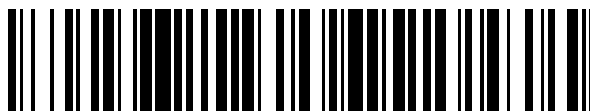


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 560**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/64**

(2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05778153 .6**

96 Fecha de presentación: **12.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1735439**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.12.2006**

54 Título: **ESCISIÓN DE VEGF Y RECEPTOR DE VEGF MEDIANTE MT-SP1 DE TIPO SILVESTRE Y MUTANTE.**

30 Prioridad:  
**12.04.2004 US 561720 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.02.2012**

73 Titular/es:  
**CATALYST BIOSCIENCES, INC.  
260 LITTLEFIELD AVENUE  
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:  
**RUGGLES, Sandra, Waugh y  
NGUYEN, Jack**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

**ES 2 374 560 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Escisión de VEGF y receptor de VEGF mediante MT-SP1 de tipo silvestre y mutante

5 **Antecedentes de la invención**

10 El proceso de angiogénesis es central a la patología de afecciones que incluyen malignidad, retinopatía diabética y degeneración macular. El hecho de que el cáncer es dependiente de angiogénesis se ha apoyado recientemente por experimentación en la que la inhibición sorprendente de crecimiento de tumor se puede conseguir no mediante  
15 tratamiento directo del tumor, sino en lugar de ello mediante inhibición selectiva del Factor de Crecimiento Endotelial Vascolar (VEGF). VEGF es un mitógeno específico de células endoteliales producidas normalmente durante la embriogénesis y la vida adulta. VEGF funciona como un mediador significativo de la angiogénesis en una diversidad de procesos normales y patológicos, incluyendo desarrollo tumoral. La vascularización tumoral es un proceso vital para la progresión de un tumor hasta una fase a partir de la cual el mismo puede metastatizar. Se han identificado tres receptores de VEGF afines de afinidad elevada (VEGFR): VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR y VEGFR-3/Flt-4.

20 Los VEGFR son tirosina quinasas receptoras de superficie celular que funcionan como moléculas de señalización durante el desarrollo vascular. Una observación común en estudios preclínicos de agentes anti-angiogénicos que se dirigen a VEGF ha sido la inhibición potente y de amplio espectro de muy diversos tipos tumorales (tejido sólido y hematológico), que es consistente con la dependencia generalizada del cáncer de la angiogénesis independientemente del tejido de origen. Inyecciones i.v. únicas de adenovirus que expresan Flk1 y Flt1 soluble transducen el hígado, expresan niveles elevados en plasma y secuestran VEGF de sus receptores nativos en las células endoteliales. Estos receptores de VEGF circulantes producen inhibición sistémica de la angiogénesis en ensayos de microbolsa corneal y más importante producen inhibición marcada y de amplio espectro de angiogénesis  
25 tumoral y crecimiento tumoral en tumores de pulmón, próstata, colon, cerebro y páncreas establecidos en modelos subcutáneo, ortotópico y transgénico. Véase, por ejemplo, Kuo *et al.* 2001 PNAS 98: 4605-10. Recientemente, la eficacia de terapia antiangiogénica se ha demostrado en un ensayo de fase III aleatorizado usando el anti-VEGF monoclonal AVASTIN™ (Genentech) para tratar pacientes con cáncer de colon metastásico, proporcionando de ese modo prueba del principio de esta estrategia de tratamiento en neoplasia humana.

30 **Sumario de la invención**

35 La naturaleza ha diseñado los cientos de proteasas en el genoma humano para definición exquisita de forma que la especificidad, inhibición e hidrólisis se adaptan perfectamente al nicho fisiológico. Aunque se ha demostrado que algunas proteasas están reguladas negativamente en el cáncer, hasta la fecha no se conocen proteasas naturales que funcionen para defender al organismo de tumorogénesis. Sin embargo, existen aplicaciones claras de proteasas programadas para hidrolizar proteínas necesarias para el crecimiento del cáncer. Esta invención combina técnicas de ingeniería de proteínas basada en estructura con ensayos de biblioteca combinatoria sintética de exploración posicional (PSSCL) para proporcionar serina proteasas novedosas con especificidad que, colectivamente, coinciden  
40 con el tronco de VEGF-R2 sobre una región extendida. La creación de perfiles mediante PSSCL es una tecnología patentada que genera un perfil de especificidad de sustrato completo o "identificación genética" de cada proteasa sometida a ingeniería genética en un ensayo único. Con esta tecnología, ahora es posible identificar proteasas terapéuticamente pertinentes que tienen especificidad potenciada hacia sustratos diana y poca o ninguna actividad hacia sustratos de tipo silvestre. En el proceso de diseño, se producen cientos de proteasas con perfiles de especificidad alterados. La tecnología ofrece una oportunidad sin precedentes de estudiar las características estructurales de especificidad. Con una exploración de proteasas con PSSCL, se pueden identificar los determinantes de selectividad y eficacia catalítica de serina proteasa. Los mismos ofrecen no sólo una oportunidad de descubrir reglas fundamentales con respecto a la función de las serina proteasas, sino también información  
45 adicional para el diseño de moléculas terapéuticamente pertinentes.

