejemplos de otros
10 criterios pueden incluir la constante de disociación (en lo sucesivo, denominada " K_D "). En la presente invención, el valor K_D del péptido inhibidor de KLK5 para KLK5, el valor K_D del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 para KLK5 y KLK7, o el valor K_D del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 para KLK5 y KLK14 es $1 \times$
15 10^{-5} M o menos, 5×10^{-6} M o menos, 2×10^{-6} M o menos, o 1×10^{-6} M o menos, más preferiblemente 5×10^{-7} M o menos, 2×10^{-7} M o menos, o 1×10^{-7} M o menos, más preferiblemente 5×10^{-8} M o menos, 2×10^{-8} M o menos, o 1×10^{-8} M o menos, además preferiblemente 5×10^{-9} M o menos, 2×10^{-9} M o menos, o $1 \times$
20 10^{-9} M o menos. Los ejemplos de otros criterios pueden incluir los resultados del análisis de inmunoprecipitación. En el caso de inmovilizar el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7, o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 en perlas, que se prefiere en la presente invención, y agregar
25 KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14 a esto, siguió por separación

de las perlas, para detectar KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14 precipitados junto con las perlas, se detectan las señales de KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14.

El mutante de SPINK2 como péptido inhibidor de KLK5,
5 péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o péptido inhibidor de
KLK5/KLK14 de la presente invención puede tener la actividad
inhibidora de proteasa, actividad de unión al objetivo, otras
propiedades, funciones y características como se describe
anteriormente, su secuencia de aminoácidos de longitud completa
10 tiene una alta identidad de secuencia con la secuencia de
aminoácidos del SPINK2 tipo salvaje humano. El mutante de
SPINK2 de la presente invención tiene una identidad de
secuencia de 60% o más, 70% o más, 75% o más, 80% o más, 85% o
más, 90% o más, 95% o más, 98% o más, o 99% o más, con la
15 secuencia de aminoácidos de SPINK2 humana (SEC. ID NO.: 1,
Figura 9).

El término "identidad" significa una propiedad que
indica el grado de similitud o la relación entre dos
secuencias. La identidad (%) de una secuencia de aminoácidos
20 se calcula dividiendo el número de aminoácidos o residuos de
aminoácidos que sean idénticos entre el número total de
aminoácidos o residuos de aminoácidos y multiplicando el valor
numérico obtenido por 100.

El término "espacio" significa un espacio en el
25 alineamiento entre dos o más secuencias que resulta de una

supresión y/o adición en al menos una de las secuencias.

La identidad entre dos secuencias de aminoácidos que tienen secuencias de aminoácidos completamente idénticas es del 100%, pero cuando una de las secuencias de aminoácidos se
5 compara con la otra, y uno o más aminoácidos o residuos de aminoácidos se sustituyen, eliminan o añaden, la identidad entre los dos es inferior al 100%. Los ejemplos de algoritmos o programas para determinar la identidad entre dos secuencias en consideración de un espacio pueden incluir técnicas
10 conocidas por los expertos en la técnica usando parámetros estándar, tales como BLAST (Altschul, *et al.* Nucleic Acids Res., Vol. 25, pp. 3389-3402, 1997), BLAST2 (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., Vol. 215, pp. 403-410, 1990) y Smith-Waterman (Smith *et al.*, J. Mol. Biol., Vol. 147, pp. 195-197, 1981).

15 En la presente invención, el término "mutado" significa que uno o más nucleótidos, residuos de nucleótidos, aminoácidos o residuos de aminoácidos han sido sustituidos, suprimidos o insertados en una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos, en comparación con la molécula o
20 péptido de ácido nucleico que se produce naturalmente. La secuencia de aminoácidos del mutante de SPINK2 de la presente invención tiene uno o más aminoácidos o residuos de aminoácidos mutados, en comparación con la secuencia de aminoácidos de SPINK2 humana.

25 En un aspecto de la presente invención, la secuencia

de aminoácidos del mutante de SPINK2 puede tener: uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete aminoácidos de Ser16 a Gly22 sustituidos con otros aminoácidos o residuos de aminoácidos; uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de Pro24 a Asn28
5 sustituidos con otros aminoácidos o residuos de aminoácidos; y uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de Cys15, Cys23, Cys31, Cys42, Cys45 y Cys63 sustituidos con otros aminoácidos para eliminar enlaces disulfuro naturales o generar enlaces disulfuro no naturales, aunque son preferiblemente la misma
10 Cys que en el tipo salvaje para mantener los enlaces disulfuro naturales, en la secuencia de aminoácidos de SPINK2 humana (SEC. ID NO.: 1, Figura 9). En algunos péptidos inhibidores de KLK5 preferidos, péptidos inhibidores de KLK5/KLK7 o péptidos inhibidores de KLK5/KLK14 del mutante de SPINK2 de la presente
15 invención, la Cys se mantiene en los mismos 6 sitios que en el tipo natural para retener los enlaces disulfuro. En algunos aspectos más preferidos de tales péptidos, Cys15 a Cys45, Cys23 a Cys42 y Cys31 a Cys63 forman cada uno un enlace disulfuro.

Cuando la secuencia de aminoácidos de ese mutante de
20 SPINK2 está contenida en el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14, una estructura tridimensional constituida por una estructura de bucle compuesta de Ser16 a Val30 contenida en la secuencia de aminoácidos del SPINK2 tipo salvaje, una lámina β
25 compuesta de la hebra β (1) compuesta de Cys31 y Gly32 y la

hebra β (2) compuesta de Ile57 a Arg59, y una hélice α compuesta de Glu41 a Gly51, o una estructura de bucle, una lámina β y una hélice que son similares o al menos corresponden parcialmente a las anteriores (posiciones de las mismas) se
5 mantienen preferiblemente, en la medida en que se pueda ejercer la actividad inhibidora de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5/KLK7, o la actividad inhibidora de KLK5/KLK14.

La secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor
10 de KLK5/KLK14 de acuerdo con algunos aspectos del mutante de SPINK2 de la presente invención se describirá más adelante. Como se describió anteriormente, los "residuos de aminoácido" pueden expresarse simplemente como "aminoácidos" en la presente invención.

15 En la secuencia de aminoácidos (fórmula) establecida en SEC. ID NO.: 61 (Figura 69), X_1 a X_{12} no están específicamente limitados, siempre que sean cualquier aminoácido tal que el mutante resultante inhiba KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14. Más adelante, se describirán los aminoácidos adecuados de X_1 a
20 X_{12} , pero los aminoácidos pueden incluir los mismos aminoácidos que en la secuencia de aminoácidos del tipo natural, es decir, SPINK2 humana tipo salvaje.

En la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 61 (Figura 69) contenida en el péptido inhibidor de KLK5,
25 es adecuado que: Xaa16 (X_1) sea Ala, Asp, Gly, Gln, Leu, Ser o

Thr; Xaa17 (X₂) sea Arg, Glu, Asn, Gln o Ser; Xaa18 (X₃) sea Asp, Gln, Ile, Thr, Trp o Tyr; Xaa19 (X₄) sea Arg, Gly, Met, Gln o Thr; Xaa20 (X₅) sea Asp, Glu, Leu, Lys, Thr o Tyr; Xaa21 (X₆) sea Glu, Gly, His, Leu, Ser, Gln o Tyr; Xaa22 (X₇) sea
 5 Asp, Gly, Gln, Ser o Tyr; Xaa24 (X₈) sea Ala, Asp, Glu, Gly, Asn, Ser o Thr; Xaa25 (X₉) sea Arg o Lys; Xaa26 (X₁₀) sea Asp, Glu, Gln, Ser o Val; Xaa27 (X₁₁) sea Phe o Tyr; y Xaa28 (X₁₂) sea Asp o Glu.

En la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID
 10 NO.: 61 (Figura 69) contenida en el péptido inhibidor de KLK5/KLK7, es adecuado que: Xaa16 (X₁) sea Gly, Met o Tyr; Xaa17 (X₂) sea Glu, Gln o Thr; Xaa18 (X₃) sea His, Met o Tyr; Xaa19 (X₄) sea Ala, Arg, Lys o Gln; Xaa20 (X₅) sea Gly, Arg o Ser; Xaa21 (X₆) sea Arg, Lys, Gln o Ser; Xaa22 (X₇) sea Gly;
 15 Xaa24 (X₈) sea His, Thr o Tyr; Xaa25 (X₉) sea His o Tyr; Xaa26 (X₁₀) sea Asp, Glu o His; Xaa27 (X₁₁) sea Tyr; y Xaa28 (X₁₂) sea Asp o Glu.

En la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID
 NO.: 61 (Figura 69) contenida en el péptido inhibidor de
 20 KLK5/KLK14, es adecuado que: Xaa16 (X₁) sea Gly, Ser o Tyr; Xaa17 (X₂) sea Asp o Gln; Xaa18 (X₃) sea Thr o Val; Xaa19 (X₄) sea Thr o Val; Xaa20 (X₅) sea Glu o Thr; Xaa21 (X₆) sea His o Thr; Xaa22 (X₇) sea Tyr; Xaa24 (X₈) sea Asn o Ser; Xaa25 (X₉) sea Arg; Xaa26 (X₁₀) sea Asp o Glu; Xaa27 (X₁₁) sea Tyr; y Xaa28
 25 (X₁₂) sea Asp.

Xaa16 a 22 y Xaa24 a 28 (X_1 a X_{12}) tipo salvaje son respectivamente Ser, Gln, Tyr, Arg, Leu, Pro, Gly, Pro, Arg, His, Phe y Asn.

En la presente invención, se pueden añadir además de
5 uno a varios o más, preferiblemente de 1 a 5 aminoácidos al lado N-terminal del primer aminoácido. Los ejemplos de tal adición de aminoácidos pueden incluir preferiblemente la adición de 1 a 5 Asp y/o Glu (se pueden incluir tanto Asp como Glu), más preferiblemente la adición de 1 a 5 Asp o la adición
10 de 1 a 5 Glu.

En la presente invención, un péptido que se forma mediante la sustitución, adición y/o supresión de uno o más aminoácidos en, hacia o desde un resto agregado de un aducto N-terminal y/o C-terminal del mutante de SPINK2 El péptido (que
15 se denominará en lo sucesivo "péptido de origen") y mantiene parcial o totalmente las actividades del péptido mutante de SPINK2 puede denominarse "derivado del péptido de origen" o "derivado del péptido de origen". Ese "derivado" también se incluye dentro del alcance del "péptido" de la presente
20 invención.

La secuencia de aminoácidos del mutante de SPINK2 incluida dentro del alcance del péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención puede contener aminoácidos
25 naturales o aminoácidos mutados o secuencias de aminoácidos en

restos distintos de X_1 a X_{12} , es decir, en las posiciones de Pro2 a Cys15, Cys23 y Pro29 a Cys63 en la secuencia de aminoácidos de SPINK2 humana tipo salvaje (SEC. ID NO.: 1, Figura 9). Por ejemplo, el mutante de SPINK2 puede estar mutado

5 en una o más posiciones siempre que las mutaciones no prevengan o interfieran completamente con la actividad inhibidora de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5/KLK7 o la actividad inhibidora de KLK5/KLK14, o el plegamiento. Tales mutaciones se pueden lograr usando métodos estándar conocidos por los

10 expertos en la técnica. Los ejemplos de mutaciones típicas en la secuencia de aminoácidos pueden incluir la sustitución, supresión o inserción de uno o más aminoácidos, y los ejemplos de una sustitución pueden incluir una sustitución conservadora. Como resultado de una sustitución conservadora, un residuo de

15 aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido que tiene características químicas similares no solo en volumen sino también en polaridad. Se describen ejemplos de sustituciones conservadoras en otra parte de esta descripción. Mientras tanto, los restos distintos de X_1 a X_{12} pueden permitir

20 la sustitución no conservadora de uno o más aminoácidos, siempre que las sustituciones no prevengan por completo ni interfieran con la actividad inhibidora de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5/KLK7 o la KLK5/Actividad inhibidora de KLK14 o plegamiento.

25 En la secuencia de aminoácidos del mutante de SPINK2

que actúa como péptido inhibidor de KLK5, péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención, X_1 a X_{12} son preferiblemente respectivamente los aminoácidos de X_1 a X_{12} en cualquiera de SEC. ID N0s.: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 (Figuras 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28), SEC. ID N0s.: 22, 24, 26 y 28 (Figuras 30, 32, 34 y 36) y SEC. ID N0s.: 30 y 32 (Figuras 38 y 40), y los restos distintos de X_1 a X_{12} pueden tener aminoácidos o secuencias de aminoácidos que no eviten o interfieran con la actividad inhibidora de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5/KLK7 o la actividad inhibidora de KLK5/KLK14, o el plegamiento.

Además, los ejemplos de la secuencia de aminoácidos del mutante de SPINK2 que actúa como péptido inhibidor de KLK5, péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención pueden incluir cualquiera de las secuencias de aminoácidos (a1) a (a4), (b1) a (b4), o (c1) a (c4) a continuación:

(a1) una secuencia de aminoácidos compuesta por los aminoácidos en las posiciones 1 a 63 en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID N0s.: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 (Figuras 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28);

(a2) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que

codifica para la secuencia de aminoácidos descrita en (a1) en condiciones estrictas y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene un inhibidor de KLK5 actividad;

5 (a3) una secuencia de aminoácidos que se forma sustituyendo, suprimiendo, agregando y/o insertando 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 o 2, o 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos descrita en (a1) y contenida en un péptido que tiene una actividad inhibidora de
10 KLK5; y

 (a4) una secuencia de aminoácidos que es 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en (a1) y contenida en un péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5,

15 (b1) una secuencia de aminoácidos compuesta por los aminoácidos en las posiciones 1 a 63 en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID NOs.: 22, 24, 26 y 28 (Figuras 30, 32, 34 y 36);

 (b2) una secuencia de aminoácidos codificada por una
20 secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos descrita en (b1) en condiciones estrictas y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene un KLK5/Actividad
25 inhibidora de KLK7;

(b3) una secuencia de aminoácidos que se forma sustituyendo, suprimiendo, agregando y/o insertando 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 o 2, o 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos descrita en (b1) y
5 contenida en un péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK7; y

(b4) una secuencia de aminoácidos que es 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en (b1) y contenida en un
10 péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK7, o

(c1) una secuencia de aminoácidos compuesta por los aminoácidos en las posiciones 1 a 63 en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID NOs.: 30 y 32 (Figuras 38 y 40);

15 (c2) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos descrita en (c1) en condiciones estrictas y codifica para la secuencia de
20 aminoácidos contenida en un péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK14;

(c3) una secuencia de aminoácidos que se forma sustituyendo, suprimiendo, agregando y/o insertando 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 o 2, o 1
25 aminoácido en la secuencia de aminoácidos descrita en (c1) y

contenida en un péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK14; y

(c4) una secuencia de aminoácidos que es 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en (c1) y contenida en un péptido que tiene actividad inhibidora de KLK5/KLK14.

Los aminoácidos en las posiciones 64 y 65 en SEC. ID NO.: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 (Figuras 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40) no son aminoácidos correspondientes a los de SPINK2 humana tipo salvaje (SEC. ID NO.: 1, Figura 9: compuesta de 63 aminoácidos) pero se añaden para expresar el péptido de la presente invención en un aspecto de la presente invención.

Pueden introducirse mutaciones en el péptido de la presente invención con el fin de mejorar la estabilidad de plegamiento, la termoestabilidad, la estabilidad de almacenamiento, la semivida en sangre, la solubilidad en agua, la actividad biológica, la actividad farmacológica, los efectos secundarios, y similares. Por ejemplo, se pueden introducir nuevos grupos reactivos tal como Cys mediante una mutación para conjugar con otras sustancias como polietilenglicol (PEG), almidón de hidroxietilo (HES), biotina, péptidos o proteínas.

En la presente invención, el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 pueden unirse o añadirse a otros restos, y tales

conjugados se denominan "conjugados de péptido inhibidor de KLK5", "conjugados de péptido inhibidor de KLK5/KLK7" o "conjugados de péptido inhibidor de KLK5/KLK14", respectivamente. En la presente invención, "conjugados" significa moléculas formadas por otros restos que se unen al péptido de la presente invención o un fragmento del mismo. Los "conjugados" o "conjugación" incluyen restos enlazados o unidos al extremo N-terminal y/o C-terminal del péptido de la presente invención mediante una sustancia química tal como un agente de reticulación, o mediante una sustancia activa o similar que es adecuado para unir los restos a una cadena lateral de aminoácidos, mediante un método químico sintético, o mediante un método de ingeniería genética o similares. Ejemplos de tales "restos" que mejoran la semivida en sangre pueden incluir moléculas de polialquilenglicol como polietilenglicol (PEG), almidón de hidroxietilo (HES), moléculas de ácidos grasos como ácido palmítico, una región Fc de una inmunoglobulina (por ejemplo, una región Fc de la inmunoglobulina humana G1: su secuencia de aminoácidos se muestra en SEC. ID NO.: 87, Figura 95), el dominio CH3 de una inmunoglobulina, el dominio CH4 de una inmunoglobulina, albúmina o un fragmento de la misma, péptidos de unión a albúmina, proteínas de unión a albúmina tales como proteína G estreptocócica y transferrina. Con respecto a otros "restos", el péptido de la presente invención se puede unir a tales "restos" mediante un enlazador tal como

un enlazador peptídico.

En un aspecto de la presente invención, tal conjugado es una fusión del péptido mutante de SPINK2 de la presente invención con una región Fc de un anticuerpo o un fragmento
5 del mismo. Los ejemplos del origen del anticuerpo pueden incluir humanos y animales no humanos, incluidos roedores tales como ratones, ratas y conejos, otros mamíferos tales como bovinos, cerdos, perros, monos cynomolgus, titíes y monos rhesus, y aves tales como pollos, sin embargo, es
10 preferiblemente de humanos. Los ejemplos del anticuerpo pueden incluir IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE, preferiblemente IgG1. Más preferiblemente, el conjugado es una fusión del péptido de la presente invención con una región Fc de IgG1 humana o un fragmento de la misma. Aunque la fusión
15 del péptido de la presente invención con la región Fc del anticuerpo o el fragmento del mismo puede denominarse "fusión Fc" o "conjugado", todos tienen el mismo significado.

Los ejemplos de la región Fc de la IgG1 humana pueden incluir una región que contenga o consista en la secuencia de
20 aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 87 (Figura 95), pero no hay limitación para esto. La región Fc del anticuerpo puede ser tipo salvaje o mutante.

Además, el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de
25 la presente invención pueden conjugarse con otro fármaco, con

el fin de ejercer o potenciar la actividad farmacológica. Las técnicas y aspectos conocidos por los expertos en la técnica como conjugados anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) en el campo de los anticuerpos pueden constituir algunos aspectos de la presente invención reemplazando el anticuerpo por el péptido de la presente invención.

El péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención pueden contener además uno o más restos que ejerzan afinidad de unión, actividad inhibidora, actividad antagonista y actividad agonista a moléculas objetivo distintas de KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14, respectivamente, o pueden conjugarse con tales restos. Los ejemplos de tales "restos" pueden incluir anticuerpos o fragmentos de los mismos, y proteínas que tengan una cadena principal distinta de anticuerpos tales como el mutante de SPINK2 o fragmentos del mismo. Las técnicas y aspectos conocidos por los expertos en la técnica como anticuerpos multiespecíficos y anticuerpos biespecíficos en el campo de los anticuerpos caen dentro de algunos aspectos del conjugado de la presente invención reemplazando al menos uno de los dos o más "anticuerpos" contenidos en el mismo con el péptido de la presente invención.

El péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención o su precursor pueden contener una secuencia

señal. Una secuencia señal que está presente en el extremo N de un polipéptido o su precursor o que se agrega al mismo es útil para administrar el polipéptido a un compartimento específico de una célula, tal como el periplasma en el caso de *Escherichia coli* y el retículo endoplásmico en el caso de células eucariotas. Los expertos en la técnica conocen muchas secuencias señal y pueden seleccionarse de acuerdo con las células hospederas. Los ejemplos de la secuencia señal para secretar un péptido deseado en el periplasma de *Escherichia coli* pueden incluir OmpA. Una modalidad que contenga esa secuencia señal también puede incluirse dentro del conjugado de la presente invención como un aspecto.

Además, el péptido puede purificarse mediante cromatografía de afinidad añadiendo de antemano una etiqueta al péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención.

El péptido de la presente invención, por ejemplo, puede contener biotina, Strep tag (R), Strep tag II (R), oligohistidinas tales como His6, polihistidinas, dominios de inmunoglobulina, proteínas de unión a maltosa, glutatión-S-transferasas (GST, por sus siglas en inglés), péptidos de unión a calmodulina (CBP, por sus siglas en inglés), haptenos tales como digoxigenina y dinitrofenol, etiquetas de epítipo tales como FLAG®, etiqueta myc, etiqueta HA y similares (en lo sucesivo, denominadas colectivamente "etiquetas de afinidad")

en su extremo C-terminal. Los aductos de etiqueta también se pueden incluir dentro del conjugado de la presente invención como algunos aspectos. El conjugado de la presente invención, en su conjunto, puede ser un péptido (polipéptido).

5 El péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención pueden contener restos de marcaje y pueden conjugarse específicamente con restos de marcado tales como marcadores de enzimas, marcadores radiactivos, marcadores de
10 colores, marcadores de fluorescencia, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales y oro coloidal. El aspecto que contiene restos de marcado también se puede incluir dentro del conjugado de la presente invención como algunos aspectos.

15 Los ejemplos de la secuencia de aminoácidos del conjugado de péptido inhibidor de KLK5, el conjugado de péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el conjugado de péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención pueden incluir cualquiera de las secuencias de aminoácidos (a1) a (a4), (b1) a (b4), o
20 (c1) a (c4) a continuación:

 (a1) la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID NOs.: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 y 96 (Figuras 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56 y 106);

 (a2) una secuencia de aminoácidos codificada por una
25 secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de

nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos descrita en (a1) en condiciones estrictas y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene un inhibidor de
5 KLK5 actividad;

(a3) una secuencia de aminoácidos que se forma sustituyendo, suprimiendo, agregando y/o insertando 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 o 2, o 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos descrita en (a1) y
10 contenido en un péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5; y

(a4) una secuencia de aminoácidos que es 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en (a1) y contenida en un
15 péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5,

(b1) la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC. ID NOs.: 50, 52, 54 y 56 (Figuras 58, 60, 62 y 64);

(b2) una secuencia de aminoácidos codificada por una
20 secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos descrita en (b1) en condiciones estrictas y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene una actividad
25 inhibidora de KLK5/KLK7;

(b3) una secuencia de aminoácidos que se forma sustituyendo, suprimiendo, agregando y/o insertando 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 o 2, o 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos descrita en (b1) y
5 contenido en un péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK7; y

(b4) una secuencia de aminoácidos que es 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en (b1) y contenida en un
10 péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK7, o

(c1) la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC. ID N0s.: 58 y 60 (Figuras 66 y 68);

(c2) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de
15 nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos descrita en (c1) en condiciones estrictas y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK14;

20 (c3) una secuencia de aminoácidos que se forma sustituyendo, suprimiendo, agregando y/o insertando 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 o 2, o 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos descrita en (c1) y contenida en un péptido que tiene una actividad inhibidora de
25 KLK5/KLK14; y

(c4) una secuencia de aminoácidos que es 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en (c1) y contenida en un péptido que tiene actividad inhibidora de KLK5/KLK14.

5 El péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención (la secuencia de aminoácidos de los mismos) pueden contener tanto aminoácidos naturales como aminoácidos no naturales. Los aminoácidos naturales pueden incluir tanto
10 L-aminoácidos como D-aminoácidos.

El péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención pueden existir como un monómero, un dímero, un trímero u oligómero superior, o un multímero. El dímero, el
15 trímero u oligómero superior y el multímero pueden ser un homómero compuesto por un solo tipo de monómero o un heterómero compuesto por dos o más tipos diferentes de monómeros. El monómero puede difundirse rápidamente y tener una excelente penetración en los tejidos, por ejemplo. El dímero, el
20 oligómero y el multímero pueden tener aspectos excelentes tales como alta afinidad local o actividad de unión a las moléculas objetivo, una baja tasa de disociación o alta actividad inhibidora de KLK5, actividad inhibidora de KLK5/KLK7 o actividad inhibidora de KLK5/KLK14. Además de la dimerización,
25 oligomerización y multimerización espontáneas, también se

puede lograr la dimerización, oligomerización y multimerización deseadas mediante la introducción de un dominio jun-fos, una cremallera de leucina o similar en el péptido de la presente invención.

5 El péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención pueden unirse a una o más moléculas objetivo o inhibir las actividades de las moléculas objetivo, en forma de un monómero, un dímero, un trímero u oligómero superior, o
10 un multímero.

Los ejemplos de la forma del péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención pueden incluir formas aisladas (tal como preparaciones y soluciones liofilizadas),
15 los conjugados mencionados anteriormente y las formas unidas a otras moléculas (tales como formas inmovilizadas, asociaciones con moléculas extrañas y formas unidas a moléculas objetivo), pero no hay limitación para estos ejemplos, y una forma adecuada para expresión, purificación, uso, almacenamiento o
20 similar puede ser opcionalmente seleccionado.

3. Identificación del péptido inhibidor de KLK5, péptido inhibidor de KLK5/KLK7 y péptido inhibidor de KLK5/KLK14

Un péptido inhibidor de KLK5, un péptido inhibidor
25 de KLK5/KLK7 y un péptido inhibidor de KLK5/KLK14 pueden

identificarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, usando la secuencia de aminoácidos de SPINK2 o la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 y el péptido inhibidor de
5 KLK5/KLK14 de la presente invención (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de acuerdo con (a1), (b1) o (c1) anteriores), una secuencia de nucleótidos que codifique para tal secuencia de aminoácidos, moléculas de ácido nucleico que contengan tal secuencia de nucleótidos y similares como
10 materiales de partida. Como ejemplo adecuado, esa identificación puede hacerse a partir de una biblioteca mutante de SPINK2 humana, usando la actividad inhibidora de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5/KLK7 o la actividad inhibidora de KLK5/KLK14, respectivamente, como índice, y la actividad de
15 unión a KLK5, KLK5/KLK7 o KLK5/KLK14 pueden combinarse para usarse, respectivamente, como índice.

Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que sirvan como material de partida pueden someterse a mutagénesis e introducirse en un anfitrión bacteriano o eucariota apropiado
20 usando tecnología de ADN recombinante. La biblioteca de mutantes de SPINK2 se conoce como una técnica para identificar un aglutinante o un inhibidor de una molécula objetivo. Por ejemplo, la invención en la publicación internacional No. WO 2014/024914 también se incorpora dentro de la invención de la
25 presente invención como referencia en su totalidad. Después de

que la secuencia de nucleótidos sometida a mutagénesis se exprese en el hospedante apropiado, un clon formado uniendo el mutante de SPINK2 que tenga las propiedades, actividades, funciones y similares deseados con su rasgo genético puede

5 concentrarse y/o seleccionarse de la biblioteca para ser identificado. Para concentrar y/o seleccionar el clon, se pueden usar métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como el método de presentación bacteriana (Francisco, J. A., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, Vol. 90, pp.

10 10444-10448), el método de presentación de levadura (Boder, E. T., *et al.* (1997) *Nat. Biotechnol.*, Vol. 15, pp. 553-557), el método de presentación de células de mamífero (Ho M, *et al.* (2009) *Methods Mol Biol.*, Vol. 525, pp. 337-352), el método de presentación de fagos (Smith, G. P. (1985) *Science.*, Vol. 228,

15 pp. 1315-1317), el método de presentación de ribosomas (Mattheakis LC, *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, Vol. 91, No. 19, pp. 9022-9029), el método de presentación de ácidos nucleicos (Nemoto N, *et al.* (1997) *FEBS Lett.*, Vol. 414, No. 2, pp. 405-408) tal como la presentación de ARNm y el método

20 de selección de colonias (Pini, A. *et al.* (2002) *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, Vol. 5, pp. 503-510). Se determina la secuencia de nucleótidos del mutante de SPINK2 contenida en el clon así seleccionado e identificado. De este modo, se puede determinar una secuencia de aminoácidos codificada por la

25 secuencia de nucleótidos como la secuencia de aminoácidos del

mutante de SPINK2, es decir, el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 contenido en el clon.

El mutante de SPINK2 de la presente invención se
5 puede obtener, por ejemplo, mediante mutagénesis del SPINK2 natural. "Mutagénesis" significa permitir la sustitución o supresión de uno o más aminoácidos presentes en algunas posiciones en una secuencia de aminoácidos con otros aminoácidos, o la inserción de aminoácidos que no están
10 presentes en la secuencia de aminoácidos. Tal supresión o inserción puede cambiar la longitud de la secuencia. En el mutante de SPINK2 de la presente invención, la mutagénesis puede ocurrir preferiblemente en una o más posiciones de X_1 a X_{12} en la secuencia de aminoácidos establecida en SEC. ID NO.:
15 61 (Figura 69).

Sin embargo, el alcance del mutante también incluye aquellos con los mismos aminoácidos que están presentes en posiciones específicas en la secuencia de aminoácidos natural, es decir, una secuencia de aminoácidos natural se mantiene en
20 una o más posiciones de X_1 a X_{12} después de tal mutagénesis adecuada, siempre que al menos un aminoácido esté mutado globalmente. Asimismo, en un aspecto de la presente invención, el alcance del mutante también incluye aquellos con los mismos aminoácidos que están presentes en posiciones específicas en
25 la secuencia de aminoácidos natural, es decir, una secuencia

de aminoácidos natural se mantiene en una o más posiciones en restos distintos de X_1 a X_{12} después de que se induzca la mutación en las posiciones, siempre que al menos un aminoácido mute en general.

5 El término "mutagénesis aleatoria" significa que uno o más aminoácidos diferentes se introducen en posiciones específicas dentro de una secuencia mediante mutagénesis con una cierta probabilidad, pero no todas las probabilidades de introducir los aminoácidos pueden ser las mismas. Además, en
10 la presente invención, la inclusión del aminoácido de origen natural (tal como uno de los aminoácidos) en al menos dos aminoácidos diferentes no puede evitarse, y el alcance de la "mutagénesis aleatoria" también incluye tal caso.

Con respecto a un método para mutagénesis aleatoria
15 en posiciones específicas, se pueden usar métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden inducir mutaciones en posiciones específicas de una secuencia mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando una mezcla de oligonucleótidos sintéticos que contengan
20 una composición de nucleótidos degenerada. Por ejemplo, el uso de un codón NNK o NNS (N = adenina, guanina, citosina o timina; K = guanina o timina; S = adenina o citosina) induce una mutación para introducir un codón de parada además de los 20 aminoácidos naturales, mientras que el uso de un codón VVS (V
25 = adenina, guanina o citosina) elimina la posibilidad de

introducir Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr y Val e induce una mutación para introducir los otros 12 aminoácidos naturales. Además, el uso de un codón NMS (M = adenina o citosina) elimina la posibilidad de introducir Arg, Cys, Gly, 5 Ile, Leu, Met, Phe, Trp y Val e induce una mutación para introducir los otros 11 aminoácidos naturales, por ejemplo. Se pueden usar codones especiales, codones artificiales o similares para inducir una mutación para introducir aminoácidos no naturales.

10 La mutagénesis específica de sitio también se puede llevar a cabo usando información estructural que contiene una estructura de orden superior de un objetivo y/o un péptido contra el objetivo o un péptido tipo salvaje del que se deriva el péptido. En la presente invención, se puede introducir una 15 mutación específica de sitio usando información estructural que contiene información de orden superior sobre el objetivo KLK5, KLK7 o KLK14, y/o el mutante de SPINK2, el SPINK2 tipo salvaje o un complejo de los dos, con respecto a KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14. Puede haber casos en los que se pueda 20 encontrar una correlación entre la actividad inhibidora de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5/KLK7 o la actividad inhibidora de KLK5/KLK14 y la información estructural obtenida, por ejemplo, mediante la identificación de un mutante de SPINK2 que tenga la actividad inhibidora de KLK5, la actividad 25 inhibidora de KLK5/KLK7, o la actividad inhibidora de

KLK5/KLK14, luego obteniendo cristales de KLK5, KLK7 o KLK14 y el complejo mutante de SPINK2 para llevar a cabo análisis de la estructura cristalina de rayos X, y especificando un epítipo en la molécula de KLK5, KLK7 o KLK14 a la que se una el mutante
5 de SPINK2 y un paratopo en el mutante de SPINK2 correspondiente al epítipo de acuerdo con los resultados del análisis. Con base en la correlación estructura-actividad, la sustitución con aminoácidos específicos en posiciones específicas, o la inserción o supresión de aminoácidos en posiciones específicas
10 o similares se diseña, de modo que la actividad inhibidora de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5/KLK7 o la actividad inhibidora de KLK5/KLK14 se pueda confirmar realmente.

Además, se pueden inducir mutaciones, por ejemplo, usando una unidad constituyente de nucleótidos que modifique
15 la especificidad de un par de bases, tal como la inosina.

Además, se pueden inducir mutaciones en posiciones aleatorias, por ejemplo, mediante el método de PCR propenso a errores usando una ADN polimerasa con una alta tasa de error sin una función de corrección de pruebas, tal como la ADN
20 polimerasa Taq, o mutagénesis química, y similares.

El péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 pueden concentrarse y/o seleccionarse de bibliotecas adecuadas, tales como una biblioteca de fagos y una biblioteca de colonias,
25 conocidas por los expertos en la técnica para el respectivo

método de tamizado que use presentación de bacterias, presentación de levadura, presentación de células de mamífero, presentación de fagos, presentación de ribosomas, presentación de ácido nucleico, selección de colonias o similares. Usando
5 vectores y métodos conocidos por los expertos en la técnica que son adecuados para las bibliotecas respectivas, tales como un fagémido para la biblioteca de fagos y un cósmido para el rastreo de colonias en estas bibliotecas, se puede lograr la construcción de las bibliotecas. Los vectores pueden ser virus
10 que infecten células procariotas o eucariotas o vectores virales. Tales vectores recombinantes se pueden preparar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como ingeniería genética.

La presentación de bacterias es, por ejemplo, una
15 técnica de fusión de una proteína deseada con una parte de la lipoproteína de la membrana externa (Lpp, por sus siglas en inglés) de *Escherichia coli* y la proteína de la membrana externa OmpA para presentar la proteína deseada en la superficie de *Escherichia coli*. Un grupo de ADN obtenido por
20 mutagénesis aleatoria de una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de una proteína se introduce en vectores adecuados para la presentación bacteriana para transformar células bacterianas con los vectores. Por lo tanto, se puede obtener una biblioteca que presenta un grupo
25 proteico mutagenizado aleatoriamente en la superficie de las

células bacterianas transformadas (Francisco, J. A., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, Vol. 90, pp. 10444-10448).

La exhibición de levadura es una técnica de fusión de una proteína deseada con una proteína como la α -aglutinina en la capa exterior de la superficie de una célula de levadura para presentarla en la superficie de la levadura. La α -aglutinina contiene una región hidrofóbica C-terminal, que se cree que es una señal de unión de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI), una secuencia señal, un dominio activo, un dominio de pared celular y similares, y se puede mostrar la proteína deseada en la superficie de la célula de levadura mediante su manipulación. Un grupo de ADN obtenido por mutagénesis aleatoria de una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de una proteína se introduce en vectores adecuados para la presentación de levaduras para transformar células de levadura con los vectores. Por lo tanto, puede obtenerse una biblioteca que presente un grupo proteico mutagenizado aleatoriamente en la superficie de las células de levadura transformadas (Ueda, M. & Tanaka, A., *Biotechnol. Adv.*, Vol. 18, pp. de 121, publicado en 2000; Ueda, M. y Tanaka, A., *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 90, pp. de 125, publicado en 2000).

La exhibición de células animales es, por ejemplo, una técnica de fusión de una proteína deseada con una región transmembrana de una proteína de membrana tipificada por un

receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, por sus siglas en inglés) para presentar la proteína deseada en la superficie de una célula de mamífero, tal como HEK293 y células de ovario de hámster chino (CHO, por sus
5 siglas en inglés). Un grupo de ADN obtenido por mutagénesis aleatoria de una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de una proteína se introduce en vectores adecuados para la presentación de células animales para transfectar células animales con los vectores. Por lo
10 tanto, puede obtenerse una biblioteca que presenta un grupo proteico mutagenizado aleatoriamente en la superficie de las células animales transfectadas (Ho M, *et al.* (2009) *Methods Mol Biol.*, Vol. 525, pp. 337-352).

La biblioteca deseada presentada en células como
15 levaduras, bacterias y células animales puede incubarse en presencia de las moléculas objetivo o ponerse en contacto con las moléculas objetivo. Por ejemplo, después de que una célula que contiene la biblioteca y KLK5, KLK7 o KLK14 modificados con biotina o similares se incuban durante un cierto tiempo,
20 se le añade un portador, tal como perlas magnéticas, la célula se separa del portador y luego el portador se lava para eliminar los adsorbatos y aglutinantes no específicos. Por lo tanto, se puede recoger un grupo celular que presente un péptido unido al portador (o KLK5, KLK7 o KLK14 unido al portador), un
25 ensamblaje de los péptidos o el ensamblaje de péptidos

concentrados. Asimismo, un grupo celular que presente un péptido unido al portador (o KLK5, KLK7 o KLK14 unido al portador) o KLK5, KLK7 o KLK14, un ensamblaje de los péptidos o el ensamblaje de péptidos concentrados se pueden recolectar
5 llevando a cabo separación celular (MACS, por sus siglas en inglés) después de la adición de perlas magnéticas o FACS después de la tinción celular usando un anticuerpo anti-KLK5, un anticuerpo anti-KLK7 o un anticuerpo anti-KLK14. Los sitios de adsorción y/o los sitios de unión no específicos se pueden
10 someter, por ejemplo, a un tratamiento de bloqueo, y se puede incorporar un paso de bloqueo siempre que sea un método apropiado. Se recolecta un vector que expresa el péptido, el ensamblaje peptídico o el ensamblaje peptídico concentrado así obtenido, y se determina una secuencia de nucleótidos del
15 polinucleótido insertado en el vector, de modo que se pueda determinar una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos. Además, el conjunto de péptidos que se una a las moléculas objetivo se puede concentrar más introduciendo el vector en la célula hospedera de nuevo y
20 repitiendo la operación mencionada anteriormente como un ciclo una o varias veces.