50 La presente invención proporciona composiciones y métodos para el uso de proteasas que escinden proteínas que se conoce que están implicadas en enfermedad. En particular, se proporcionan polipéptidos de serina proteasa-1 (MT-SP1) de tipo silvestre y de tipo membrana de muteína que escinden VEGF o receptor de VEGF, que se conoce que está implicado en la angiogénesis. Las proteínas modificadas resultantes se proporcionan para uso como agentes para terapia *in vivo* de cánceres y otras patologías relacionadas con angiogénesis, incluyendo pero sin limitación, degeneración macular, inflamación y diabetes.

55 La invención también proporciona métodos para la modificación de proteasas para alterar su especificidad de secuencia sustrato, de forma que la proteasa modificada escinde específicamente una proteína de VEGF o receptor de VEGF. La escisión de VEGF o VEGFR se proporciona para el tratamiento de una amplia diversidad de cánceres en los que el tratamiento da como resultado la reducción o inhibición de vascularización necesaria para el crecimiento tumoral continuado. En una realización de la invención, esta proteasa modificada es una serina proteasa. En otra realización de la invención, esta proteasa modificada es una muteína de MT-SP1.

65 Una realización de la invención implica generar una biblioteca de secuencias de proteasa para usarse para seleccionar proteasas modificadas que escinden VEGF o un VEGFR en una secuencia sustrato deseada. En un

aspecto de esta realización, cada miembro de la biblioteca es un armazón de proteasa con al menos una mutación realizada a cada miembro diferente de la biblioteca de proteasa. El resto del armazón de proteasa tiene la misma secuencia o una secuencia similar a la proteasa MT-SP1 de tipo silvestre. La actividad de escisión de cada miembro de la biblioteca de proteasa se mide usando la secuencia sustrato deseada a partir de la proteína diana de VEGF o VEGFR. Como resultado, se detectan proteasas con la actividad de escisión más elevada con respecto a la secuencia sustrato deseada.

En otro aspecto de esta realización, el número de mutaciones realizadas en el armazón de proteasa es 1, 2-5 (por ejemplo, 2, 3, 4 ó 5), 5-10 (por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9 ó 10) o 10-20 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20). En una realización preferida, la mutación o mutaciones confieren especificidad de sustrato aumentada. En una realización específica, la mutación o mutaciones se posicionan en el armazón en al menos uno de los sitios S1, S2, S3 y S4. En determinados aspectos de esta realización, la actividad de la proteasa de muteína está aumentada en al menos 10 veces, 100 veces o 1000 veces con respecto a la actividad de la proteasa de tipo silvestre. En aspectos relacionados, el aumento es en especificidad de sustrato.

En otra realización de la invención, los miembros de una biblioteca están formados de secuencias de aminoácido aleatorizadas y se mide la selectividad de escisión de cada miembro de la biblioteca por la proteasa. Este tipo de biblioteca se denomina en el presente documento una biblioteca de sustrato. Se detectan las secuencias sustrato que se escinden de forma más eficaz por la proteasa. En aspectos específicos de esta realización, la secuencia sustrato en una biblioteca de sustrato tiene 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 aminoácidos de largo.

En otra realización de la invención, los miembros de la biblioteca de sustrato están formados por secuencias de aminoácido aleatorizadas y se mide la selectividad de escisión de cada miembro de la biblioteca mediante la proteasa. Se detectan las secuencias sustrato que se escinden más selectivamente por la proteasa. En aspectos específicos de esta realización, la secuencia sustrato en la biblioteca de sustrato tiene 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 aminoácidos de largo.

En una realización de este ejemplo, la especificidad se mide observando cuántas secuencias sustrato diferentes escinde la proteasa a una actividad determinada. Las proteasas que escinden menos secuencias sustrato a una actividad determinada tienen mayor especificidad que aquellas que escinden más secuencias sustrato.

En un aspecto de esta realización, la secuencia sustrato es una parte de una proteína diana de VEGF o VEGFR. En una realización específica los péptidos de biblioteca de sustrato incluyen los restos de VEGF o VEGFR de los sitios P1, P2, P3 y P4. En otro aspecto de esta realización, la eficacia de escisión mediante las muteínas de MT-SP1 de la invención de la secuencia sustrato detectada está aumentada en al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces o al menos 1000 veces con respecto a la actividad de escisión de MT-SP1 de tipo silvestre. En otro aspecto de esta realización, la especificidad de secuencia de las muteínas de MT-SP1 de la invención para escindir la secuencia sustrato está aumentada en al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces o al menos 1000 veces con respecto a la actividad de escisión de las muteínas de MT-SP1 de la invención con respecto a otros miembros de la biblioteca de sustrato. La creación de perfiles de especificidad diana de tipo silvestre y de muteína se puede realizar mediante la exploración posicional de bibliotecas combinatorias de sustrato (PSSCL), como se ha descrito en la publicación PCT WO 01/94332.