En el caso de la presentación de fagos, un fagémido es, por ejemplo, un plásmido bacteriano que contiene un segundo origen de replicación derivado de un bacteriófago monocatenario
25 distinto del origen de replicación del plásmido. Una célula

que contiene un fagémido puede replicar el fagémido mediante un modo de replicación monocatenario mediante superinfección con M13 o un bacteriófago auxiliar similar. Es decir, el ADN de fagémido monocatenario se empaqueta en partículas
5 infecciosas recubiertas con una proteína de cubierta de bacteriófago. Por lo tanto, se puede formar ADN fagémido en bacterias infectadas como un plásmido de ADN bicatenario clonado, y se puede formar un fagémido como partículas similares a bacteriófagos a partir del sobrenadante del cultivo
10 de la célula superinfectada. Las propias partículas se pueden reformar como plásmidos inyectando las partículas similares a bacteriófagos en bacterias que tienen un F-pilus para infectar las bacterias con ese ADN.

Un gen de fusión que contiene un polinucleótido que
15 tiene una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos del péptido de prueba y un gen de la proteína de la cubierta del bacteriófago se inserta en el fagémido para infectar las bacterias y se cultivan tales células. Por lo tanto, el péptido puede expresarse o
20 presentarse (el mismo significado que se muestra) sobre las bacterias o las partículas tipo fago o puede producirse como una proteína de fusión con la proteína de la cubierta en las partículas del fago o el sobrenadante del cultivo de las bacterias.

25 Por ejemplo, el péptido se puede producir en el

sobrenadante del cultivo de *Escherichia coli* como una proteína de fusión que contenga el péptido y la proteína de la cubierta insertando un gen de fusión que contenga el polinucleótido y el gen de la proteína de la cubierta del bacteriófago gpIII en un fagémido para la superinfección de *Escherichia coli* con M13 o un fago auxiliar similar.

En el caso de usar varios vectores cíclicos o no cíclicos, tal como un vector viral en lugar del fagémido, un péptido que tengas una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos del polinucleótido insertado en ese vector se puede expresar o presentar en la célula en la cual se introduzca el vector o en partículas tipo virus, o se puede producir en el sobrenadante de cultivo de la célula de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica.

La biblioteca que exprese el péptido así obtenido puede incubarse en presencia de las moléculas objetivo o ponerse en contacto con las moléculas objetivo. Por ejemplo, un portador al que se inmovilizan KLK5, KLK5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14 se incuba durante un cierto tiempo junto con una fase móvil que contiene la biblioteca, luego la fase móvil se separa del portador, y luego el portador se lava para eliminar los adsorbatos y aglutinantes no específicos. Por lo tanto, un péptido unido al portador (o KLK5, KLK5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14 unido al portador), un ensamblaje de los péptidos o el ensamblaje de péptidos concentrados pueden recolectarse por

elución. La elución se puede llevar a cabo de forma no selectiva en condiciones de fuerza iónica relativamente alta, pH bajo y desnaturalización moderada, en presencia de sales caotrópicas y similares, o se puede llevar a cabo de forma selectiva
5 añadiendo moléculas objetivo solubles como KLK5, KLK7 y KLK14, anticuerpos que se unan a las moléculas objetivo, ligandos naturales, sustratos y similares para permitir que la mezcla compita con las moléculas objetivo inmovilizadas. Los sitios de adsorción y/o los sitios de unión no específicos se pueden
10 someter, por ejemplo, a un tratamiento de bloqueo, y se puede incorporar un paso de bloqueo siempre que sea un método apropiado.

Se recolecta un vector que expresa el péptido, el ensamblaje peptídico o el ensamblaje peptídico concentrado así
15 obtenido, y se determina una secuencia de nucleótidos del polinucleótido insertado en el vector, de modo que se pueda determinar una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos. Además, el conjunto de péptidos que se una a las moléculas objetivo se puede concentrar más
20 introduciendo el vector en la célula hospedera de nuevo y repitiendo la operación mencionada anteriormente como un ciclo una o varias veces.

La presentación de ribosomas es una técnica para sintetizar una proteína deseada y el ARNm correspondiente a la
25 misma, y una molécula unida a ribosoma dentro de un tubo de

ensayo, por ejemplo, usando ARNm que codifique para la proteína deseada libre de un codón de terminación y un sistema de síntesis de proteína libre de células. Se puede obtener una biblioteca que presente un grupo de proteínas mutagenizado
5 aleatoriamente en los ribosomas, usando el grupo de ARNm obtenido por mutagénesis aleatoria de una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de una proteína y un sistema de síntesis de proteínas libre de células (Mattheakis LC, *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.*,
10 *EE.UU.*, Vol. 91, No. 19, pp. 9022-9029).

La presentación de ácidos nucleicos también se denomina presentación de ARNm y es una técnica para sintetizar una proteína deseada, el ARNm que codifica para la proteína y una molécula unida a ribosoma, por ejemplo, usando un enlazador
15 como puromicina que tiene una estructura similar al extremo 3' de tRNA tirosilo. Dado que esta técnica usa un sistema de síntesis de proteínas sin células en lugar de células vivas, es posible la síntesis dentro de un tubo de ensayo. Se puede obtener una biblioteca que presenta un grupo de proteínas
20 mutagenizado aleatoriamente en los ribosomas, usando un grupo de ARNm obtenido por mutagénesis aleatoria de una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de una proteína, un enlazador como la puromicina y un sistema de síntesis de proteínas sin células (Nemoto N, *et al.* (1997) *FEBS*
25 *Lett.*, Vol. 414, No. 2, pp. 405-408).

La biblioteca obtenida a través de un sistema de síntesis libre de células, tal como la presentación de ribosomas o la presentación de ácidos nucleicos y la expresión del péptido, puede incubarse en presencia de las moléculas
5 objetivo o ponerse en contacto con las moléculas objetivo. Por ejemplo, un portador al que se inmovilizan KLK5, KLK5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14 se incuba durante un cierto tiempo junto con una fase móvil que contiene la biblioteca, luego la fase móvil se separa del portador, y luego el portador se lava para
10 eliminar los adsorbatos y aglutinantes no específicos. Por lo tanto, un péptido unido al portador (o KLK5, KLK5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14 unido al portador), un ensamblaje de los péptidos o el ensamblaje de péptidos concentrados pueden recolectarse por elución. La elución se puede llevar a cabo de
15 forma no selectiva en condiciones de fuerza iónica relativamente alta, pH bajo y desnaturalización moderada, en presencia de sales caotrópicas y similares, o se puede llevar a cabo de forma selectiva añadiendo moléculas objetivo solubles tales como KLK5, KLK7 y KLK14, anticuerpos que se unen a las
20 moléculas objetivo, ligandos naturales, sustratos y similares para permitir que la mezcla compita con las moléculas objetivo inmovilizadas. Los sitios de adsorción y/o los sitios de unión no específicos se pueden someter, por ejemplo, a un tratamiento de bloqueo, y se puede incorporar un paso de bloqueo siempre
25 que sea un método apropiado.

Se recolectan los ácidos nucleicos que expresan el péptido, el ensamblaje de péptidos o el ensamblaje de péptidos concentrado así obtenido, y la secuencia de nucleótidos se determina después de la transcripción inversa a ADNc en el caso
5 de ARNm, de modo que una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos pueda ser determinada. Además, el ensamblaje de péptidos que se une a las moléculas objetivo puede concentrarse más transcribiendo el ARNm de los ácidos nucleicos así recogidos y repitiendo la operación mencionada
10 anteriormente como un ciclo una o varias veces.

El péptido o su ensamblaje se puede purificar de manera eficaz conjugando una etiqueta de afinidad con el péptido, el ensamblaje peptídico o el ensamblaje peptídico concentrado de antemano. Por ejemplo, el péptido se puede eluir
15 conjugando un sustrato de una proteasa como una etiqueta al conjunto peptídico de antemano y luego escindiéndolo a través de la actividad de la proteasa.

Con base en la información de secuencia obtenida y las funciones o similares del péptido, se inducen mutaciones
20 adicionales en el clon o la biblioteca obtenida, de modo que un péptido con funciones (por ejemplo, la actividad inhibidora de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5/KLK7, o la actividad inhibidora de KLK5/KLK14), propiedades físicas (tal como la termoestabilidad y la estabilidad de almacenamiento),
25 farmacocinética (tal como la distribución y la semivida en

sangre) y similares que se mejoren pueda obtenerse de la biblioteca en la que se haya introducido la mutación.

El péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 se pueden
5 identificar determinando si el péptido obtenido tiene o no la actividad inhibidora de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5/KLK7 o la actividad inhibidora de KLK5/KLK14, respectivamente.

Además, el péptido inhibidor de KLK5, el péptido
10 inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 pueden mantener preferiblemente una estructura tridimensional constituida por una estructura de bucle compuesta de Ser16 a Val30 contenida en la secuencia de aminoácidos de la SPINK2 tipo salvaje, una lámina β compuesta de hebra β (1) compuesta
15 de Cys31 y Gly32 y hebra β (2) compuesta de Ile57 a Arg59, y una α -hélice compuesta de Glu41 a Gly51, o una estructura de bucle, una lámina β y una hélice α que sean similares o al menos correspondan parcialmente a las anteriores (posiciones de las mismas), en la medida en que se pueda ejercer la
20 actividad inhibidora de KLK5, la actividad inhibidora de KLK5/KLK7 o la actividad inhibidora de KLK5/KLK14. También es posible identificar un péptido inhibidor de KLK5, un péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o un péptido inhibidor de KLK5/KLK14 más adecuado usando esa estructura tridimensional (la
25 estructura completa o una estructura parcial) como parte del

índice.

Además, la presente invención se refiere a un método para identificar un péptido inhibidor de KLK5, un péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o un péptido inhibidor de KLK5/KLK14 usando una biblioteca de mutantes de SPINK2, y los ejemplos de los mismos pueden incluir el método descrito en (75) anteriormente. Además, la presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto inhibidor de KLK5, un compuesto inhibidor de KLK5/KLK7 o un compuesto inhibidor de KLK5/KLK14, usando diversas bibliotecas de compuestos. En tal método, el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo puede usarse como compuesto de referencia, control o similar, y tal método puede ejemplificarse en (76) anterior. En tal método, se puede determinar que un compuesto de prueba es positivo cuando la actividad inhibidora de enzima del compuesto es equivalente o más fuerte que la actividad inhibidora de enzima del compuesto de referencia o el control, mientras que se puede determinar que el compuesto es negativo cuando la actividad inhibidora de enzima es más débil. Un método que implica esa comparación puede ejemplificarse mediante (77) anterior. Mientras tanto, el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo puede usarse como compuesto de referencia, control o similar, en cualquier prueba que implique un paso de medición de la actividad proteasa de KLK5 y opcionalmente KLK7 o KLK14, y tal método de prueba

también se incluye en la presente invención. Tal prueba no está específicamente limitada y puede ejemplificarse en (78) anterior. Los ejemplos adecuados de los mismos pueden incluir un método de diagnóstico, un método de prueba, un método de
5 detección y un método para identificar a un individuo al que se va a administrar una composición farmacéutica de la presente invención (todos se describirán más adelante).

4. Moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido de la presente invención o conjugado del mismo, vector
10 que lo contiene, célula que lo contiene y método para producir péptido recombinante o conjugado.

La presente invención también proporciona un polinucleótido que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en el
15 péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 (que en lo sucesivo se denominará "moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido inhibidor de KLK5", "moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido inhibidor de KLK5/KLK7" o "moléculas
20 de ácido nucleico que codifican para el péptido inhibidor de KLK5/KLK14"), un vector recombinante con ese gen insertado, una célula con el gen o el vector introducido (que se denominará en lo sucesivo como una "célula que contiene moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido inhibidor de KLK5", una
25 "célula que contiene moléculas de ácido nucleico que codifican

para el péptido inhibidor de KLK5/KLK7" o una "célula que contiene moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido inhibidor de KLK5/KLK14"), una célula que produce el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o
5 el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 (la cual se denominará en lo sucesivo una "célula que produce el péptido inhibidor de KLK5", una "célula que produce el péptido inhibidor de KLK5/KLK7" o una "célula que produce el péptido inhibidor de KLK5/KLK14").

10 Los ejemplos adecuados de las moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido inhibidor de KLK5, las moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o las moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 de la
15 presente invención pueden incluir aquellas que contienen la secuencia de nucleótidos descrita en cualquiera de (a1) a (a4), (b1) a (b4), o (c1) a (c4) más adelante (que se denominará en lo sucesivo como la "secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5", la "secuencia de nucleótidos del péptido
20 inhibidor de KLK5/KLK7", o la "secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK14", respectivamente), los compuestos por una secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5, la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK7, o
25 la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de

KLK5/KLK14, o aquellos compuestos por la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5, la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK7, o la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK14:

5 (a1) una secuencia de nucleótidos compuesta por los nucleótidos 1 a 189 en una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos compuesta por los aminoácidos en las posiciones 1 a 63 en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID NOs.: 6, 8,
10 10, 12, 14, 16, 18 y 20 (Figuras 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28) o la secuencia de nucleótidos descrita en cualquiera de SEC. ID NOs.: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 (Figuras 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 y 27);

 (a2) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con
15 una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos descrita en (a1) en condiciones rigurosas y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5;

 (a3) una secuencia de nucleótidos que se forma
20 sustituyendo, suprimiendo, agregando y/o insertando 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 o 2, o 1 nucleótido o residuo de nucleótido en la secuencia de nucleótidos descrita en (a1) y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene una actividad
25 inhibidora de KLK5; y

(a4) una secuencia de nucleótidos que es 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más idéntica a la secuencia de nucleótidos descrita en (a1) y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene
5 una actividad inhibidora de KLK5:

(b1) una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos compuesta por los aminoácidos en las posiciones 1 a 63 en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID N0s.: 22, 24, 26 y 28
10 (Figuras 30, 32, 34 y 36) o una secuencia de nucleótidos compuesta por los nucleótidos 1 a 189 en la secuencia de nucleótidos descrita en cualquiera de SEC. ID N0s.: 21, 23, 25 y 27 (Figuras 29, 31, 33 y 35);

(b2) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con
15 una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos descrita en (b1) en condiciones rigurosas y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK7;

(b3) una secuencia de nucleótidos que se forma
20 sustituyendo, suprimiendo, agregando y/o insertando 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 o 2, o 1 nucleótido o residuo de nucleótido en la secuencia de nucleótidos descrita en (b1) y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene una actividad
25 inhibidora de KLK5/KLK7; y

(b4) una secuencia de nucleótidos que es 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más idéntica a la secuencia de nucleótidos descrita en (b1) y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene
5 una actividad inhibidora de KLK5/KLK7:

(c1) una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos compuesta por los aminoácidos en las posiciones 1 a 63 en la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID NOs.: 30 y 32 (Figuras 38
10 y 40), o una secuencia de nucleótidos compuesto por los nucleótidos 1 a 189 en la secuencia de nucleótidos descrita en SEC. ID NO.: 29 o 31 (Figura 37 o 39);

(c2) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de
15 nucleótidos descrita en (c1) en condiciones rigurosas y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK14;

(c3) una secuencia de nucleótidos que se forma sustituyendo, suprimiendo, agregando y/o insertando 1 a 20, 1
20 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 o 2, o 1 nucleótido o residuo de nucleótido en la secuencia de nucleótidos descrita en (c1) y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK14; y

25 (c4) una secuencia de nucleótidos que es 60%, 70%,

80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más idéntica a la secuencia de nucleótidos descrita en (c1) y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK14.

5 Un péptido mutante de SPINK2 compuesto por una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos descrita en cualquiera de (a1) a (a4), (b1) a (b4) o (c1) a (c4) anteriores o que contiene una secuencia de aminoácidos que inhibe la actividad proteasa de KLK5, KLK5 y
10 KLK7, o KLK5 y KLK14, preferiblemente que inhibe específicamente su actividad proteasa.

 Los nucleótidos 190 a 195 en SEC. ID NO.: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 y 31 (Figuras 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 y 39) no son
15 nucleótidos correspondientes a los de la secuencia de nucleótidos que codifica para SPINK2 humana tipo salvaje (SEC. ID NO.: 1, Figura 9: compuesto por 63 aminoácidos) pero se añaden para expresar el péptido de la presente invención en un aspecto de la presente invención.

20 Sin embargo, las moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 no se limitan a las descritas en (a1) a (a4), (b1) a (b4) o (c1) a (c4), y moléculas de ácido nucleico que contienen una
25 secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de

aminoácidos contenida en un mutante de SPINK2 que tiene una actividad inhibidora de KLK5, actividad inhibidora de KLK5/KLK7 o actividad inhibidora de KLK5/KLK14, preferiblemente, que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC. ID NO.: 61

5 (Figura 69) están incluidas dentro del alcance de las moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14.

Además, la presente invención también proporciona un

10 polinucleótido que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un conjugado de péptido inhibidor de KLK5, un conjugado de péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o un conjugado de péptido inhibidor de KLK5/KLK14 (que se denominará en lo sucesivo "moléculas de

15 ácido nucleico que codifican para el conjugado inhibidor de KLK5", "moléculas de ácido nucleico que codifican para el conjugado inhibidor de KLK5/KLK7" o "moléculas de ácido nucleico que codifican para el conjugado inhibidor de KLK5/KLK14", respectivamente), un vector recombinante con ese

20 gen insertado, una célula con el gen o el vector introducido (que en lo sucesivo se denominará "célula que contiene moléculas de ácido nucleico que codifican para el conjugado inhibidor de KLK5", una "célula que contiene moléculas de ácido nucleico que codifican para el conjugado inhibidor de

25 KLK5/KLK7", o una "célula que contiene moléculas de ácido

nucleico que codifican para el conjugado inhibidor de KLK5/KLK14"), y una célula que produce el conjugado de péptido inhibidor de KLK5, el conjugado de péptido inhibidor de KLK 5/KLK7, o el conjugado de péptido inhibidor de KLK5/KLK14 (que
5 se denominará en lo sucesivo una "célula que produce el conjugado inhibidor de KLK5", una "célula que produce el conjugado inhibidor de KLK5/KLK7", o una "célula que produce el conjugado el conjugado inhibidor de KLK5/KLK14", respectivamente).