En otra realización, la invención proporciona un método para tratar a un paciente que tiene una patología relacionada con VEGF o VEGFR, tal como cáncer, degeneración macular, inflamación y diabetes. El método implica administrar al paciente una proteasa que escinde VEGF o una proteína de VEGFR, de forma que la escisión de VEGF o VEGFR trata la patología. En una realización relacionada, el tratamiento de cáncer mediante la administración de una proteasa sometida a ingeniería genética está en combinación con tratamiento con al menos un agente anticáncer diferente. En un aspecto de esta realización, la proteasa es una muteína de MT-SP1. En otro aspecto de esta realización, la proteasa es MT-SP1 de tipo silvestre.

El paciente que tiene una patología, por ejemplo, el paciente tratado mediante los métodos de esta invención, es un mamífero o más particularmente, un ser humano.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que se comprende comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento en la práctica o en el ensayo de la presente invención, se describen más adelante métodos y materiales adecuados. En el caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo definiciones, tiene el control. Además, adicionalmente, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no tienen por objeto ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

**Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 es una fotomicrografía de un gel de SDS-PAGE que muestra bandas de MT-SP1 purificadas mediante un procedimiento de purificación de una columna y después plegadas nuevamente a través de etapas de diálisis sucesivas. Las variantes de MT-SP1 se expresaron en bacterias y se purificaron a partir de cuerpos de inclusión. Cada proteasa conserva actividad catalítica elevada y es >99% pura y por tanto son apropiadas para estudios de cristología.

Las FIG. 2A-H son representaciones gráficas de perfiles de PSSCL de MT-SP1 de tipo silvestre y seis variantes. El perfil de MT-SP1 (FIG. 2A) muestra que su especificidad es algo amplia, de forma que se aceptará una diversidad de aminoácidos en las posiciones P4 y P3 además de Arg o Lys. Las FIGS. 2B-H son una representación gráfica de perfiles de PSSCL de muteínas de MT-SP1 CB18 (FIG. 2B), CB38 (FIG. 2C), CB159 (FIG. 2D), CB83 (FIG. 2E), CB155 (FIG. 2F), CB151 (FIG. 2G) y CB 152 (FIG. 2H), que muestran perfiles de especificidad reducidos. La actividad se representa en unidades de fluorescencia relativas a lo largo del eje  $\gamma$  dividiendo cada actividad de aminoácido entre la actividad del mejor aminoácido dentro de cada sub-biblioteca.

La FIG. 3 es una fotografía de un gel de proteína que muestra que VEGFR2-Fc se escinde eficazmente por MT-SP1 de tipo silvestre y muteínas de MT-SP1.

Las FIGS. 4A, 4B y 4C son representaciones gráficas del perfil de especificidad del sustrato de PSSCL en P2, P3 y P4 respectivamente, de MT-SP1 humano en una biblioteca fija de P1-Lys. El formato de biblioteca de cada posición extendida se enumera por debajo del perfil. La actividad se representa en pM/s en el eje  $\gamma$  para cada aminoácido a lo largo del eje x.

La FIG. 5 es una representación gráfica de tripsina y actividad de proteasa MT-SP1 a lo largo del tiempo en presencia de niveles crecientes de suero.

La FIG. 6 es una representación gráfica de las constantes de especificidad de MT-SP1 y las muteínas CB18, CB38, CB83, CB151, CB152, CB155 y CB159 sobre los sustratos sintéticos de tetrapéptido Ac-RQAR-AMC y Ac-RRVR-AMC. Las variantes se muestran a lo largo del eje x mientras que las constantes de especificidad se muestran a lo largo del eje  $\gamma$ .

La FIG. 7A es una representación gráfica de la cantidad de proliferación de células endoteliales tratadas con concentraciones aumentadas de MT-SP1 y las muteínas CB18, CB83 y CB 152. La FIG. 7B es una fotografía de una transferencia de western que muestra la escisión de VEGFR2 en células HUVEC en presencia de MT-SP1, CB18 y CB83, respectivamente. La FIG. 7C es una representación gráfica de la cantidad de VEGFR2 extracelular soluble liberado por HUVEC tras el tratamiento con MT-SP1, CB18 y CB83.

La FIG. 8 es una representación gráfica de la dosis máxima de MT-SP1, CB 18 y CB 152 que se puede tolerar por los ratones.

La FIG. 9 es una representación gráfica del alcance de inhibición de neovascularización por una dosis de MT-SP1 y CB18.

La FIG. 10 es una representación gráfica de la inhibición de permeabilidad vascular mediante MT-SP1, CB 18 y CB 152 en el ensayo de Miles de ratón.

La FIG. 11 es una fotografía de un gel de proteína que muestra la escisión de VEGF mediante MT-SP1 de tipo silvestre pero no la variante selectiva CB152.