10 Ejemplos adecuados de moléculas de ácido nucleico que codifican para el conjugado inhibidor de KLK5, las moléculas de ácido nucleico que codifican para el conjugado inhibidor de KLK5/KLK7 o las moléculas de ácido nucleico que codifican para el conjugado inhibidor de KLK5/KLK14 de la presente invención
15 pueden incluir, respectivamente, las que contengan la secuencia de nucleótidos descrita en cualquiera de (a1) a (a4), (b1) a (b4), o (c1) a (c4) más adelante (que en lo sucesivo se denominará "la secuencia de nucleótidos del conjugado inhibidor de KLK5", "la secuencia de nucleótidos del conjugado inhibidor
20 de KLK5/KLK7", o "la secuencia de nucleótidos del conjugado inhibidor de KLK5/KLK14", respectivamente), las compuestas por una secuencia de nucleótidos que contiene la secuencia de nucleótidos del conjugado inhibidor de KLK5, la secuencia de nucleótidos del conjugado inhibidor de KLK5/KLK7, o la
25 secuencia de nucleótidos del conjugado inhibidor de KLK5/KLK14,

o aquellas compuestas por la secuencia de nucleótidos del conjugado inhibidor de KLK5, la secuencia de nucleótidos del conjugado inhibidor de KLK5/KLK7, o la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5/KLK14:

5 (a1) una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID N0s.: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 y 96 (Figuras 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56 y 106) o la secuencia de nucleótidos descrita en cualquiera de SEC. ID N0s.: 33, 35, 37, 39, 41,
10 43, 45, 47 y 95 (Figuras 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 y 105);

 (a2) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos descrita en (a1) en condiciones rigurosas y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un
15 péptido o un conjugado que tiene una actividad inhibidora de KLK5;

 (a3) una secuencia de nucleótidos que se forma sustituyendo, suprimiendo, agregando y/o insertando 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 o 2, o 1
20 nucleótido o residuo de nucleótido en la secuencia de nucleótidos descrita en (a1) y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido o un conjugado que tiene una actividad inhibidora de KLK5; y

 (a4) una secuencia de nucleótidos que es 60%, 70%,
25 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más idéntica a

la secuencia de nucleótidos descrita en (a1) y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido o un conjugado que tiene una actividad inhibidora de KLK5:

(b1) una secuencia de nucleótidos que codifica para
5 la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEC. ID N°s.: 50, 52, 54 y 56 (Figuras 58, 60, 62 y 64) o la secuencia de nucleótidos descrita en cualquiera de SEC. ID N°s.: 49, 51, 53 y 55 (Figuras 57, 59, 61 y 63);

(b2) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con
10 una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos descrita en (b1) en condiciones rigurosas y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido o un conjugado que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK7;

(b3) una secuencia de nucleótidos que se forma
15 sustituyendo, suprimiendo, agregando y/o insertando 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 o 2, o 1 nucleótido o residuo de nucleótido en la secuencia de nucleótidos descrita en (b1) y codifica para la secuencia de
20 aminoácidos contenida en un péptido o un conjugado que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK7; y

(b4) una secuencia de nucleótidos que es 60%, 70%,
80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más idéntica a la secuencia de nucleótidos descrita en (b1) y codifica para
25 la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido o un

conjugado que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK7:

(c1) una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEC. ID NOs.: 58 y 60 (Figuras 66 y 68) o la secuencia de nucleótidos descrita en SEC. ID NO.: 57 o 59 (Figura 65 o 67);

(c2) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos descrita en (c1) en condiciones rigurosas y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido o un conjugado que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK14;

(c3) una secuencia de nucleótidos que se forma sustituyendo, suprimiendo, agregando y/o insertando 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 o 2, o 1 nucleótido o residuo de nucleótido en la secuencia de nucleótidos descrita en (c1) y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido o un conjugado que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK14; y

(c4) una secuencia de nucleótidos que es 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más idéntica a la secuencia de nucleótidos descrita en (c1) y codifica para la secuencia de aminoácidos contenida en un péptido o un conjugado que tiene una actividad inhibidora de KLK5/KLK14.

Un péptido mutante de SPINK2 compuesto por una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de

nucleótidos descrita en cualquiera de (a1) a (a4), (b1) a (b4) o (c1) a (c4) anteriores o que contiene una secuencia de aminoácidos que inhibe la actividad proteasa de KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14, preferiblemente que inhibe
5 específicamente su actividad proteasa.

Sin embargo, las moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido inhibidor de KLK5, el péptido inhibidor de KLK5/KLK7 o el péptido inhibidor de KLK5/KLK14 no se limitan a las descritas en (a1) a (a4), (b1) a (b4) o (c1)
10 a (c4), y moléculas de ácido nucleico que contengan una secuencia de nucleótidos que codifique para una secuencia de aminoácidos contenida en un conjugado que contenga la secuencia de aminoácidos contenida en un mutante de SPINK2 que tiene una actividad inhibidora de KLK5, actividad inhibidora de
15 KLK5/KLK7, o KLK5/La actividad inhibidora de KLK14, preferiblemente, que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEC. ID NO.: 61 (Figura 69), están todas incluidas dentro del alcance de las moléculas de ácido nucleico que codifican para el conjugado inhibidor de KLK5, las
20 moléculas de ácido nucleico que codifican para el conjugado inhibidor de KLK5/KLK7, o las moléculas de ácido nucleico que codifican para el conjugado inhibidor de KLK5/KLK14.

Para diseñar una secuencia de nucleótidos que codifique para una secuencia de aminoácidos, se pueden usar
25 uno o más codones correspondientes a los aminoácidos

respectivos. Por lo tanto, una secuencia de bases que codifica para una única secuencia de aminoácidos de un péptido puede tener múltiples variaciones. Cuando se seleccionan tales codones, los codones pueden seleccionarse apropiadamente de acuerdo con el uso de codones de una célula hospedera para la expresión, en la que se va a introducir un polinucleótido que contenga la secuencia de nucleótidos o un vector que contenga la misma, o la frecuencia o proporción de uso de una pluralidad de codones se puede ajustar apropiadamente. Por ejemplo, en el caso de usar *Escherichia coli* como célula hospedera, la secuencia de nucleótidos puede diseñarse usando codones que se usen con frecuencia en *Escherichia coli*.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo pueden enlazarse funcionalmente a una o más secuencias reguladoras. Estar "funcionalmente enlazadas" significa permitir que las moléculas de ácido nucleico enlazadas se expresen o permitir que se exprese la secuencia de nucleótidos contenida en las moléculas. Tal secuencia reguladora contiene elementos de secuencia que incluyen información sobre regulación transcripcional y/o regulación traduccional. La secuencia reguladora varía dependiendo de la especie, pero generalmente contiene un promotor y una secuencia no codificante 5' involucrada en el inicio de la transcripción y traducción, tal como una caja procariota -35/-10, secuencia

Shine-Dalgarno, una caja TATA eucariota, secuencia CAAT y secuencia de remate 5'. Esa secuencia puede incluir un elemento potenciador y/o un elemento represor y una secuencia señal traducible, una secuencia líder y similares para suministrar
5 un péptido natural o maduro a un compartimento específico dentro o fuera de la célula hospedera. Además, esa secuencia reguladora puede incluir una secuencia no codificante 3' y la secuencia puede incluir elementos implicados en la terminación de la transcripción, poliadenilación o similares. Sin embargo,
10 cuando una secuencia relacionada con la terminación de la transcripción no funciona suficientemente en una célula hospedera específica, la secuencia puede sustituirse por una secuencia adecuada para la célula.

Los ejemplos de la secuencia promotora pueden incluir
15 un promotor tet, un promotor lacUV5 y un promotor T7 para células procariotas, y un promotor SV40 y un promotor CMV para células eucariotas.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo
20 pueden aislarse o estar contenidas en un vector u otros vehículos de clonación (que en adelante se denominarán simplemente un "vector", tal como un plásmido, fagémido, fago, baculovirus, y cósmido), o un cromosoma, pero no hay limitación para tales formas. El vector puede contener una secuencia de
25 replicación y una secuencia de control que sean adecuadas para

que la célula hospedera se use para la expresión, y un marcador seleccionable que da un fenotipo capaz de seleccionar una célula en la que se hayan introducido las moléculas de ácido nucleico por transformación o similares, además de la secuencia reguladora.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo, y el vector que contiene la secuencia de nucleótidos del péptido de la presente invención o el conjugado del mismo pueden introducirse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como transformación en una célula hospedera capaz de expresar el péptido, el conjugado o la secuencia de nucleótidos. La célula hospedera con las moléculas de ácido nucleico o el vector introducido en ella puede cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión del péptido o la secuencia de nucleótidos. La célula hospedera puede ser procariota o eucariota. Los ejemplos de células procariotas pueden incluir *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, y los ejemplos de células eucariotas pueden incluir levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, células de insectos tales como SF9 y High5, y células animales tales como células HeLa, células CHO, células COS y NS0. El péptido de la presente invención que se expresa puede someterse a la modificación postraducciona l deseada usando una célula eucariota o similar como célula hospedera. Los ejemplos

de la modificación postraducciona pueden incluir la adición de grupos funcionales tales como cadenas de azúcar, la adición de péptidos o proteínas, la conversión de propiedades químicas de aminoácidos y similares. Además, las modificaciones deseadas se pueden aplicar artificialmente al péptido de la presente invención o al conjugado del mismo. Tales péptidos o conjugados modificados también se incluyen dentro del alcance del "péptido" o "conjugado" de la presente invención.

La presente invención también proporciona un método para producir un péptido o un conjugado. El método incluye el paso 1 de cultivar una célula que contenga moléculas de ácido nucleico que codifiquen para un péptido inhibidor de KLK5 (o un conjugado inhibidor de KLK5) o una célula que produzca un péptido inhibidor de KLK5 (o un conjugado inhibidor de KLK5), una célula que contenga moléculas de ácido nucleico que codifiquen para un péptido inhibidor de KLK5/KLK7 (o un conjugado inhibidor de KLK5/KLK7) o una célula que produzca un péptido inhibidor de KLK5/KLK7 (o un conjugado inhibidor de KLK5/KLK7), o una célula que contenga moléculas de ácido nucleico que codifiquen para un péptido inhibidor de KLK5/KLK14 (o un conjugado inhibidor de KLK5/KLK14) o una célula que produzca un péptido inhibidor de KLK5/KLK14 (o un conjugado inhibidor de KLK5/KLK14), y/o el paso 2 de recolectar un mutante de SPINK2 del cultivo obtenido en el paso 1. Operaciones conocidas por los expertos en la técnica como el

fraccionamiento, la cromatografía y la purificación se puede aplicar al paso 2. Por ejemplo, la purificación por cromatografía de afinidad usando un anticuerpo de la presente invención o un fragmento de unión del mismo, que se describe
5 más adelante, se puede aplicar a los mismos.

En algunos aspectos de la invención, el péptido o un péptido incluido en el conjugado tiene enlaces disulfuro intramoleculares. Puede ser preferible administrar el péptido que tenga enlaces disulfuro intramoleculares a un compartimento
10 celular que tenga un entorno oxidativo redox usando una secuencia señal o similar. El entorno oxidativo puede ser proporcionado por el periplasma de bacterias gramnegativas como *Escherichia coli*, el entorno extracelular de bacterias grampositivas, el lumen del retículo endoplásmico de células
15 eucariotas, o similares, y la formación de enlaces disulfuro estructurales puede ser promovido bajo tal ambiente. Además, también es posible producir un péptido que tenga enlaces disulfuro intramoleculares en el citoplasma de una célula hospedera tal como *Escherichia coli*. En tal caso, el péptido
20 puede adquirirse directamente en un estado soluble y plegado o puede recolectarse en forma de un cuerpo de inclusión y luego reconstituirse *in vitro*. Además, también es posible seleccionar una célula hospedera que tenga un entorno intracelular oxidativo para producir un péptido que tenga enlaces disulfuro
25 intramoleculares en el citoplasma de la misma. Mientras tanto,

cuando el péptido no tenga un enlace disulfuro intramolecular, el péptido puede producirse en un compartimento celular que tenga un entorno redox reductor, tal como el citoplasma de bacterias gramnegativas.

5 El péptido de la presente invención o el conjugado del mismo (el resto peptídico contenido en el mismo) se puede producir mediante otros métodos conocidos por los expertos en la técnica, tal como el método de síntesis de péptidos en fase sólida de Merrifield, *et al.*, y síntesis química ejemplificada
10 por un método de síntesis de péptidos químicos sintéticos orgánicos usando t-butoxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), o similares, y traducción *in vitro*.

 En algunos aspectos, la presente invención
15 proporciona un anticuerpo que se une al péptido de la presente invención o un péptido contenido en el conjugado, y un fragmento de unión del mismo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, y el anticuerpo monoclonal no está específicamente limitado,
20 siempre que sea una inmunoglobulina o un derivado de la misma. El fragmento de unión del anticuerpo no está limitado, siempre que tenga una actividad de unión al antígeno, es decir, una actividad de unión al péptido. También se incluyen en las mismas o una de las cadenas pesadas y cadenas ligeras o
25 fragmentos de las mismas, aquellas que carecen de una región

constante o región Fc, y conjugados con otras proteínas o sustancias marcadoras. Ese anticuerpo y un fragmento de unión del mismo se pueden preparar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica y son útiles para la purificación
5 del péptido mediante cromatografía de afinidad, detección del péptido en ensayos clínicos, diagnósticos o similares relacionados con una composición farmacéutica que contenga el péptido o uso del mismo, ensayo inmunológico y similares. El anticuerpo de la presente invención o el fragmento de unión
10 del mismo puede purificarse mediante cromatografía de afinidad usando el péptido de la presente invención al que se une el anticuerpo o el fragmento.

5. Composición farmacéutica

La presente invención también proporciona una
15 composición farmacéutica que contiene el péptido de la presente invención o su conjugado.

La composición farmacéutica que contiene el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo es útil para tratar y/o prevenir diversas enfermedades que son inducidas o
20 exacerbadas por KLK5 (que en lo sucesivo se denominarán "enfermedades relacionadas con KLK5" o "enfermedades ligadas a KLK5") y en donde la supresión de tal inducción o exacerbación, recuperación, mantenimiento o mejora de síntomas, evitación de enfermedades secundarias o similares es posible inhibiendo o
25 suprimiendo la expresión o funciones de KLK5. Ejemplos de

enfermedades relacionadas con KLK5 pueden incluir el síndrome de Netherton (Furio, L., *et al.* (2015) PLoS. Genet., Vol. 11, p. E1005389), dermatitis atópica (Fortugno, P., *et al.* (2012) Hum. Mol. Genet., Vol. 21, pp. 4187-4200), rosácea (Yamasaki, K., *et al.* (2007) Nat. Med., Vol. 13, pp. 975-980), lesión cutánea inducida por UV (Nin, M., *et al.* (2009) J. Dermatol. Sci., Vol. 54, pp. 17-24), psoriasis (Komatsu, N., *et al.* (2007) Br. J. Dermatol., Vol. 156, pp. 875-883), asma (Grunberg, M., *et al.* (2018) Eur. J. Immunol., Vol. 48, pp. 1592-1594), lesión de la médula espinal (Radulovic, M., *et al.* (2013) J. Neuropathol. Exp. Neurol., Vol. 72, pp. 1072-1089), cáncer (tal como cáncer de útero, cáncer urotelial de vejiga, cáncer colorrectal, carcinoma oral de células escamosas, mama cáncer, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de próstata y glioma) (Emami, N., *et al.* (2007) Mol. Oncol., Vol. 1, pp. 269-287), y esófago de Barrett (Gene Expression Omnibus, con base en el número de registro GSE13083), pero no hay limitación para estos ejemplos.

Se considera que KLK5 es el factor principal en el desarrollo de síntomas cutáneos similares al síndrome de Netherton. KLK5 es una proteasa autoactivada y también participa en la activación de KLK7 y KLK14. Mientras tanto, en el estrato córneo de pacientes con síndrome de Netherton y ratones modelo con síndrome de Netherton, se observan altas actividades de proteasa tales como tripsina y quimotripsina, y

se sugiere que la familia de calicreína ubicada corriente abajo, tal como KLK7 y KLK14, está relacionada con la actividad de proteasa en el estrato córneo, además de KLK5. Se espera que haya casos en los que los síntomas cutáneos similares al
5 síndrome de Netherton puedan suprimirse con más fuerza inhibiendo KLK7 o KLK14 además de KLK5. En la base de datos de mutaciones de genes humanos (HGMD, por sus siglas en inglés) se enumeran 70 o más ejemplos de mutaciones en SPINK5 asociadas con el síndrome de Netherton y se informa que están
10 relacionadas con la gravedad del síndrome de Netherton. Las mutaciones en los exones 1 a 9 de SPINK5 están relacionadas con patologías más graves del síndrome de Netherton. Se puede determinar si la composición farmacéutica que contiene el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo debe
15 usarse para tratar o prevenir el síndrome de Netherton investigando las mutaciones en SPINK5.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del péptido o del conjugado y diluyentes, portadores,
20 solubilizantes, emulsionantes, conservadores y/o agentes auxiliares farmacéuticamente aceptables.

El término "cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz" significa una cantidad que ejerce un efecto terapéutico o profiláctico para una enfermedad, forma de administración o
25 vía de administración específicas, y tiene el mismo significado

que una "cantidad farmacológicamente eficaz".

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener materiales para cambiar, mantener o conservar el pH, la presión osmótica, la viscosidad, la transparencia, el color, la isotonicidad, la esterilidad o la estabilidad, la solubilidad, la liberación sostenida, la capacidad de absorción, la permeabilidad, la forma de dosificación, la fuerza, las propiedades, la forma, etc., de la composición o el péptido, el conjugado o similar contenido en la composición (que en adelante se denominará "materiales farmacéuticos"). Los materiales farmacéuticos no están específicamente limitados, siempre que sean materiales farmacológicamente aceptables. Por ejemplo, la toxicidad nula o baja es una propiedad que poseen preferiblemente los materiales farmacéuticos.

Los ejemplos de materiales farmacéuticos pueden incluir, entre otros, los siguientes: aminoácidos como glicina, alanina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina, agentes antibacterianos, antioxidantes tales como ácido ascórbico, sulfato de sodio o bisulfito de sodio, amortiguadores tales como amortiguadores de fosfato, citrato o borato, solución de bicarbonato de sodio o ácido tris-clorhídrico (Tris-HCl), cargas tales como manitol y glicina, agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), agentes complejantes tales como cafeína,

polivinilpirrolidina, β -ciclodextrina o hidroxipropil- β -ciclodextrina, agentes de carga tales como glucosa, manosa o dextrina, monosacáridos, disacáridos, otros carbohidratos tales como glucosa, manosa o dextrina, colorantes, 5 saborizantes, diluyentes, emulsionantes, polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidina, conservadores tales como polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de sales, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol feniletílico, metilparabeno, 10 propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno, solventes tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol (PEG), alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol, agentes de suspensión, polisorbato tales como éster de sorbitán, polisorbato 20 o polisorbato 80, 15 tensioactivos tales como Triton, trometamina, lecitina o colesterol, potenciadores de la estabilidad tales como sacarosa o sorbitol, potenciadores de la elasticidad tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol o sorbitol, agentes de transporte, diluyentes, excipientes y/o agentes auxiliares 20 farmacéuticos.

La cantidad de estos materiales farmacéuticos a añadir es de 0.001 a 1000 veces, preferiblemente de 0.01 a 100 veces, más preferiblemente de 0.1 a 10 veces, el peso del péptido de la presente invención o el péptido contenido en el 25 conjugado.

Un liposoma que contiene el péptido de la presente invención o el conjugado y una composición farmacéutica que contiene una forma modificada formada uniendo el péptido al liposoma también se incluyen dentro de la composición farmacéutica de la presente invención.