**Descripción detallada de la invención**

Las serina proteasas tienen un armazón de proteína altamente adaptable. Estas proteasas difieren con respecto a una amplia diversidad en sus propiedades de reconocimiento de sustrato, que varían de altamente específicas a completamente inespecíficas. A pesar de estas diferencias en especificidad, el mecanismo catalítico se conserva bien, que consiste en un bolsillo de unión a sustrato que registra de forma correcta el péptido escindible en el sitio activo. Esta amplia familia de proteasas puede ser ampliamente divergente entre miembros en sus especificidades de secuencia aunque altamente conservadas en su mecanismo de catálisis. Esto es debido a que la especificidad de sustrato no está determinada únicamente por contactos locales directamente entre el péptido sustrato y la enzima (restos de primera esfera), sino también por factores de largo alcance (restos de segunda esfera). Los efectos de unión a sustrato tanto de primera esfera como de segunda esfera están determinados principalmente por bucles entre dominios de barril-B. Debido a que estos bucles no son elementos de núcleo de la proteína, la integridad del plegamiento se mantiene mientras que se pueden seleccionar variantes de bucle con especificidades de sustrato novedosas durante el transcurso de la evolución para satisfacer los nichos metabólicos o reguladores necesarios a nivel molecular.

Los experimentos de laboratorio apoyan la teoría de que las serina proteasas son armazones enzimáticos altamente adaptables. Por ejemplo, prácticamente cada aspecto de subtilisina se ha sometido nuevamente a ingeniería genética, incluyendo la especificidad de sustrato de la enzima, la termoestabilidad, el perfil de pH, la eficacia catalítica, la estabilidad oxidativa y la función catalítica.

Hasta la fecha, han existido varios intentos para alterar la especificidad de sustrato en proteasas usando diseño racional guiado por estructuras. Un ejemplo importante vino del laboratorio de Wells y colaboradores. Véase, Ballinger *et al.*, *Biochemistry*. 1996 Oct 22; 35 (42): 13570-85. Usando la subtilisina, una enzima con especificidad baja por restos hidrófobos en la posición P1, los autores de esta referencia lograron alterar su especificidad por restos tribásicos radicalmente realizando mutaciones de 3 puntos en el bolsillo de unión a sustrato. El mutante resultante tenía una especificidad de más de 1000 veces por sustratos tribásicos frente al sustrato hidrófobo original. En total, los estudios sobre el cambio de la especificidad de proteasas sugieren que es posible alterar la especificidad de sustrato radicalmente. Esta invención describe muteínas específicas de la serina proteasa MT-SP1 que tienen especificidad diana alterada y métodos para el uso de las mismas para tratar enfermedades.

### Definición de términos

Antes de exponer la invención con detalle, se definirán determinados términos usados en el presente documento.

El término "variante alélica" indica cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación y puede dar como resultado el polimorfismo fenotípico dentro de poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silentes (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácido alteradas. El término "variante alélica" también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

La expresión "complementos de moléculas polinucleotídicas" indica moléculas polinucleotídicas que tienen una secuencia de base complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGG 3' es complementaria a 5' CCGTGCAT 3'.

La expresión "secuencia de nucleótido degenerada" indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula polinucleotídica de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo resto de aminoácido (es decir, cada uno de los tripletes GAU y GAC codifican Asp).

Una "construcción de ADN" es una molécula de ADN monocatenaria o bicatenaria lineal o circular que comprende segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera que no se encuentra en la naturaleza. Las construcciones de ADN existen como un resultado de la manipulación humana e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

Un "segmento de ADN" es una parte de una molécula de ADN más grande que tiene atributos especificados. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido especificado es una parte de una molécula de ADN más grande, tal como un plásmido o fragmento de plásmido que, cuando se lee desde la dirección 5' a la 3', codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.

El término "vector de expresión" indica una construcción de ADN que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés unido operativamente a segmentos adicionales que proporcionan su transcripción en una célula hospedadora. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras y pueden incluir opcionalmente uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación y similares. Los vectores de expresión generalmente se obtienen a partir de ADN de plásmido o viral o pueden contener elementos de ambos.

El término "aislado" cuando se aplica a una molécula polinucleotídica, indica que el polinucleótido se ha retirado de su entorno genético natural y por tanto está libre de otras secuencias codificantes extrañas o indeseadas y está en una forma adecuada para uso dentro de sistemas de producción de proteína sometidos a ingeniería genética. Tales moléculas aisladas son aquellas que se separan de su entorno natural e incluyen ADNc y clones genómicos, así como polinucleótidos sintéticos. Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención pueden incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Dynan y Tijan, *Nature* 316: 774-78, 1985). Cuando se aplica a una proteína, el término "aislado" indica que la proteína se encuentra en una condición diferente a su entorno nativo, tal como fuera de la sangre y de tejido animal. En una forma preferida, la proteína aislada está sustancialmente libre de otras proteínas, particularmente otras proteínas de origen animal. Se prefiere proporcionar la proteína en una forma altamente purificada, es decir, al menos 90% pura, preferentemente más del 95% pura, más preferentemente más del 99% pura.

El término "unido operativamente", cuando se refiere a segmentos de ADN, indica que los segmentos están

dispuestos de forma que los mismos funcionan en conjunto para sus fines pretendidos, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y avanza a través del segmento codificante hasta el terminador.

5 El término “ortólogo” indica un polipéptido o proteína obtenido a partir de una especie que es el análogo funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la especiación.

10 El término “polinucleótido” indica un polímero mono o bicatenario de bases de desoxirribonucleótido o ribonucleótido leído desde el extremo 5' hasta el 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN y se pueden aislar a partir de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula de polinucleótido se proporciona en el presente documento en términos de nucleótidos (abreviados “nt”) o pares de bases (abreviados “pb”). El término “nucleótidos” se usa para moléculas tanto mono como bicatenarias cuando el contexto lo permite. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias el mismo se usa para indicar la longitud global y se comprenderá que es equivalente al término “pares de bases”. Se reconocerá por los expertos en la materia que las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos de la misma pueden ser escalonados; por tanto todos los nucleótidos dentro una molécula de polinucleótido bicatenaria pueden no estar emparejados. Tales extremos no emparejados, en general, no excederán de 20 nt de longitud.

20 El término “promotor” indica una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que proporciona la unión de ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Las secuencias promotoras comúnmente, pero no siempre, se encuentran en las regiones no codificantes 5' de los genes.

25 Una “proteasa” es una enzima que escinde enlaces peptídicos en péptidos, polipéptidos y proteínas. Un “precursor de proteasa” o un “zimógeno” es una forma relativamente inactiva de la enzima que comúnmente se vuelve activa tras la escisión por otra proteasa.

30 El término “secuencia señal secretora” indica una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un “péptido secretor”) que, como un componente de un polipéptido más grande, dirige al polipéptido más grande a través de una ruta secretora de una célula en la que el mismo se sintetiza. El polipéptido más grande comúnmente se escinde para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

El término “secuencia sustrato” indica una secuencia que se escinde por una proteasa.

35 El término “proteína diana” indica una proteína que se escinde en su secuencia sustrato por una proteasa.

40 El término “armazón” se refiere a una proteasa variante de tipo silvestre o existente en la cual se realizan diversas mutaciones. En general, estas mutaciones cambian la especificidad y actividad del armazón. Un ejemplo de una proteasa variante existente es una proteasa que existe en un organismo que se ha mutado en una o más posiciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de proteasa de tipo silvestre de la especie a la cual pertenece el organismo.

45 Un polipéptido o proteína “aislado” o “purificado” o una parte biológicamente activa de los mismos está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o fuente de tejido a partir de la cual se obtiene la proteína o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de forma recombinante. En una realización, la expresión “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de proteínas de proteasa que tienen menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de proteínas no proteasa (también denominadas en el presente documento una “proteína contaminante”), más preferentemente menos de aproximadamente el 20% de proteínas no proteasa, aún más preferentemente menos de aproximadamente el 10% de proteínas no proteasa y lo más preferente es que sea menos de aproximadamente el 5% de proteínas no proteasa. Cuando la proteína de proteasa o parte biológicamente activa de la misma se produce de forma recombinante, la misma también está preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, más preferentemente menos de aproximadamente el 10% y más preferentemente menos de aproximadamente el 5% del volumen de la preparación de proteína de proteasa.

60 La expresión “sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos” incluye preparaciones de proteínas de proteasa en las que la proteína se separa de los precursores químicos u otros químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. En una realización, la expresión “sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos” incluye preparaciones de proteínas de proteasa que tienen menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de precursores químicos o químicos no proteasa, más preferentemente menos de aproximadamente el 20% de precursores químicos o químicos no proteasa, aún más preferentemente menos de aproximadamente el 10% de precursores químicos o químicos no proteasa y lo más preferente es que sea menos de aproximadamente el 5% de precursores químicos o químicos no proteasa.

El término “selectividad” o “especificidad” es una proporción de eficacia de escisión de un sitio de sustrato dirigido frente a otro sitio de sustrato que no es el sitio dirigido. Como un ejemplo no limitante, con MT-SP1, el sitio dirigido es RRVR y el sitio no dirigido es RQAR.

5

El término “péptido” se refiere a un polipéptido de desde 2 hasta 40 aminoácidos de longitud.

### **Especificidad de sustrato de serina proteasas dirigidas terapéuticamente**

10 El tratamiento de enfermedad humana mediante agentes terapéuticos implica en su mayoría el empleo de moléculas pequeñas o el suministro de proteínas tales como insulina o EPO para alteraciones específicas a los programas celulares. Una clase nueva importante de agentes terapéuticos que se está desarrollando es una clase de proteasas sometidas a ingeniería genética para tener una nueva especificidad de sustrato de forma que las mismas se dirigen a moléculas relacionadas con enfermedad. Ahora se han desarrollado métodos para determinar las estructuras tridimensionales de proteasas que se programan con especificidad para atacar moléculas de superficie celular críticas. Los datos estructurales acerca de las proteínas sometidas a ingeniería genética en complejo con péptidos similares a diana proporcionan un marco para comprender las interacciones de cadena lateral directa y de segunda capa que determinan la especificidad. La correlación de la estructura tridimensional y la actividad y especificidad de proteasa son de interés académico y clínico demostrado a largo plazo. La invención se mueve más allá mostrando la importancia de las alteraciones de sitio de segunda capa en la actividad de una proteasa con especificidad alterada y proporciona muteínas de MT-SP-1 novedosas y métodos para el uso de las mismas para tratar enfermedad. Véase, por ejemplo, Perona, *et al.* (1995) *Biochemistry* 34(5): 1489-99.