Los excipientes o portadores no están particularmente limitados siempre que sean materiales líquidos o sólidos usados habitualmente para la administración oral o parenteral, tales como agua inyectable, solución salina, fluidos cerebroespinales artificiales y otras preparaciones. Los ejemplos de solución salina pueden incluir solución salina neutra y solución salina que contiene albúmina sérica.

Los ejemplos de amortiguadores pueden incluir un amortiguador Tris ajustado para llevar el pH final de la composición farmacéutica a 7.0 a 8.5, un amortiguador de acetato ajustado para llevar su pH final a 4.0 a 5.5, un amortiguador de citrato ajustado para llevar su pH final a 5.0 a 8.0 y un amortiguador de histidina ajustado para llevar su pH final a 5.0 a 8.0.

La composición farmacéutica de la presente invención es un sólido, un líquido, una suspensión o similar. Otro ejemplo de la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir una preparación liofilizada. La preparación liofilizada se puede formar usando un excipiente tal como sacarosa.

La vía de administración de la composición farmacéutica de la presente invención puede ser cualquier colirio, administración enteral, administración tópica y administración parenteral. Los ejemplos de los mismos pueden
5 incluir gotas para los ojos en la conjuntiva, administración intravítrea, administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intraperitoneal, administración transdérmica, administración
10 intraósea y administración intraarticular.

La composición de la composición farmacéutica se puede determinar dependiendo del método de administración, la actividad del péptido de la presente invención o el péptido contenido en el conjugado de KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14,
15 la afinidad de unión o similares. Cuanto más fuerte sea la actividad inhibidora (menor sea el valor de IC_{50} o valor de K_i) o mayor sea la afinidad (menor sea el valor de K_D) por el objetivo del péptido inhibidor de la presente invención, entonces la eficacia puede ejercerse con una dosis menor.

20 La dosis del péptido de la presente invención o el conjugado del mismo no está limitada, siempre que sea una cantidad farmacológicamente eficaz, y pueda determinarse de forma apropiada dependiendo de la especie del individuo, el tipo de enfermedad, el síntoma, el género, la edad, la
25 enfermedad crónica, la actividad inhibidora contra el objetivo

del péptido, la afinidad de unión y otros factores, pero el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo se administra generalmente de 0.01 a 1000 mg/kg, preferiblemente 0.1 a 100 mg/kg, una, dos o más veces al día durante 1 a 180 días.

Los ejemplos de la forma de la composición farmacéutica pueden incluir inyecciones (incluidas preparaciones liofilizadas y gotas), supositorios, preparaciones de absorción transnasal, preparaciones de absorción transdérmica, formulaciones sublinguales, cápsulas, tabletas, ungüentos, gránulos, aerosoles, píldoras, polvos, suspensiones, emulsiones, gotas para los ojos y formulaciones de implantes biológicos.

La composición farmacéutica que contiene el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo como ingrediente activo se puede administrar de forma simultánea o separada con otros fármacos. Por ejemplo, la composición farmacéutica que contiene el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo como ingrediente activo puede administrarse después de la administración de otros medicamentos, pueden administrarse otros medicamentos después de la administración de la composición farmacéutica o la composición farmacéutica puede administrarse simultáneamente con otros fármacos. En el caso de la administración simultánea, el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo y

otros fármacos pueden estar contenidos en una sola preparación o en preparaciones separadas (una pluralidad de preparaciones).

Se pueden administrar o recibir uno, dos, tres o más de tales otros fármacos. Estos se denominan colectivamente "uso
5 combinado de otros fármacos" con o "combinación con otros fármacos" de la composición farmacéutica de la presente invención. La composición farmacéutica de la presente invención que contiene otros fármacos además del péptido de la presente invención o el conjugado del mismo o se usa en combinación con
10 otras terapias también se incluye dentro de la presente invención como un aspecto del "uso combinado de otros fármacos" o "combinación con otros fármacos".

Los ejemplos de los mismos contra el síndrome de Netherton pueden incluir humectantes, fármacos esteroides y
15 agentes antibacterianos. Los ejemplos de los mismos contra la dermatitis atópica pueden incluir fármacos esteroides, inhibidores de calcineurina, inhibidores de PDE4, fármacos inmunosupresores, inhibidores de IL-4/IL-13 y fototerapia. Los ejemplos de los mismos contra la rosácea pueden incluir
20 doxiciclina, minociclina, ácido azelaico y brimonidina. Los ejemplos de los mismos contra la psoriasis pueden incluir inhibidores de $\text{TNF}\alpha$, inhibidores de IL-12/23, inhibidores de IL-17, inhibidores de PDE4, antimetabolitos, inhibidores de calcineurina, éster de fumarato, preparaciones de retinoides,
25 fármacos esteroides, análogos de vitamina D3 y fototerapia.

Los ejemplos de los mismos contra el asma pueden incluir fármacos esteroides y agonistas de $\beta 2$. Los ejemplos de los mismos contra cánceres tales como cáncer de útero, cáncer urotelial de vejiga, cáncer colorrectal, carcinoma oral de
5 células escamosas, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de próstata y glioma pueden incluir varios agentes anticáncer.

La presente invención también proporciona un método para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con KLK5, el
10 método comprende un paso de administrar el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo, el uso del péptido de la presente invención o el conjugado del mismo en la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir las enfermedades, y uso del péptido o del conjugado
15 para tratar y prevenir las enfermedades. También se incluye dentro de la presente invención un kit de tratamiento o prevención que contiene el péptido o el conjugado.

Además, también se proporciona una composición farmacéutica que contiene un polinucleótido que contiene la
20 secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente invención o su conjugado, un vector que contiene el polinucleótido, una célula que contiene el polinucleótido o el vector, o una célula que expresa el péptido de la presente invención o el conjugado de
25 la misma. Por ejemplo, el polinucleótido y el vector se pueden

aplicar a la terapia génica de las enfermedades relacionadas con KLK5, y las células se pueden aplicar a la terapia celular de las enfermedades relacionadas con KLK5, respectivamente, usando métodos conocidos. Además, las células para la terapia
5 celular se pueden preparar, por ejemplo, introduciendo el polinucleótido o el vector en células autólogas o células alogénicas (el mismo tipo de células). El polinucleótido y el vector se incluyen en la presente invención también como composiciones para preparar agentes terapéuticos celulares.
10 Sin embargo, el aspecto de la composición farmacéutica que contiene el polinucleótido, el vector, la célula o similares de la presente invención no se limita a lo anterior.

Puede usarse un modelo animal como medio para evaluar el efecto terapéutico, frente a enfermedades relacionadas con
15 KLK5, del péptido o del conjugado del mismo contenido en la composición farmacéutica de la presente invención como ingrediente activo. Ejemplos de un modelo de síndrome de Netherton que tiene una mutación en el gen SPINK5 que es el gen causante del síndrome de Netherton pueden incluir ratones
20 con deficiencia del gen SPINK5 (Descargues, P., *et al.* (2004) Nat. Genet., Vol. 37, pp. 56-65), ratones knockout condicional del gen SPINK5 (Petrova, E., *et al.* (2019) oral presentation in the 8th International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-Related Peptidases: Abstract Book, p. 28), y ratones
25 Crusty2 (base de datos Mutagenetix), pero estos ejemplos no

tienen ninguna limitación.

6. Composición de diagnóstico

Se proporciona una composición para ensayo o diagnóstico que contiene el péptido de la presente invención o
5 el conjugado del mismo (que en lo sucesivo se denominará colectivamente como la "composición de diagnóstico").

La composición de diagnóstico de la presente invención es útil para probar o diagnosticar enfermedades relacionadas con KLK5, expresión de KLK5, expresión de KLK7,
10 expresión de KLK14 o similares. En la presente invención, los ejemplos de la prueba o diagnóstico incluyen la determinación o medición del riesgo de morbilidad, la determinación de la morbilidad, la medición del grado de progresión o exacerbación, la medición o determinación del efecto del tratamiento
15 farmacológico con la composición farmacéutica que contiene el péptido de la presente invención o el conjugado de la misma, medición o determinación del efecto de tratamientos distintos del tratamiento farmacológico, medición del riesgo de recurrencia y determinación de recurrencia. Sin embargo, estos
20 ejemplos no tienen ninguna limitación, siempre que sean pruebas o diagnósticos.

La composición de diagnóstico de la presente invención es útil para identificar a un individuo al que se va a administrar el péptido de la presente invención o su
25 conjugado, la composición que lo contiene o la composición

farmacéutica que lo contiene.

Tal composición de diagnóstico puede contener amortiguadores de pH, osmorreguladores, sales, estabilizadores, conservadores, reveladores, sensibilizadores, 5 inhibidores de agregación y similares.

La presente invención también proporciona un método para probar o diagnosticar enfermedades relacionadas con KLK5, el uso del péptido de la presente invención para preparar una composición de diagnóstico para las enfermedades y el uso del 10 péptido de la presente invención para probar o diagnosticar las enfermedades. También se incluye dentro de la presente invención un kit para prueba o diagnóstico que contiene el péptido de la presente invención.

En cuanto a un método de prueba o diagnóstico usando 15 el péptido de la presente invención, es deseable el ELISA tipo sándwich, pero se pueden usar métodos de detección tales como ELISA convencional o RIA, ELISPOT (ImmunoSpot ligado a enzimas), dot blotting, el método Ouchterlony, CIE (Contrainmunoelectroforesis), CLIA (inmunoensayo 20 quimioluminiscente) y FCM (citometría de flujo). Para la detección, se usan anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos, o aquellos marcados con el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo. Para el marcado o etiquetado, se pueden usar métodos de marcado o etiquetado que 25 se pueden usar para análisis bioquímicos tales como el

etiquetado con fluoróforos tales como HRP, fosfatasa alcalina y FITC, radioisótopos o similares, además de biotina. Para la detección usando un marcador enzimático, se pueden usar sustratos de quimioluminiscencia, además de sustratos cromogénicos tales como TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), BCIP (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo), p-NPP (fosfato de p-nitrofenilo), OPD (o-fenilendiamina), ABTS (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y sustrato quimioluminiscente SuperSignal ELISA Pico (Thermo Fisher Scientific) y sustratos de fluorescencia tal como sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu (R) (Thermo Fisher Scientific). Pueden someterse a este ensayo muestras derivadas de seres humanos o animales no humanos, así como muestras tratadas artificialmente, tales como proteínas recombinantes. Los ejemplos de muestras de prueba derivadas de organismos individuales pueden incluir, pero no se limitan a, sangre, fluidos sinoviales, ascitis, linfa, fluidos cerebrospinales, lavado broncoalveolar, saliva, flema, sobrenadantes de homogeneizado de tejido y secciones de tejido.

Un kit ELISA tipo sándwich para análisis o diagnóstico que contenga el péptido de la presente invención puede contener reactivos colorantes, amortiguadores para dilución, proteínas para fase sólida, proteínas para detección, soluciones de lavado o similares, así como soluciones estándar de proteínas que comprendan el péptido de la presente invención

o el conjugado de la misma. Como método para medir la cantidad de proteína unida a un antígeno, se aplica adecuadamente un método de absorción, un método de fluorescencia, un método de luminiscencia, un método RI (radioisótopo) o similares, y para
5 la medición, se usa preferiblemente un lector de placas de absorción, un lector de placas de fluorescencia, un lector de placas de luminiscencia, un contador de centelleo líquido RI o similares.

Además, las pruebas o diagnósticos se pueden llevar
10 a cabo mediante métodos que usen inmunoprecipitación.

Además, la presente invención también proporciona un método para detectar o medir KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14 en una muestra de prueba. La composición de diagnóstico de la presente invención puede usarse para tal método de detección o
15 medición. KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14 en la muestra de prueba pueden detectarse poniendo el péptido de la presente invención o su conjugado en contacto con la muestra de prueba (paso 1) y luego midiendo la cantidad de KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14 unidos al péptido o al conjugado (paso 2). Los
20 ejemplos del paso 1 pueden incluir inmovilizar una región Fc de una inmunoglobulina conjugada con el péptido de la presente invención en perlas magnéticas a través de la proteína G y agregar la muestra de prueba a las mismas, y los ejemplos del paso 2 pueden incluir separar las perlas magnéticas y analizar
25 las proteínas solubles precipitadas junto con las perlas

mediante SDS-PAGE o Western blot para detectar KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14. Las muestras tratadas artificialmente, tal como las proteínas recombinantes, pueden someterse a esta medición, además de las muestras derivadas de animales humanos
5 o no humanos. Los ejemplos de muestras de prueba derivadas de organismos individuales pueden incluir, pero no se limitan a, sangre, fluidos sinoviales, ascitis, linfa, fluidos cerebroespinales, lavado broncoalveolar, saliva, flema, sobrenadantes de homogeneizado de tejido y secciones de tejido.

10 La detección de KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14 se puede llevar a cabo no solo *in vitro* sino también *in vivo*. En el caso de la formación imagenología de diagnóstico, se puede usar el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo marcado con un radionúclido o material luminiscente
15 farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos del paso 1 pueden incluir la administración del péptido marcado o el conjugado del mismo a un sujeto de prueba, y los ejemplos del paso 2 pueden incluir capturar una imagen usando una técnica de diagnóstico por imagenología tal como PET/CT y determinar o
20 probar la presencia de KLK5, KLK5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14.

El péptido o el conjugado del mismo contenido en la composición de diagnóstico de la presente invención se une a KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14, y preferiblemente tiene actividad de unión específica de KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y
25 KLK14.

También se incluye dentro de la presente invención un método para identificar a un individuo al que se va a administrar la composición farmacéutica de la presente invención. En ese método de identificación, se mide KLK5, KLK5
5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14 en una muestra derivada del individuo, y se puede determinar que el individuo sea positivo cuando KLK5, KLK5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14 se detecte en la muestra, o se detecte KLK5, KLK5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14 en una cantidad mayor que la cantidad de KLK5, KLK5 y/o KLK7, o
10 se detecte KLK5 y/o KLK14 en otra muestra derivada de un individuo sano. Para este método, se puede usar la composición de diagnóstico de la presente invención.

Además, en un aspecto adecuado del método de identificación, el individuo tiene o está en riesgo de padecer
15 enfermedades relacionadas con KLK5.

Además, en un aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar a un individuo que se determine que sea positivo en el método de identificación.

20 7. Método para separar KLK5, KLK5 y KLK7, o KLK5 y KLK14

El péptido de la presente invención o el conjugado del mismo tiene preferiblemente una actividad de unión específica para KLK5, KLK5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14. En
25 consecuencia, KLK5, KLK5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14 se pueden

separar específicamente de una muestra en la que KLK5, KLK5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14 se mezclan con otras KLKs, usando el péptido de la presente invención o el conjugado de la misma. La liberación de KLK5, KLK5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14 del
5 péptido o del conjugado se puede llevar a cabo de forma no selectiva, por ejemplo, bajo una fuerza iónica relativamente alta, un pH bajo, condiciones de desnaturalización moderadas, en la presencia de sales caotrópicas, o similares, pero preferiblemente se lleva a cabo dentro de un intervalo en donde
10 la actividad proteasa de KLK5, KLK5 y/o KLK7, o KLK5 y/o KLK14 no está atenuada.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos, se describirán más específicamente algunos aspectos de la presente invención. Sin
15 embargo, la presente invención no se limita a ellos.

En los siguientes ejemplos, las operaciones relacionadas con la ingeniería genética se realizaron de acuerdo con los métodos descritos en "Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, EF, y Maniatis, T., Cold Spring Harbor
20 Laboratory Press, publicado en 1982 o publicado en 1989) y otros métodos descritos en manuales experimentales usados por los expertos en la técnica, o de acuerdo con las instrucciones de productos disponibles comercialmente en los casos en los que se usaron reactivos o kits disponibles comercialmente, a
25 menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1. Preparación del péptido inhibidor de KLK5

(1-1) Construcción del vector de expresión del péptido inhibidor de KLK5

Usando la secuencia de nucleótidos de cada péptido
 5 inhibidor (SEC. ID NO.: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23,
 25, 27, 29 o 31) y la secuencia de nucleótidos de SPINK2 como
 plantillas, los fragmentos de péptidos inhibidores se
 amplificaron mediante PCR ((a 94°C durante 15 segundos, a 60°C
 durante 30 segundos y a 68°C durante 20 segundos) × 30 ciclos)
 10 usando los siguientes cebadores y KOD-plus-(TOYOBO).

Cebador 1: 5'-
 AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3' (SEC. ID NO.:
 62, Figura 70)

Cebador 2: 5'-
 15 AAAACTCGAGTTAGCCGCCGCACGGACCATTGCGAATAA-3' (SEC. ID NO.: 63,
 Figura 71)

Los fragmentos amplificados se sometieron a
 electroforesis en gel de agarosa, y luego se cortaron los
 fragmentos de ADN deseados, para preparar ADN usando un kit de
 20 extracción en gel QIAquick (QIAGEN). Los fragmentos de ADN
 preparados y pET 32a (Novagen) se trataron usando las enzimas
 de restricción BamHI (NEB) y XhoI (NEB) a 37°C durante 1 hora
 o más, y después de la electroforesis en gel de agarosa, se
 cortaron los fragmentos de ADN deseados, seguido de
 25 purificación usando un kit de purificación QIAquick PCR

(QIAGEN). Usando un sistema de ligadura rápida de ADN LigaFast (Promega), cada fragmento purificado se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos para llevar a cabo una reacción de ligadura. La solución de ligación se añadió a
5 *Escherichia coli* JM109 (TOYOB0), se dejó reposar en hielo durante 30 minutos, luego se trató con calor a 42°C durante 45 segundos, se dejó reposar en hielo durante 5 minutos, se sembró en una placa 2YT que contenía 0.1 mg. /mL de ampicilina, y luego se cultivó estáticamente a 37°C durante la noche, para
10 transformar la *Escherichia coli*. Al día siguiente, la *Escherichia coli* transformada se inoculó en un medio Caldo Terrific (Invitrogen) que contenía 0.1 mg/mL de ampicilina y se cultivó a 37°C durante la noche. Más adelante, se recolectó ADN plasmídico usando un kit QIAprep 96 Turbo Miniprep (Qiagen)
15 (que se denominará en lo sucesivo "tratamiento miniprep") y se llevó a cabo un análisis de secuencia para construir un vector peptídico inhibidor de pET 32a_Kex2_KLK5.

(1-2) Preparación del péptido inhibidor de KLK5

Se transformó *Escherichia coli* Origami B (DE3)
20 (Novagen) con el vector construido en (1-1) y se cultivó a 37°C usando un medio 2YT que contenía 0.1 mg/mL de ampicilina. Más adelante, se le añadió IPTG (con una concentración final de 1 mM), seguido de cultivo a 16°C durante la noche. Al día siguiente, después de recolectar las células por centrifugación
25 (3000 g, 20 minutos y 4°C), se preparó un lisado usando

BugBuster Master Mix (Novagen), y se purificó una proteína objetivo de fusión de la etiqueta His usando TALON Metal Affinity Resin (Clontech). Más adelante, se escindió una etiqueta de tiorredoxina de la proteína deseada usando Kex2
 5 (*Saccharomyces cerevisiae*: No. de registro CAA96143) y se purificó usando TALON. Además, se aplicó cromatografía de filtración en gel (Superdex75 10/300 GL) o cromatografía de fase inversa (YMC-Pack ODS-AM) para preparar 14 tipos de péptidos inhibidores de KLK5. Las secuencias de aminoácidos de
 10 los derivados se muestran en SEC. ID N0s.: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 (Figuras 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40).