25 La invención proporciona métodos de uso y métodos para diseñar y ensayar proteasas específicas de enfermedad programadas para dirigirse a proteínas críticas para el mantenimiento del cáncer y otras enfermedades. Estas proteasas proporcionan un enfoque nuevo importante para el tratamiento de cánceres, por ejemplo, impidiendo el crecimiento tumoral bloqueando la angiogénesis tumoral, así como otras enfermedades, incluyendo pero sin limitación, degeneración macular, inflamación o diabetes, en las que la angiogénesis juega un papel causal o contributivo.

30 La invención también proporciona métodos de uso y métodos para diseñar y ensayar proteasas específicas de diana programadas para dirigirse a VEGF y VEGFR que son críticas para mantener el cáncer y otras enfermedades. Estas proteasas proporcionan un enfoque nuevo importante para el tratamiento de cánceres, por ejemplo, impidiendo el crecimiento tumoral bloqueando la angiogénesis tumoral, así como de otras enfermedades, incluyendo pero sin limitación degeneración macular, inflamación o diabetes, en las cuales la angiogénesis juega un papel causal o contributivo.

40 La invención también proporciona métodos de uso y métodos para diseñar y ensayar proteasas específicas de angiogénesis programadas para dirigirse a proteínas críticas para modular la apoptosis. Estas proteasas proporcionan un enfoque nuevo importante para el tratamiento de cánceres, por ejemplo, impidiendo el crecimiento tumoral bloqueando la angiogénesis tumoral, así como de otras enfermedades, incluyendo pero sin limitación degeneración macular, inflamación o diabetes, en las cuales la angiogénesis juega un papel causal o contributivo.

45 Se proporcionan métodos para determinantes de especificidad en proteasas, permitiendo de ese modo el diseño de proteasas para desactivar las proteínas críticas para el mantenimiento del cáncer o la inflamación o el avance de degeneración macular o diabetes. Se usa una combinación de mutagénesis en base a estructura y exploración para diseñar las proteasas dirigidas. Las proteasas sometidas a ingeniería genética dirigidas para atacar proteínas relacionadas con enfermedad representan un sector completamente nuevo en la industria de la biotecnología. También se proporcionan métodos para crear proteasas selectivas como una nueva modalidad terapéutica en enfermedad humana. El desarrollo y prueba de experimentos de concepto en modelos animales de enfermedad proporciona una comprensión de la selectividad y reconocimiento de sustrato de proteasa en esta clase de enzimas y proporciona información útil para la dosificación y administración de proteasas de la invención para el tratamiento de enfermedad humana.

55 La divulgación proporciona agentes terapéuticos de proteasa, métodos para su producción y reactivos útiles con los mismos. Los métodos usan proteasas para abordar preocupaciones de salud crecientes tales como enfermedad cardiovascular, trastornos inflamatorios y cáncer.

60 En una realización, la invención caracteriza las estructuras tridimensionales, actividad y especificidad de serina proteasas con especificidad de sustrato extendida novedosas que se dirigen al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGF-R2). Estas proteasas se desarrollaron usando ingeniería de proteínas y se seleccionaron usando tecnología de creación de perfiles de proteasas única y potente. Construidas a partir de un armazón de proteasa de tipo silvestre de MT-SP1, las mismas representan una nueva modalidad terapéutica en el tratamiento del cáncer.

65 La señalización por el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores está implicada en la

angiogénesis patológica y el desarrollo rápido de vasculatura tumoral en cáncer. Los fármacos que bloquean esta ruta de señalización evitan el crecimiento y el mantenimiento del suministro sanguíneo al tumor, lo cual conduce a la muerte sistemática del tumor. El éxito reciente del anticuerpo anti-VEGF AVASTIN™ en pacientes con cáncer de colon metastásico ha validado VEGF como una diana para terapia angiogénica del cáncer. A pesar de estos resultados alentadores, la progresión tumoral ha continuado ocurriendo en tratamiento anti-VEGF.

Los mecanismos de cómo el anticuerpo AVASTIN™ se une a VEGF y evita que el mismo se una a su receptor. Experimentos de volteo (“knock-down”) muestran que el bloqueo de la función de VEGF bloquea la angiogénesis. Por tanto, la inhibición de señalización angiogénica a través de VEGFR-2 representa un área terapéutica subdesarrollada ideal para el desarrollo de proteasas producidas por ingeniería genética con dirección novedosa.