Ejemplo 2. Preparación de KLK5, KLK7 y KLK14

(2-1) Construcción de vectores de expresión de KLK5
 15 humana, KLK7 humana y KLK14 humana

Los cebadores y las condiciones de PCR usados para clonar pro-KLK5 humana, pro-KLK7 humana y pro-KLK14 humana fueron los siguientes. El fragmento A se amplificó mediante PCR ((a 94°C durante 15 segundos, a 60°C durante 30 segundos y
 20 a 68°C durante 10 segundos) × 30 ciclos) usando los siguientes cebadores y KOD-plus-(TOYOBO).

Cebador	3:	5' -
GGCGATTATAAAGATGACGATGATAAACACCATCACCACCATC-3' (SEC. ID NO.: 64, Figura 72)		

25	Cebador	4:	5' -
----	---------	----	------

65, Figura 73)

Luego, usando secuencias de nucleótidos que codifican para pro-KLK5 humana (Uniprot: Q9Y337), pro-KLK7 humana (Uniprot: P49862) y pro-KLK14 humana (Uniprot: Q9P0G3) respectivamente como plantillas, los fragmentos se amplificaron mediante PCR ((a 94°C durante 15 segundos, a 60°C durante 30 segundos y a 68°C durante 60 segundos) × 30 ciclos) usando los siguientes cebadores y KOD-plus-(TOYOBO).

10 Cebador de amplificación de pro-KLK5 humana

Cebador 5: 5' -
AAAATCTAGAGCCGCCACCATGGCCACAGCTAGACCCCT-3' (SEC. ID NO.: 66,
Figura 74)

Cebador 6: 5' -
15 CGTCATCTTTATAATCGCCGCTGTTGGCCTGGATGGTTTCCTG-3' (SEC. ID NO.:
67, Figura 75)

Cebador de amplificación de pro-KLK7 humana

Cebador 7: 5' -
AAAATCTAGAGCCGCCACCATGGCCAGATCTCTGCTGCTGCCC-3' (SEC. ID NO.:
20 68, Figura 76)

Cebador 8: 5' -
CGTCATCTTTATAATCGCCCCGGTGTTTCTTCATGGTGTCGTT-3' (SEC. ID NO.:
69, Figura 77)

Cebador de amplificación de pro-KLK14 humana

25 Cebador 9: 5' -

AAAATCTAGAGCCGCCACCATGTTTCCTCCTCCTCACCGCCCTC-3' (SEC. ID NO.: 70, Figura 78)

Cebador 10: 5'-
CGTCATCTTTATAATCGCCCTTGTCGCGCATGGTCTCCTCGAT-3' (SEC. ID NO.: 71, Figura 79)

Los fragmentos de ADN deseados se amplificaron mediante PCR superpuesta usando los fragmentos amplificados anteriormente y el fragmento A, los siguientes cebadores y KOD-plus-(TOYOBO).

10 Cebador 5 (SEC. ID NO.: 66, Figura 74) o cebador 7 (SEC. ID NO.: 68, Figura 76) o cebador 9 (SEC. ID NO.: 70, Figura 78) y

Cebador 11: 5'-AAAAGTTTAAACTCAATGATGGTGGTGGTGT-3' (SEC. ID NO.: 72, Figura 80)

15 Luego, usando secuencias de nucleótidos que codifican para pro-KLK7 de ratón (Uniprot: Q91VE3) o pro-KLK14 de ratón (Uniprot: Q8CGR5) respectivamente como plantillas, los fragmentos se amplificaron mediante PCR ((a 94°C durante 15 segundos, a 60°C durante 30 segundos y a 68°C durante 60
20 segundos) × 30 ciclos) usando los siguientes cebadores y KOD-plus-(TOYOBO).

Cebador de amplificación de pro-KLK7 de ratón

Cebador 12: 5'-
AAAATCTAGAGCCGCCACCATGGGAGTGTGGCTGCTGAGCCTG-3' (SEC. ID NO.: 73, Figura 81)

Cebador 13: 5' -
 AAAAGTTTAAACTCAATGATGGTGGTGATGGTGCCGGTGGGTCTTCATGGTTTCCATG-3'

(SEC. ID NO.: 74, Figura 82)

Cebador de amplificación de pro-KLK14 de ratón

5 Cebador 14: 5' -

AAAATCTAGAGCCGCCACCATGTTTCTGCTGCTGATCATCCTG-3' (SEC. ID NO.:
 75, Figura 83)

Cebador 15: 5' -
 AAAAGTTTAAACTCAATGATGGTGGTGATGGTGGTTGCTCTGCATGGTCCGCTGAA-3'

10 (SEC. ID NO.: 76, Figura 84).

Los vectores de expresión de células de mamíferos
 pCMA_pro-hKLK5, pCMA_pro-hKLK7, pCMA_pro-hKLK14, pCMA_pro-
 mKLK7 y pCMA_pro-mKLK14 con una etiqueta His añadida en el
 extremo C-terminal codificado por cada gen se construyeron
 15 mediante clonación usando los fragmentos de ADN deseados así
 amplificados y enzimas de restricción XbaI (NEB) y PmeI (NEB).
 La operación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito
 en (1-1).

(2-2) Expresión y purificación de KLK5 humana, pro-
 20 KLK7 humana, pro-KLK14 humana, pro-KLK7 de ratón y pro-KLK14
 de ratón

Cada vector de expresión construido en (2-1) se
 transfectó en células Expi293F (Thermo Fisher Scientific)
 usando PEI MAX 40000 (Polysciences), y el sobrenadante del
 25 cultivo se recolectó después de 3 días de cultivo de las

células. La proteína de fusión de la etiqueta His deseada se recolectó del sobrenadante del cultivo usando HisTrap excel (GE healthcare), y el amortiguador se reemplazó con PBS usando Amicon Ultra NMWL 10.000 (Merck KGaA Millipore), para purificar
5 KLK5 humana, pro-KLK7 humana, pro-KLK14 humana, pro-KLK7 de ratón y pro-KLK14 de ratón, respectivamente.

(2-3) Preparación de KLK5 humana, KLK7 humana, KLK14 humana, KLK5 de ratón, KLK7 de ratón y KLK14 de ratón

A 200 $\mu\text{g/mL}$ de pro-KLK7 o 14 preparado usando un
10 amortiguador de activación KLK (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 10 mM, Brij-35 al 0.05% (p/p), pH 7.5), se añadió una cantidad igual de termolisina 20 g/mL, seguida de reacción durante un cierto tiempo a 37°C. Luego, se mezcló una cantidad igual de EDTA 100 mM para preparar KLK7 humana activada, KLK14
15 humana activada, KLK7 de ratón activada y KLK14 de ratón activada.

Además, 200 $\mu\text{g/mL}$ de KLK5 de ratón (R&D Systems, Inc., 7236-SE) y 2 $\mu\text{g/mL}$ de KLK5 humana preparada usando un amortiguador de activación (Tris-HCl 50 mM, 0.005% (p/p) Brij-
20 35, pH 8.0) se mezclaron en cantidades iguales, seguido de reacción a 37°C durante 24 horas, para preparar KLK5 de ratón activada.

Ejemplo 3. Evaluación del péptido inhibidor de KLK5

(3-1) Evaluación de las actividades inhibidoras de
25 KLK5 humana/de ratón, KLK7 humana/de ratón y KLK14 humana/de

ratón del péptido inhibidor de KLK5

El péptido sustrato se disolvió en DMSO hasta 10 mM y se diluyó con un amortiguador de ensayo (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0) para su uso. Se mezclaron 25 µL de cada KLK5 humana/de ratón, KLK7 humana/de ratón o KLK14 humana/de ratón y el péptido inhibidor diluido con el amortiguador de ensayo, seguido de una reacción a 37°C durante 20 minutos. Luego, se le añadieron 50 µL de un sustrato diluido con el amortiguador de ensayo y se midió la señal de fluorescencia usando Enspire (PerkinElmer). Las combinaciones de enzima y sustrato usadas fueron las siguientes. Cada péptido inhibidor tenía una concentración final de 0.098 a 1000 nM, y se usó una placa negra PROTEOSAVE® SS96F (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) para la reacción y la medición.

15 Evaluación de la actividad inhibidora de KLK5 humana: hKLK5 con una concentración final de 10 nM, un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc.) con una concentración final de 100 µM y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm

20 Evaluación de la actividad inhibidora de KLK7 humana: hKLK7 con una concentración final de 1 µg/mL, un sustrato péptido Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys (Dnp) - NH₂ (R&D Systems, Inc., Figura 85, y la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC. ID NO.: 77) con una concentración final de 20 µM, y una señal de fluorescencia con excitación a

25

320 nm/emisión a 405 nm

Evaluación de la actividad inhibidora de KLK14 humana: hKLK14 con una concentración final de 0.2 µg/mL, un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC con una concentración
5 final de 100 µM (R&D Systems, Inc.) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm

Evaluación de la actividad inhibidora de KLK5 de ratón: KLK5 de ratón con una concentración final de 0.25 µg/mL, un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC con una concentración
10 final de 100 µM (R&D Systems, Inc.) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm

Evaluación de la actividad inhibidora de KLK7 de ratón: KLK7 de ratón con una concentración final de 0.5 µg/mL, un sustrato péptido Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys (Dnp)-NH₂ con una concentración final de 7 µM (R&D Systems,
15 Inc., Figura 85, y la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC. ID NO.: 77), y una señal de fluorescencia con excitación a 320 nm/emisión a 405 nm

Evaluación de la actividad inhibidora de KLK14 de ratón: KLK14 de ratón con una concentración final de 0.1 µg/mL, un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC con una concentración
20 final de 100 µM (R&D Systems, Inc.) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm

Como resultado de calcular la tasa de degradación
25 del péptido sustrato por cada péptido inhibidor en cada

concentración y calcular la concentración inhibitoria del 50% (IC_{50}) usando GraphPad Prism (versión 5.0; GraphPad Software Inc.) con la tasa de degradación del péptido inhibidor en una concentración de 0 nM tomada como 100%, se mostró que todos los péptidos inhibidores inhibían la actividad enzimática de KLK5 humana a concentraciones bajas (Tabla 1, Figura 2). Algunos de los péptidos inhibidores inhibieron la actividad enzimática de KLK7 humana o KLK14 humana a bajas concentraciones, y algunos de los péptidos inhibidores exhibieron actividades inhibitoras débiles contra estas proteasas (Tabla 1). Los péptidos inhibidores también exhibieron una actividad similar contra KLK5, KLK7 o KLK14 de ratón (Tabla 2). Se usó el valor medio de tres experimentos independientes para calcular el valor de IC_{50} .

Tabla 1
Actividad inhibitoria de KLK5 humana, KLK7 humana o KLK14 humana de cada péptido inhibidor de KLK5

ID	IC_{50} (nM) para hKLK5	IC_{50} (nM) para hKLK7	IC_{50} (nM) para hKLK14
K51028	6.1±0.5	249±25	>1,000
K50032	7.1±0.4	>1,000	>1,000
K50055	6.7±0.2	>1,000	>1,000
K51069	6.8±0.4	>1,000	72±23
K51072	7.0±0.2	>1,000	434±18

5	K50015	6.8±0.3	>1,000	17±1
	K50016	6.9±1.1	>1,000	>1,000
	K51034	6.4±0.3	>1,000	>1,000
	K50062	7.5±0.7	>1,000	499±27
	K51090	4.5±0.3	>1,000	>1,000
	K50098	8.3±0.9	>1,000	268±31
	K51005	5.8±2.1	17±0.2	>1,000
	K50031	5.4±0.1	13±0.3	>1,000
	K51057	12±1	24±0.7	>1,000
10				

Tabla 2

Actividad inhibidora de KLK5 de ratón, KLK7 de ratón o KLK14 de ratón de cada péptido inhibidor de KLK5

	ID	IC ₅₀ (nM) para mKLK5	IC ₅₀ (nM) para mKLK7	IC ₅₀ (nM) para mKLK14
15	K51028	<0.5	77	>1,000
	K50032	127	>1,000	>1,000
	K50055	<0.5	>1,000	>1,000
	K51069	<0.5	181	40
	K51072	2	512	>1,000
20	K50015	<0.5	248	108
	K50016	15	>1,000	>1,000
	K51034	54	>1,000	>1,000
	K50062	10	>1,000	>1,000
	K51090	2	658	>1,000
25				

K50098	14	>1,000	547
K51005	48	23	214
K50031	40	4	244
K51057	149	27	437

5 (3-2) Evaluación de la reactividad cruzada del péptido inhibidor de KLK5

Las especificidades para otras proteasas se evaluaron usando la degradación de un péptido sustrato como índice. Como en el método descrito en (3-1), se mezclaron 25 μL de cada una de una proteasa y una muestra diluida con un amortiguador de ensayo (hasta una concentración final de muestra de 1 μM), seguido de una reacción a 37°C durante 20 minutos. Luego, se añadieron 50 μL de un sustrato diluido con un amortiguador de ensayo y se midió la señal de fluorescencia usando Enspire (PerkinElmer). Se usó un amortiguador de ensayo (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0) para la evaluación de la actividad proteasa, y se usó una placa negra PROTEOSAVE (R) SS96F (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) para la reacción y la medición. Las combinaciones de la proteasa y el sustrato usadas para la evaluación de la especificidad fueron las siguientes.

Evaluación de la actividad inhibidora de la tripsina bovina: tripsina (Pierce; 20233) con una concentración final de 5 nM y un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC con una concentración final de 100 μM (R&D Systems, Inc., ES011) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460

nm;

Evaluación de la actividad inhibidora de la tripsina humana: tripsina con una concentración final de 1 nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, T6424) y un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-
5 AMC con una concentración final de 100 μ M (R&D Systems, Inc., ES011) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

Evaluación de la actividad inhibidora de la α -quimotripsina bovina: quimotripsina con una concentración
10 final de 10 nM (Worthington Biochemical Corporation; LS001434) y un sustrato péptido Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA con una concentración final de 100 μ M (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3120-v, Figura 86, y la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC. ID NO.: 78), y una señal de fluorescencia con excitación a 380
15 nm/emisión a 460 nm;

Evaluación de la actividad inhibidora de la quimotripsina humana: quimotripsina con una concentración final de 10 nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, C8946), un sustrato péptido Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA con una concentración final de
20 10 μ M (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3120-v, Figura 86, y la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC. ID NO.: 78), y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

Evaluación de la actividad inhibidora de la triptasa
25 humana: triptasa con una concentración final de 1 nM (Sigma-

Aldrich Co. LLC, T7063) y un sustrato péptido Boc-Phe-Ser-Arg-MCA con una concentración final de 100 μ M (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3107-v), y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

5 Evaluación de la actividad inhibidora de la quimasa humana: quimasa con una concentración final de 100 nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, C8118) y un sustrato péptido Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA con una concentración final de 100 μ M (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3120-v, Figura 86, y la secuencia de
10 aminoácidos que se muestra en SEC. ID NO.: 78), y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

 Evaluación de la actividad inhibidora de la plasmina humana: Plasmina con una concentración final de 50 nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, P1867) y un sustrato péptido Boc-Val-Leu-Lys-
15 MCA con una concentración final de 100 μ M (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3104-v), y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

 Evaluación de la actividad inhibidora de la trombina humana: trombina con una concentración final de 1 nM (Sigma-
20 Aldrich Co. LLC, T6884) y un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC con una concentración final de 100 μ M (R&D Systems, Inc., ES011) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

 Actividad inhibidora de la elastasa de neutrófilos
25 humanos: elastasa de neutrófilos con una concentración final

de 0.00001 U/ μ L (Enzo Life Sciences) y un sustrato péptido Suc (OMe)-Ala-Ala-Pro-Val-MCA con una concentración final de 100 μ M (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3153-v, Figura 87, y la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC. ID NO.: 79), y una señal de
5 fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

Evaluación de la actividad inhibidora de la matriptasa humana: matriptasa con una concentración final de 1 nM (R&D Systems, Inc., 3946-SE) y un sustrato péptido Boc-Gln-Ala-Arg-AMC con una concentración final de 100 μ M (R&D Systems,
10 Inc., ES014) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

Evaluación de la actividad inhibidora de la proteína C humana: proteína C con una concentración final de 100 nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, P2200) y un sustrato péptido Boc-Leu-
15 Ser-Thr-Arg-MCA con una concentración final de 100 μ M (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3112-v, Figura 88, y la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC. ID NO.: 80) una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

Evaluación de la actividad inhibidora de tPA humano:
20 tPA con una concentración final de 10 nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, T0831) y un sustrato péptido Pyr-Gly-Arg-MCA con una concentración final de 100 μ M (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3145-v), y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

25 Evaluación de la actividad inhibidora de uPA humana:

uPA con una concentración final de 2 nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, U0633) y un péptido sustrato Pyr-Gly-Arg-MCA con una concentración final de 100 μ M (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3145-v), y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

Evaluación de la actividad inhibidora de la calicreína plasmática humana: calicreína plasmática con una concentración final de 0.125 μ g/mL (R&D Systems, Inc., 2497-SE) y un sustrato péptido Z-Phe-Arg-MCA con una concentración final de 100 μ M (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3095-v), y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

Evaluación de la actividad inhibidora de KLK1 humana: KLK1 con una concentración final de 0.1 μ g/mL (R&D Systems, Inc., 2337-SE) y un sustrato péptido Pro-Phe-Arg-MCA con una concentración final de 100 μ M (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3096-v) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

Evaluación de la actividad inhibidora de KLK2 humana: KLK2 con una concentración final de 2 μ g/mL (R&D Systems, Inc., 4104-SE) y un sustrato péptido Pro-Phe-Arg-MCA con una concentración final de 100 μ M (PEPTIDE INSTITUTE, INC., 3096-v) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

Evaluación de la actividad inhibidora de KLK4 humana: KLK4 con una concentración final de 1 μ g/mL (R&D Systems, Inc.,

1719-SE) y un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC con una concentración final de 100 μ M (R&D Systems, Inc., ES011) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

5 Evaluación de la actividad inhibidora de KLK7 humana: KLK7 con una concentración final de 1 μ g/mL, un sustrato péptido Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys (Dnp)-NH₂ con una concentración final de 20 μ M (R&D Systems, Inc., Figura 85, y la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC. ID NO.: 77),
10 y una señal de fluorescencia con excitación a 320 nm/emisión a 405 nm;

 Evaluación de la actividad inhibidora de KLK8 humana: KLK8 con una concentración final de 5 nM (UniProt: 060259, preparada por los inventores) y un sustrato péptido Boc-Val-
15 Pro-Arg-AMC con una concentración final de 100 μ M (R&D Systems, Inc., ES011) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

 Evaluación de la actividad inhibidora de KLK12 humana: KLK12 con una concentración final de 0.1 μ g/mL (R&D
20 Systems, Inc., 3095-SE) y un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC con una concentración final de 100 μ M (R&D Systems, Inc., ES011) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

 Evaluación de la actividad inhibidora de KLK13
25 humana: KLK13 con una concentración final de 0.5 μ g/mL (R&D

Systems, Inc., 2625-SE) y un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC con una concentración final de 100 μ M (R&D Systems, Inc., ES011) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

5 Evaluación de la actividad inhibidora de KLK14 humana: hKLK14 con una concentración final de 0.2 μ g/mL, un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC con una concentración final de 100 μ M (R&D Systems, Inc.) y una señal de fluorescencia con excitación a 380 nm/emisión a 460 nm;

10 De la misma manera que en (3-1), se evaluaron las reactividades cruzadas de cada péptido inhibidor de KLK5 a proteasas distintas de KLK5 usando la degradación de un sustrato peptídico como índice. Algunos de los péptidos inhibidores exhibieron una débil reactividad cruzada con la

15 quimotripsina con una concentración final del péptido inhibidor de 1 μ M (donde el valor de IC_{50} era menor que 1 μ M), pero la mayoría de los péptidos inhibidores no exhibieron actividad inhibidora de ninguna proteasa distinta de KLKn ($n = 1, 2, 4, 5, 7, 8, 12$ o 14) (Figuras 3A-3H). Mientras tanto, algunos de

20 los péptidos inhibidores exhibieron actividad inhibidora de KLK4 o KLK12 con una concentración final del péptido inhibidor de 1 μ M (donde el valor de IC_{50} era menor de 1 μ M), pero muchos de los péptidos inhibidores no exhibieron actividad inhibidora de proteasa contra KLKn excepto KLK5, KLK7 y KLK14, y por tanto

25 se encontró que los péptidos inhibidores tenían alta

especificidad.

(3-3) Evaluación de la actividad de unión a KLK5 del péptido inhibidor de KLK5

Para medir la afinidad de unión de los péptidos
5 inhibidores de KLK5, se llevó a cabo un análisis de resonancia de plasmón de superficie usando BIAcore T 200 (GE healthcare). Se capturó una hebra complementaria de ADN de un conjugado de estreptavidina mediante hibridación en Sensor Chip CAP (GE healthcare) en donde se inmovilizó el ADN monocatenario. Luego,
10 se capturó KLK5 biotinilado usando EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (Thermo Fisher Scientific) a un caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ para inmovilizar aproximadamente 10 RU. Luego, se añadió al mismo el péptido inhibidor de KLK5, diluido en serie 2 veces con HBS-EP (0.625 a 10 nM) como analito a un caudal de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. En
15 el software de evaluación BIAcore T 200 (versión 2.0), k_{on} y k_{off} se calcularon mediante análisis usando cinética de ciclo único en un modelo de unión de Langmuir simple uno a uno. La constante de disociación K_D se calculó como una relación de $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Además, se midieron varios péptidos inhibidores de
20 KLK5 regenerando Sensor Chip CAP usando un amortiguador de regeneración unido a un kit de biotina CAPture (GE healthcare) y capturando repetidamente KLK5 biotinilada.

Los 14 tipos de péptidos inhibidores de KLK5 medidos exhibieron valores de K_D por debajo de 1 nM, mostrando que sus
25 actividades de unión eran muy fuertes (Tabla 3A).

Tabla 3A**Actividad de unión a KLK5 de cada péptido inhibidor****de KLK5**

	ID	K_{on}(1/M·s)	K_{off}(1/s)	K_D(M)
5	K51028	1.5×10 ⁶	2.0×10 ⁻⁵	1.4×10 ⁻¹¹
	K50032	2.0×10 ⁶	2.7×10 ⁻⁴	1.3×10 ⁻¹⁰
	K50055	9.8×10 ⁵	1.8×10 ⁻⁵	1.9×10 ⁻¹¹
	K51069	9.4×10 ⁵	1.0×10 ⁻⁶	1.0×10 ⁻¹²
	K51072	8.4×10 ⁵	2.2×10 ⁻⁵	2.6×10 ⁻¹¹
10	K50015	9.4×10 ⁵	1.0×10 ⁻⁶	1.1×10 ⁻¹²
	K50016	7.0×10 ⁶	2.9×10 ⁻⁴	4.2×10 ⁻¹¹
	K51034	5.2×10 ⁵	3.5×10 ⁻⁵	6.8×10 ⁻¹¹
	K50062	1.2×10 ⁶	2.9×10 ⁻⁶	2.5×10 ⁻¹²
	K51090	2.1×10 ⁶	5.7×10 ⁻⁵	2.7×10 ⁻¹¹
15	K50098	1.0×10 ⁶	1.8×10 ⁻⁵	1.8×10 ⁻¹¹
	K51005	3.5×10 ⁶	1.2×10 ⁻³	3.4×10 ⁻¹⁰
	K50031	8.2×10 ⁵	5.0×10 ⁻⁵	6.1×10 ⁻¹¹
	K51057	6.0×10 ⁶	1.5×10 ⁻³	2.6×10 ⁻¹⁰

20

(3-4) Evaluación de la actividad de unión a KLK5 de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5

Para medir la afinidad de unión de una fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 preparada en (5-2), que se describirá más adelante, se llevó a cabo un análisis

25

de resonancia de plasmón superficial usando BIAcore T 200 (GE healthcare).

La fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 se capturó a un caudal de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ mediante Sensor Chip
5 CM5 (GE healthcare) en donde se inmovilizó un anticuerpo anti-IgG humana (Fc) para inmovilizar aproximadamente de 30 a 50 RU. Luego, se añadió KLK5, diluido en serie 2 veces con HBS-EP (0.625 a 10 nM) como analito a un caudal de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. En el software de evaluación BIAcore T 200
10 (versión 2.0), k_{on} y k_{off} se calcularon mediante análisis usando cinética de ciclo único en un modelo de unión de Langmuir simple uno a uno. La constante de disociación K_D se calculó como una relación de $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Además, la actividad de unión de KLK5 a múltiples fusiones Fc del
15 péptido inhibidor de KLK5 se midió regenerando Sensor Chip CM5 en el que se inmovilizó el anticuerpo anti-IgG humana (Fc) usando un amortiguador de regeneración unido a un kit de captura de anticuerpos humanos (GE healthcare) capturando repetidamente la fusión Fc del
20 péptido inhibidor de KLK5.

Los 14 tipos de fusiones Fc del péptido inhibidor de KLK5 medidas exhibieron valores de K_D por debajo de 1 nM, lo que muestra que sus actividades de unión eran muy fuertes (Tabla 3B).

Tabla 3B

Actividad de unión a KLK5 de cada fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5

	ID	K_{on}(1/M·s)	K_{off}(1/s)	K_D(M)
5	D3-K51028-Fc	5.39×10 ⁵	1.81×10 ⁻⁶	3.35×10 ⁻¹²
	D3-K50032dN-Fc	1.08×10 ⁶	5.69×10 ⁻⁶	5.25×10 ⁻¹²
	D3-K50055-Fc	5.49×10 ⁵	2.32×10 ⁻⁶	4.22×10 ⁻¹²
	D3-K51069dN-Fc	7.14×10 ⁵	2.81×10 ⁻⁶	3.93×10 ⁻¹²
	D3-K51072-Fc	2.25×10 ⁵	1.68×10 ⁻⁶	7.48×10 ⁻¹²
10	D3-K50015-Fc	1.04×10 ⁶	3.52×10 ⁻⁶	3.38×10 ⁻¹²
	D3-K50016dN-Fc	7.18×10 ⁵	5.60×10 ⁻⁶	7.81×10 ⁻¹²
	D3-K51034-Fc	2.83×10 ⁵	2.93×10 ⁻⁶	1.03×10 ⁻¹¹
	D3-K50062-Fc	5.66×10 ⁵	6.52×10 ⁻⁶	1.15×10 ⁻¹¹
	D3-K51090-Fc	7.00×10 ⁵	7.86×10 ⁻⁶	1.12×10 ⁻¹¹
15	D3-K50098dN-Fc	9.22×10 ⁵	<1.62×10 ⁻⁶	<1.76×10 ⁻¹²
	D3-K51005-Fc	1.47×10 ⁵	1.96×10 ⁻⁵	1.33×10 ⁻¹⁰
	D3-K50031-Fc	8.81×10 ⁴	<1.00×10 ⁻⁶	<1.14×10 ⁻¹¹
	D3-K51057-Fc	8.69×10 ⁴	1.79×10 ⁻⁵	2.06×10 ⁻¹⁰

20

Ejemplo 4. Análisis del péptido inhibidor de KLK5 usando estructura cristalina de rayos X

(4-1) Preparación del complejo de péptidos inhibidores de KLK5/KLK5

25

De acuerdo con los métodos descritos en (1-2) y (2-

2), se prepararon los péptidos inhibidores de KLK5 K51034 y KLK5 que tenían las secuencias de aminoácidos mostradas por los números de SEQ ID. Después de mezclar los dos en condiciones de Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM y pH 8.0, se aisló un complejo
5 y se purificó mediante cromatografía de filtración en gel (Superdex 200 10/300 GL).

(4-2) Análisis de la estructura del cristal de rayos X

La solución compleja preparada en (4-1) se concentró
10 a 12 mg/mL, luego se mezcló con una solución de depósito (cloruro de magnesio hexahidratado 0.2 M, PEG3350 al 20%) en una proporción de 1: 1 y se cristalizó mediante un método de difusión de vapor. El monocristal cúbico obtenido se sumergió en una solución de depósito que contenía glicerol al 20% y
15 después se congeló en nitrógeno líquido. Los cristales congelados se irradiaron con rayos X en una corriente criogénica para obtener una imagen de difracción (Hypixel 6000HE/MicroMax007). Se obtuvieron datos de escala con una resolución máxima de 1.7 Å mediante análisis usando
20 CrysAlisPro. La fase se determinó mediante el método de sustitución molecular usando KLK5 solo (PDB ID: 2PSX) y SPINK2 solo (PDB ID: 2JXD) como plantillas. Después del refinamiento estructural, se determinaron cristales complejos de KLK5/péptido K51034 a una resolución de 1.8 Å. Una molécula de
25 cada uno de KLK5 y SPINK2 estaba contenida en una celda

unitaria. Para la molécula SPINK2, se construyó un modelo molecular parcial que contiene un sitio de interacción con KLK5 con base en la información de secuencia y la densidad de electrones observada. Se confirmó que el péptido inhibidor de
 5 KLK5 K51034 estaba unido a una región que contenía el sitio activo de la enzima KLK5 (Figura 4).

Ejemplo 5. Preparación de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5

(5-1) Construcción del vector de expresión de fusión
 10 Fc del péptido inhibidor de KLK5

Usando la secuencia de nucleótidos de cada péptido inhibidor (SEC. ID NO.: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 o 31) como plantilla, se amplificó por PCR ((a 94°C durante 15 segundos, a 60°C durante 30 segundos y a 68°C
 15 durante 20 segundos) × 30 ciclos) usando los siguientes cebadores y KOD-plus-(TOYOBO).

Cebador 16: 5'-
 AGATGGGTGTTGTCTGATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC-3' (SEC. ID NO.:
 81, Figura 89)

20 Cebador 17: 5'-GCAGGGGCCATTCCGGAT-3' (SEC. ID NO.:
 82, Figura 90)

El fragmento B se amplificó mediante PCR ((a 94°C durante 15 segundos, a 60°C durante 30 segundos y a 68°C durante
 10 segundos) × 30 ciclos) usando los siguientes cebadores y
 25 KOD-plus-(TOYOBO).

Cebador 18: 5' -
 AAAATCTAGAGCCGCCACCATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCT-3' (SEC. ID
 NO.: 83, Figura 91)

Cebador 19: 5' -
 5 AGACAACACCCATCTAGGAGCGGCCACCAGCAGCAGAAAGAACC-3' (SEC. ID NO.:
 84, Figura 92)

Usando una región Fc de IgG1 humana (SEC. ID NO.:
 87) como plantilla, el fragmento C que contiene una región Fc
 de IgG1 humana se amplificó mediante PCR ((a 94°C durante 15
 10 segundos, a 60°C durante 30 segundos, a 68°C durante 30
 segundos) × 30 ciclos) usando los siguientes cebadores y KOD-
 plus-(TOYOBO).

Cebador 20: 5'-ATCCGGAATGGCCCCTGCGAACCCAAGAGCTGCGAC-
 3' (SEC. ID NO.: 85, Figura 93)

15 Cebador 21: 5'-AAAAGTTTAAACTCATTTGCCGGGGCTCAG-3'
 (SEC. ID NO.: 86, Figura 94)

Los fragmentos de ADN deseados se amplificaron
 mediante PCR superpuesta usando los fragmentos de péptidos
 inhibidores amplificados anteriormente, fragmento B, fragmento
 20 C, cebador 18, cebador 21 y KOD-plus-(TOYOBO).

Además, se construyó un vector de expresión de
 células de mamífero, fusión Fc del péptido inhibidor de
 pCMA_KLK5, mediante clonación usando las enzimas de restricción
 XbaI (NEB) y PmeI (NEB). La operación se llevó a cabo de acuerdo
 25 con el método descrito en (1-1).

(5-2) Preparación de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5

El vector de expresión construido en (5-1) se transfectó en células Expi293F (Thermo Fisher Scientific) usando PEI MAX 40000 (Polysciences), y el sobrenadante del cultivo se recolectó después de 6 días de cultivo de las células. La fusión de Fc deseada se recolectó del sobrenadante del cultivo usando MabSelect SuRe (GE healthcare), y el amortiguador se reemplazó con PBS usando Amicon Ultra NMWL 10.000 (Merck KGaA Millipore), para preparar una fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5. De cada clon que tenía una secuencia de glicosilación en el péptido inhibidor de KLK5, se eliminó la secuencia de glicosilación mediante la sustitución de un residuo, y se le añadió "dN" como un ID que muestra una forma desglicosilada. La modificación de la secuencia de glicosilación no afecta en absoluto la actividad tal como la actividad inhibidora de KLK5 o la reactividad cruzada.

(5-3) Construcción del vector de expresión D1-K50055-Fc de fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5

Usando la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5 K50055 (SEC. ID NO.: 7) como plantilla, los fragmentos de péptido inhibidor se amplificaron mediante PCR ((a 94°C durante 15 segundos, a 60°C durante 30 segundos y a 68°C) C durante 20 segundos) × 30 ciclos) usando los siguientes cebadores y KOD-plus-(TOYOBO).

Cebador 22: 5'-
AGATGGGTGTTGTCTGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC-3' (SEC. ID NO.: 94,
Figura 104)

5 Cebador 17: 5'-GCAGGGGCCATTCCGGAT-3' (SEC. ID NO.:
82, Figura 90)

Los fragmentos de ADN deseados se amplificaron mediante PCR superpuesta usando los fragmentos de péptidos inhibidores amplificados anteriormente y el fragmento B, el fragmento C, el cebador 18 y el cebador 21, que se amplificaron
10 en (5-1) y KOD-plus-(TOYOBO).

Además, se construyó un vector de expresión de células de mamífero, fusión Fc del péptido inhibidor de pCMA_KLK5, mediante clonación usando las enzimas de restricción XbaI (NEB) y PmeI (NEB). La operación se llevó a cabo de acuerdo
15 con el método descrito en (1-1).

(5-4) Preparación de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D1-K50055-Fc

El vector de expresión construido en (5-3) se transfectó en células Expi293F (Thermo Fisher Scientific) usando PEI MAX 40000 (Polysciences), y el sobrenadante del cultivo se recolectó después de 6 días de cultivo de las células. La fusión de Fc deseada se recolectó del sobrenadante del cultivo usando MabSelect SuRe (GE healthcare), y el amortiguador se reemplazó con PBS usando Amicon Ultra NMWL
20 10.000 (Merck KGaA Millipore), para preparar la fusión Fc del
25

péptido inhibidor de KLK5 D1-K50055-Fc.

Ejemplo 6. Evaluación de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5

(6-1) Evaluación de las actividades inhibidoras de
5 KLK5 humana/de ratón, KLK7 humana/de ratón y KLK14 humana/de
ratón de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5

De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3-1,
se evaluaron las actividades inhibidoras de cada fusión Fc del
péptido inhibidor de KLK5 contra KLK5 humana/de ratón, KLK7
10 humana/de ratón y KLK14 humana/de ratón. Como resultado de
calcular la tasa de degradación de un péptido sustrato por cada
fusión de péptido inhibidor Fc en cada concentración y calcular
la concentración inhibitoria del 50% (IC_{50}) usando GraphPad
Prism (versión 5.0; GraphPad Software Inc.) con la tasa de
15 degradación del inhibidor fusión de péptido Fc a una
concentración de 0 nM tomada como 100%, se mostró que todas
las fusiones de péptido inhibidor Fc inhibían la actividad
enzimática de KLK5 humana a bajas concentraciones (Tabla 4,
Figuras 5 y 107A-107C). Algunas de las fusiones de péptido
20 inhibidor Fc inhibieron la actividad enzimática de KLK7 humana
o KLK14 humana a bajas concentraciones, y algunas de las
fusiones de péptido inhibidor Fc exhibieron actividades
inhibidoras débiles contra estas proteasas. Las fusiones de
péptido inhibidor Fc también exhibieron una actividad similar
25 contra KLK5, KLK7 o KLK14 de ratón (Tabla 5). Se usó el valor

medio de tres experimentos independientes para calcular el valor de IC_{50} .

Tabla 4

Actividad inhibitoria de KLK5 humana, KLK7 humana o

5 KLK14 humana de cada fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5

	ID	IC_{50} (nM) para	IC_{50} (nM) para	IC_{50} (nM) para
		hKLK5	hKLK7	hKLK14
10	D3-K51028-Fc	4.5±0.1	220±10	>1,000
	D3-K50032dN-Fc	3.9±0.3	>1,000	>1,000
	D3-K50055-Fc	3.7±0.1	>1,000	340±120
	D3-K51069dN-Fc	4.5±0.4	>1,000	42±11
	D3-K51072-Fc	4.5±0.3	>1,000	260±60
15	D3-K50015-Fc	3.1±0.2	>1,000	4.5±1.3
	D3-K50016dN-Fc	4.3±0.7	>1,000	>1,000
	D3-K51034-Fc	5.7±0.8	>1,000	960±320
	D3-K50062-Fc	4.3±0.1	>1,000	190±50
	D3-K51090-Fc	4.6±0.5	>1,000	350±30
20	D3-K50098dN-Fc	4.3±0.3	>1,000	210±60
	D3-K51005-Fc	8.6±1.4	28±3	>1,000
	D3-K50031-Fc	9.5±0.4	9.3±1.3	>1,000
	D3-K51057-Fc	12±1	18±1	>1,000
	D1-K50055-Fc	5.8±0.6	>1,000	>1,000

Tabla 5

Actividad inhibidora de KLK5 de ratón, KLK7 de ratón o KLK14 de ratón de cada fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5

5	ID	IC ₅₀ (nM) para mKLK5	IC ₅₀ (nM) para mKLK7	IC ₅₀ (nM) para mKLK14
	D3-K51028-Fc	16	110	>1,000
	D3-K50032dN-Fc	26	>1,000	>1,000
	D3-K50055-Fc	6.8	>1,000	>1,000
10	D3-K51069dN-Fc	6.8	410	24
	D3-K51072-Fc	50	>1,000	>1,000
	D3-K50015-Fc	4.4	340	48
	D3-K50016dN-Fc	35	>1,000	>1,000
	D3-K51034-Fc	39	>1,000	>1,000
15	D3-K50062-Fc	5.4	>1,000	>1,000
	D3-K51090-Fc	5.1	730	510
	D3-K50098dN-Fc	6.8	>1,000	350
	D3-K51005-Fc	330	37	240
	D3-K50031-Fc	270	6.3	300
20	D3-K51057-Fc	600	24	380
	D1-K50055-Fc	6.3	>1,000	>1,000

(6-2) Evaluación de la reactividad cruzada de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5

Al igual que los resultados en (3-2), algunas de las fusiones del péptido inhibidor Fc mostraron una débil

reactividad cruzada con la tripsina, quimotripsina y plasmina bovina con una concentración final del péptido inhibidor de 1 μM (en donde el valor de IC_{50} fue menor que 1 μM), pero la mayoría de los péptidos inhibidores no mostraron actividad inhibidora de ninguna proteasa distinta de las KLK (Figuras 6A-6H). Algunas de las fusiones de péptido inhibidor Fc exhibieron actividad inhibidora de KLK4 o KLK12 con una concentración final de 1 μM (donde el valor de IC_{50} era menor de 1 μM), pero muchas de las fusiones de péptido inhibidor Fc no exhibieron actividad inhibidora de proteasa contra KLKs excepto KLK7 o KLK14. En consecuencia, se encontró que las fusiones de péptidos inhibidores Fc tenían una alta especificidad como los péptidos inhibidores.