El tratamiento con una proteasa que escinde e inactiva específicamente la señalización del complejo VEGF/VEGFR-2 atenuará la señal angiogénica y creará y una combinación de receptor soluble que reduce los niveles de VEGF libre. Las proteasas variantes tienen una especificidad *in vitro* que reconoce una región crítica del receptor de VEGF, que es, en una realización, el tronco Flk-1/KDR, sobre una región de seis aminoácidos. Debido a su naturaleza catalítica y tamaño más pequeño, las proteasas producidas por ingeniería genética proporcionan un nuevo tratamiento terapéutico con ventajas con respecto a las proteínas de unión dirigidas competidoras. Las ventajas son: mejor penetración tumoral, mejor saturación de diana, eficacia más elevada y potencialmente dosificación más baja. En particular, debido a que las mismas se unen, hidrolizan y liberan, una proteasa única podría escindir e inactivar cientos a miles de receptores de VEGF de sustrato, ofreciendo una amplificación terapéutica sustancial. Además, MT-SP1 de tipo silvestre también escinde VEGFR y también se usa de acuerdo con la invención para escindir VEGFR.

### VEGF-R2 y patología angiogénica

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una citoquina que se une y señala a través de un receptor de superficie celular específico (VEGFR) para regular la angiogénesis, el proceso en el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura existente. La angiogénesis patológica describe la vascularización aumentada asociada con enfermedad e incluye acontecimientos tales como el crecimiento de tumores sólidos [MacMahon, *Oncologist*. 2000; 5, Sup. 1: 3-10], degeneración macular y diabetes. En el cáncer, los tumores sólidos requieren un suministro sanguíneo siempre creciente para el crecimiento y la metástasis. La hipoxia o la mutación oncogénica aumentan los niveles de ARNm de VEGF y VEGFR en el tumor y las células del estroma circundante conduciendo a la extensión de vasos existentes y la formación de una nueva red vascular. En la degeneración macular húmeda, se forma un crecimiento de vasos sanguíneos anormal por debajo de la mácula. Estos vasos filtran sangre y fluido en la mácula dañando las células foto-receptoras. En la diabetes, una carencia de sangre en los ojos también puede conducir a ceguera. La estimulación por VEGF de crecimiento capilar alrededor del ojo conduce a vasos desordenados que no funcionan apropiadamente.

Se han identificado tres receptores de VEGF de la familia de tirosina quinasa (VEGF-R-1/Flt1, VEGF-R-2/Flk-1/KDR, VEGFR-R-3/Flt-4). KDR (el homólogo de ratón es Flk-1) es un receptor de afinidad elevada de VEGF con una  $K_d$  de 400-800 pM [Waltenberger, *J Biol Chem*. 1994 Oct 28; 269(43): 26988-95] expresado exclusivamente en células endoteliales. La asociación de VEGF y KDR se ha identificado como una ruta de señalización específica de células endoteliales clave necesaria para la angiogénesis patológica [Kim, *Nature*. 1993 Apr 29; 362 (6423): 841-4; Millauer, *Nature*. 1994 Feb 10; 367 (6464): 576-9; Yoshiji, *Hepatology*, 1999 Nov; 30(5): 1179-86]. La dimerización del receptor tras la unión a ligando provoca la autofosforilación de los dominios citoplasmáticos y el reclutamiento de compañeros de unión que propagan la señalización a través del citoplasma y en el núcleo para cambiar los programas de crecimiento celular. El tratamiento de tumores con un VEGF-R2 soluble inhibe el crecimiento tumoral. [Lin, *Cell Growth Differ*. 1998 Jan; 9(1): 49-58] y la inhibición química de la fosforilación provoca que las células tumorales se vuelvan apoptóticas [Shaheen, *Cancer Res*. 1999 Nov 1; 59(21): 5412-6].

Las terapias que se dirigen a los receptores de VEGF y Flk-1/KDR específicamente han inhibido la angiogénesis patológica y han mostrado la reducción del tamaño tumoral en múltiples modelos de ratón de tumores sólidos de seres humanos y ratón [Prewett, *Cancer Res*. 1999 Oct 15; 59(20): 5209-18; Fong, *Neoplasia*. 1999, Apr; 1(1): 31-41. Fe de erratas en: *Neoplasia* 1999 Jun; 1(2): 183] en solitario y en combinación con terapias citotóxicas [Klement, *J Clin Invest*. 2000 Apr; 105(8): R15-24]. Los estudios con inhibidores de molécula pequeña y anticuerpos validan la familia del receptor de VEGF como una diana anti-angiogénesis potente, pero aún se necesitan agentes terapéuticos más eficaces.

VEGFR está compuesto de una región extracelular de siete dominios similares a inmunoglobulina (Ig), una región transmembrana y dos dominios de tirosina quinasa citoplasmáticas. Los primeros tres dominios similares a Ig han demostrado que regulan la unión a ligando, mientras que los dominios 4 a 7 tienen un papel en la inhibición de la dimerización correcta y la señalización en ausencia de ligando. Como una diana de la proteólisis selectiva mediante proteasas producidas por ingeniería genética, tiene las siguientes características diana prometedoras:

- una región lábil de aminoácidos accesible a proteólisis;
- identidad de secuencia elevada entre las especies humana, rata y ratón;



- regulación negativa de la señalización tras la escisión; y
- generación proteolítica de receptores solubles capaces de unión a ligando de forma no productiva.