(6-3) Evaluación de la actividad inhibidora de KLK5 de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 usando sustrato peptídico (cálculo de la constante de inhibición K_i)

Se evaluó la actividad inhibidora de las fusiones Fc del péptido inhibidor de KLK5 contra KLK5 humana y se calculó la constante de inhibición K_i . Se disolvió un sustrato péptido Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) en DMSO a 10 mM y se diluyó con un amortiguador de ensayo (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0) para su uso a una concentración final de 25 a 200 μM . Se mezclaron 25 μL de cada uno de KLK5 humana y la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 diluido con el amortiguador de ensayo, seguido de una reacción a 37°C durante

20 minutos. Luego, se le añadieron 50 μ L de un sustrato diluido con el amortiguador de ensayo y se midió la señal de fluorescencia (excitación a 380 nm/emisión a 460 nm) usando Enspire. La KLK5 humana tenía una concentración final de 10 nM, la fusión del péptido inhibidor de KLK5 Fc tenía una concentración final de 0.5 a 25 nM, y se usó una placa negra PROTEOSAVE (R) SS96F (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) para la reacción y la medición.

Se calculó la tasa de degradación del péptido sustrato por cada fusión de péptido inhibidor Fc a cada concentración, y se evaluó la actividad inhibidora de KLK5 humana de cada fusión de péptido inhibidor Fc, con la tasa de degradación de la fusión de péptido inhibidor Fc a una concentración de 0 nM tomado como 100% (Figura 102). Usando GraphPad Prism (versión 5.0; GraphPad Software Inc.), la velocidad de reacción máxima $V_{\max}$ y la constante de Michaelis K_m se calcularon de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten a una concentración de enzima de 10 nM. Además, como resultado del cálculo de la constante de inhibición K_i a una concentración de sustrato de 100 μ M usando GraphPad Prism de acuerdo con la ecuación de Morrison, se mostró que todas las fusiones Fc del péptido inhibidor de KLK5 inhibían la actividad enzimática de KLK5 humana a concentraciones bajas (Tabla 6). Se usó el valor medio de tres experimentos independientes para calcular el valor de K_i .

Tabla 6

Constante de inhibición K_i de KLK5 humana de cada fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5

5	ID	K_i (pM)
	D3-K50032dN-Fc	440±10
	D3-K50055-Fc	190±60
	D3-K51072-Fc	360±70
	D3-K50016dN-Fc	360±40

10 (6-4) Evaluación de la actividad inhibidora de KLK5 de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 usando sustrato proteico

Usando Desmogleína1 humana y Desmocolina1 humana como sustratos proteicos, se evaluó la actividad inhibidora de KLK5 de cada fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5. Se mezclaron KLK5 humana y cada fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 (D3-K50032dN-Fc, D3-K50055-Fc, D3-K51072-Fc o D3-K50016dN-Fc) diluidos con un amortiguador de ensayo, seguido de una reacción a 37°C durante 1 hora. Luego, se añadió al mismo cada sustrato proteico diluido con un amortiguador de ensayo, seguido de una reacción a 37°C durante 4 horas. Luego, se le añadió un amortiguador de muestra de SDS que contenía un reductor y la reacción enzimática se detuvo mediante tratamiento a 99°C durante 5 minutos. Posteriormente, se evaluó la degradación del sustrato proteico usando SDS-PAGE (condiciones de

reducción) y análisis de Western blot. Las combinaciones del sustrato y la enzima, la fusión del péptido inhibidor Fc y el anticuerpo para el análisis de Western blot fueron las siguientes.

5 Evaluación usando Desmogleína1 humana: hKLK5 con una concentración final de 1 μ M, una fusión de péptido inhibidor Fc con una concentración final de 0.001 a 10 μ M, proteína quimera Fc de desmogleína-1 humana recombinante con una concentración final de 1 μ M (R&D Systems, Inc.), Anticuerpo
10 Desmogleína 1 (aa471-499) (LSBio) e IgG anti-conejo, Fragmento de burro F(ab')₂ ligado a HRP (GE Healthcare)

 Evaluación usando Desmocolina1 humana: hKLK5 con una concentración final de 0.2 μ M, una fusión de péptido inhibidor Fc con una concentración final de 0.0002 a 2 μ M, proteína
15 Desmocolina-1 humana recombinante con una etiqueta His C-terminal con una concentración final de 2 μ M (R&D Systems, Inc.) y Conjugado Penta His HRP (QIAGEN)

 Desmogleína1 humana y Desmocolina1 humana no se degradaron en ausencia de KLK5 humana, pero se degradaron
20 completamente en presencia de KLK5 humana. Como resultado de la evaluación de KLK5 humana preincubado con cada fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5, se mostró que cada una de las fusiones Fc del péptido inhibidor inhibía las actividades de degradación Desmogleína1 humana y Desmocolina1 humana de la
25 enzima KLK5 humana. En condiciones en las que la concentración

de KLK5 humana y la concentración de fusión del péptido inhibidor Fc eran iguales, la degradación de la Desmogleína1 humana y la Desmocolina1 humana se inhibió completamente (Figuras 103-103B).

5 Ejemplo 7. Efecto de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 sobre la supresión del aumento de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL, por sus siglas en inglés) en ratones modelo con síndrome de Netherton

(7-1) Modelo de ratones con síndrome de Netherton

10 Los ratones Crusty2 que tienen una mutación en SPINK5 que es el gen causante del síndrome de Netherton se conocen como ratones modelo del síndrome de Netherton, y Crusty2 homomice (+/+) exhibe síntomas cutáneos (base de datos Mutagenetix).

15 (7-2) Efecto de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 sobre la supresión del aumento de TEWL en ratones modelo con síndrome de Netherton

Se cruzaron ratones Crusty2 (+/-) y ratones Crusty2 (+/+) mediante inseminación artificial, y se evaluó el péptido
 20 inhibidor de KLK5 Fc fusión D1-K50055-Fc producido en (5-4) usando la descendencia resultante (ratones Crusty2 (+/-) o ratones Crusty2 (+/+)). Desde 0 o 1 día después del nacimiento, se administró PBS o 100 mg/kg de D1-K50055-Fc por vía subcutánea en días alternos durante 4 semanas. Solo en la
 25 primera administración, se administró una cantidad triple de

D1-K50055-Fc como dosis de carga. Usando VAPO SCAN (AS-VT100RS, Asahi Techno Lab. Ltd.), se midió el TEWL en la piel del lomo o la cadera de los ratones a las 2 y 4 semanas después de la administración (Figura 7). El número de ratones Crusty2 (+/-) fue de 9, y el número de ratones Crusty2 (+/+) fue de 12, en cada uno del grupo al que se administró PBS y al grupo al que se administró D1-K50055-Fc.

Se observó un aumento estadísticamente significativo en TEWL en ratones Crusty2 (+/+) en comparación con ratones Crusty2 (+/-) y fue más notable en ratones de 4 semanas en comparación con ratones de 2 semanas. Después de 4 semanas desde la administración, se observó una disminución estadísticamente significativa en TEWL tanto en el lomo como en las caderas más gravemente afectadas en el grupo al que se administró D1-K50055-Fc en comparación con el grupo al que se administró PBS. De lo anterior, se mostró que se observó un aumento en TEWL causado por la mutación en SPINK5 en los ratones, y D1-K50055-Fc exhibió una acción inhibidora. Además, se demostró que los péptidos de la presente invención y sus conjugados, incluido D1-K50055-Fc, son útiles para reducir los síntomas cutáneos del síndrome de Netherton.

Aplicabilidad Industrial

El péptido y el conjugado proporcionados por la presente invención y una composición farmacéutica que los contiene son útiles para tratar diversas enfermedades.

Texto libre del listado de secuencias

SEC. ID NO.: 1: Secuencia de aminoácidos de SPINK2 humana (Figura 9)

SEC. ID NO.: 2: Secuencia de aminoácidos de KLK5 humana (Figura 10)

SEC. ID NO.: 3: Secuencia de aminoácidos de KLK7 humana (Figura 11)

SEC. ID NO.: 4: Secuencia de aminoácidos de KLK14 humana (Figura 12)

SEC. ID NO.: 5: Secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5 K50032 (Figura 13)

SEC. ID NO.: 6: Secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5 K50032 (Figura 14)

SEC. ID NO.: 7: Secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5 K50055 (Figura 15)

SEC. ID NO.: 8: Secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5 K50055 (Figura 16)

SEC. ID NO.: 9: Secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5 K51072 (Figura 17)

SEC. ID NO.: 10: Secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5 K51072 (Figura 18)

SEC. ID NO.: 11: Secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de KLK5 K50016 (Figura 19)

SEC. ID NO.: 12: Secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de KLK5 K50016 (Figura 20)

- SEC. ID NO.: 13: Secuencia de nucleótidos del péptido
inhibidor de KLK5 K51034 (Figura 21)
- SEC. ID NO.: 14: Secuencia de aminoácidos del péptido
inhibidor de KLK5 K51034 (Figura 22)
- 5 SEC. ID NO.: 15: Secuencia de nucleótidos del péptido
inhibidor de KLK5 K50062 (Figura 23)
- SEC. ID NO.: 16: Secuencia de aminoácidos del péptido
inhibidor de KLK5 K50062 (Figura 24)
- SEC. ID NO.: 17: Secuencia de nucleótidos del péptido
10 inhibidor de KLK5 K51090 (Figura 25)
- SEC. ID NO.: 18: Secuencia de aminoácidos del péptido
inhibidor de KLK5 K51090 (Figura 26)
- SEC. ID NO.: 19: Secuencia de nucleótidos del péptido
inhibidor de KLK5 K50098 (Figura 27)
- 15 SEC. ID NO.: 20: Secuencia de aminoácidos del péptido
inhibidor de KLK5 K50098 (Figura 28)
- SEC. ID NO.: 21: Secuencia de nucleótidos del péptido
inhibidor de KLK5/KLK7 K51028 (Figura 29)
- SEC. ID NO.: 22: Secuencia de aminoácidos del péptido
20 inhibidor de KLK5/KLK7 K51028 (Figura 30)
- SEC. ID NO.: 23: Secuencia de nucleótidos del péptido
inhibidor de KLK5/KLK7 K51005 (Figura 31)
- SEC. ID NO.: 24: Secuencia de aminoácidos del péptido
inhibidor de KLK5/KLK7 K51005 (Figura 32)
- 25 SEC. ID NO.: 25: Secuencia de nucleótidos del péptido

inhibidor de KLK5/KLK7 K50031 (Figura 33)

SEC. ID NO.: 26: Secuencia de aminoácidos del péptido

inhibidor de KLK5/KLK7 K50031 (Figura 34)

SEC. ID NO.: 27: Secuencia de nucleótidos del péptido

5 inhibidor de KLK5/KLK7 K51057 (Figura 35)

SEC. ID NO.: 28: Secuencia de aminoácidos del péptido

inhibidor de KLK5/KLK7 K51057 (Figura 36)

SEC. ID NO.: 29: Secuencia de nucleótidos del péptido

inhibidor de KLK5/KLK14 K51069 (Figura 37)

10 SEC. ID NO.: 30: Secuencia de aminoácidos del péptido

inhibidor de KLK5/KLK14 K51069 (Figura 38)

SEC. ID NO.: 31: Secuencia de nucleótidos del péptido

inhibidor de KLK5/KLK14 K50015 (Figura 39)

SEC. ID NO.: 32: Secuencia de aminoácidos del péptido

15 inhibidor de KLK5/KLK14 K50015 (Figura 40)

SEC. ID NO.: 33: Secuencia de nucleótidos de la
fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50032dN-Fc (Figura
41)

20 SEC. ID NO.: 34: Secuencia de aminoácidos de la
fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50032dN-Fc (Figura
42)

SEC. ID NO.: 35: Secuencia de nucleótidos de la
fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50055-Fc (Figura
43)

25 SEC. ID NO.: 36: Secuencia de aminoácidos de la

fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50055-Fc (Figura 44)

SEC. ID NO.: 37: Secuencia de nucleótidos de la
fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K51072-Fc (Figura
5 45)

SEC. ID NO.: 38: Secuencia de aminoácidos de la
fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K51072-Fc (Figura
46)

SEC. ID NO.: 39: Secuencia de nucleótidos de la
10 fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50016dN-Fc (Figura
47)

SEC. ID NO.: 40: Secuencia de aminoácidos de la
fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50016dN-Fc (Figura
48)

SEC. ID NO.: 41: Secuencia de nucleótidos de la
15 fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K51034-Fc (Figura
49)

SEC. ID NO.: 42: Secuencia de aminoácidos de la
fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K51034-Fc (Figura
20 50)

SEC. ID NO.: 43: Secuencia de nucleótidos de la
fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50062-Fc (Figura
51)

SEC. ID NO.: 44: Secuencia de aminoácidos de la
25 fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50062-Fc (Figura

52)

SEC. ID NO.: 45: Secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K51090-Fc (Figura 53)

5 SEC. ID NO.: 46: Secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K51090-Fc (Figura 54)

SEC. ID NO.: 47: Secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50098dN-Fc (Figura 10 55)

SEC. ID NO.: 48: Secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D3-K50098dN-Fc (Figura 56)

SEC. ID NO.: 49: Secuencia de nucleótidos de la 15 fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K51028-Fc (Figura 57)

SEC. ID NO.: 50: Secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K51028-Fc (Figura 58)

20 SEC. ID NO.: 51: Secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K51005-Fc (Figura 59)

SEC. ID NO.: 52: Secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K51005-Fc 25 (Figura 60)

SEC. ID NO.: 53: Secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K50031-Fc (Figura 61)

SEC. ID NO.: 54: Secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K50031-Fc (Figura 62)

SEC. ID NO.: 55: Secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K51057-Fc (Figura 63)

SEC. ID NO.: 56: Secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK7 D3-K51057-Fc (Figura 64)

SEC. ID NO.: 57: Secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 D3-K51069dN-Fc (Figura 65)

SEC. ID NO.: 58: Secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 D3-K51069dN-Fc (Figura 66)

SEC. ID NO.: 59: Secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 D3-K50015-Fc (Figura 67)

SEC. ID NO.: 60: Secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5/KLK14 D3-K50015-Fc (Figura 68)

SEC. ID NO.: 61: Fórmula del péptido mutante de

SPINK2 (Figura 69)

SEC. ID NO.: 62: Secuencia de nucleótidos del cebador
1 (Figura 70)

SEC. ID NO.: 63: Secuencia de nucleótidos del cebador
5 2 (Figura 71)

SEC. ID NO.: 64: Secuencia de nucleótidos del cebador
3 (Figura 72)

SEC. ID NO.: 65: Secuencia de nucleótidos del cebador
4 (Figura 73)

10 SEC. ID NO.: 66: Secuencia de nucleótidos del cebador
5 (Figura 74)

SEC. ID NO.: 67: Secuencia de nucleótidos del cebador
6 (Figura 75)

SEC. ID NO.: 68: Secuencia de nucleótidos del cebador
15 7 (Figura 76)

SEC. ID NO.: 69: Secuencia de nucleótidos del cebador
8 (Figura 77)

SEC. ID NO.: 70: Secuencia de nucleótidos del cebador
9 (Figura 78)

20 SEC. ID NO.: 71: Secuencia de nucleótidos del cebador
10 (Figura 79)

SEC. ID NO.: 72: Secuencia de nucleótidos del cebador
11 (Figura 80)

SEC. ID NO.: 73: Secuencia de nucleótidos del cebador
25 12 (Figura 81)

SEC. ID NO.: 74: Secuencia de nucleótidos del cebador
13 (Figura 82)

SEC. ID NO.: 75: Secuencia de nucleótidos del cebador
14 (Figura 83)

5 SEC. ID NO.: 76: Secuencia de nucleótidos del cebador
15 (Figura 84)

SEC. ID NO.: 77: Secuencia de aminoácidos en el
péptido sustrato de KLK7 (Figura 85)

SEC. ID NO.: 78: Secuencia de aminoácidos en el
10 péptido sustrato de α -quimotripsina bovina (Figura 86)

SEC. ID NO.: 79: Secuencia de aminoácidos en el
péptido sustrato de elastasa de neutrófilos (Figura 87)

SEC. ID NO.: 80: Secuencia de aminoácidos en el
péptido sustrato de la proteína C humana (Figura 88)

15 SEC. ID NO.: 81: Secuencia de nucleótidos del cebador
16 (Figura 89)

SEC. ID NO.: 82: Secuencia de nucleótidos del cebador
17 (Figura 90)

SEC. ID NO.: 83: Secuencia de nucleótidos del cebador
20 18 (Figura 91)

SEC. ID NO.: 84: Secuencia de nucleótidos del cebador
19 (Figura 92)

SEC. ID NO.: 85: Secuencia de nucleótidos del cebador
20 (Figura 93)

25 SEC. ID NO.: 86: Secuencia de nucleótidos del cebador

21 (Figura 94)

SEC. ID NO.: 87: Secuencia de aminoácidos de Fc de IgG1 humana (Figura 95)

5 SEC. ID NO.: 88: Secuencia de aminoácidos de D8 de SPINK5 humana (Figura 96)

SEC. ID NO.: 89: Secuencia de aminoácidos de D9 de SPINK5 humana (Figura 97)

SEC. ID NO.: 90: Secuencia de aminoácidos de SPINK9 humana (Figura 98)

10 SEC. ID NO.: 91: Secuencia de aminoácidos de KLK5 de ratón (Figura 99)

SEC. ID NO.: 92: Secuencia de aminoácidos de KLK7 de ratón (Figura 100)

15 SEC. ID NO.: 93: Secuencia de aminoácidos de KLK14 de ratón (Figura 101)

SEC. ID NO.: 94: Secuencia de nucleótidos del cebador 22 (Figura 104)

SEC. ID NO.: 95: Secuencia de nucleótidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D1-K50055-Fc (Figura 105)

20 SEC. ID NO.: 96: Secuencia de aminoácidos de la fusión Fc del péptido inhibidor de KLK5 D1-K50055-Fc (Figura 106)