5 Varias regiones de VEGF-R2 están disponibles para proteólisis específica incluyendo la región de tronco antes de la región transmembrana y bucles no estructurados entre los dominios similares a Ig.

**Proteasas MT-SP1**

10 La presente invención proporciona métodos para generar y seleccionar proteasas MT-SP1 para escindir proteínas diana en una secuencia sustrato dada así como muteínas particulares y métodos para el uso de las mismas para tratar enfermedad. Las proteasas son enzimas de degradación de proteína que reconocen un aminoácido o una secuencia sustrato de aminoácidos dentro de una proteína diana. Tras el reconocimiento de la secuencia sustrato, las proteasas catalizan la hidrólisis o escisión de un enlace peptídico dentro de una proteína diana. Tal hidrólisis de la proteína diana puede inactivarla, dependiendo del emplazamiento del enlace peptídico dentro del contexto de la secuencia de longitud completa de la secuencia diana. La especificidad de proteasas MT-SP1 se puede alterar a través de ingeniería genética de proteínas. Si una proteína se somete a ingeniería genética para reconocer una secuencia sustrato dentro de una proteína o proteínas diana (i) que alterarían la función, es decir, mediante inactivación de la proteína o proteínas dianas tras la catálisis de hidrólisis del enlace peptídico y (ii) la proteína o proteínas diana son un punto de intervención molecular de una enfermedad o enfermedades particulares, entonces la proteasa sometida a ingeniería genética tiene un efecto terapéutico a través de un acontecimiento de inactivación mediado por proteólisis. En particular, las proteasas MT-SP1 se pueden someter a ingeniería genética para escindir receptores diana específicos entre sus dominios transmembrana y de unión a citoquina o al factor de crecimiento. Las regiones de tronco que funcionan para enlazar receptores de proteína a la superficie de una célula o regiones bucle de ese modo se desconectan de los dominios globulares en una cadena polipeptídica.

25 En una realización, la proteína diana que se tiene que escindir por proteasas MT-SP1 está implicada en una patología, donde la escisión de la proteína diana en una secuencia sustrato dada sirve como un tratamiento para la patología.

30 La proteasa escinde moléculas de superficie celular que son responsables de la modulación de la angiogénesis. Cuando la molécula de superficie celular es una señalización de VEGFR en angiogénesis tumoral, la escisión evita la propagación del cáncer. Por ejemplo, la escisión de un dominio de superficie celular a partir de una molécula de VEGFR puede inactivar su capacidad de transmitir señales extracelulares, especialmente señales de proliferación celular. Sin la angiogénesis para alimentar el tumor, las células de cáncer con frecuencia no proliferan. En una realización, una proteasa MT-SP1 de la invención se usa de este modo para tratar el cáncer. También la escisión de VEGF se puede usar para modular angiogénesis en otras patologías, tales como degeneración macular, inflamación y diabetes. En una realización, la escisión de una proteína de VEGF diana implicada en la progresión del ciclo celular inactiva la capacidad de la proteína de permitir que el ciclo celular siga adelante. Sin la progresión del ciclo celular, las células de cáncer no pueden proliferar. Por lo tanto, las proteasas MT-SP1 de la invención que escinden VEGF o VEGFR son útiles en el tratamiento del cáncer y de otras patologías dependientes del ciclo celular.

45 La proteasa también escinde proteínas solubles que son responsables de tumorigenicidad. La escisión de VEGF evita la señalización a través del receptor de VEGF y reduce la angiogénesis, reduciendo de ese modo la enfermedad en la que la angiogénesis juega un papel, tal como el cáncer, la degeneración macular, la inflamación y la diabetes. Además, la señalización de VEGF es responsable de la modulación del ciclo celular en determinados tipos celulares. Por lo tanto, las proteasas MT-SP1 de la invención que escinden VEGF son útiles en el tratamiento del cáncer y otras patologías dependientes del ciclo celular.

50 En algunas realizaciones, la proteasa MT-SP1 sometida a ingeniería genética se diseña para escindir una o más de las proteínas diana en la Tabla 1, inactivando de ese modo la actividad de la proteína. La proteasa MT-SP1 se puede usar para tratar una patología asociada con esa proteína, inactivándola.

**Tabla 1 Dianas de Proteasa**

Diana	Indicación	Clase de molécula
VEGF	Cáncer	Citoquina
VEGFR-1/Flt-1	Cáncer	Receptor
VEGFR-2/KDR	Cáncer	Receptor
VEGFR-3/Flt-4	Cáncer	Receptor

55 El almacén de proteasa es la proteína MT-SP1 descrita más adelante en la Tabla 2.

**Tabla 2 Armazones de Proteasa**

<b>Código</b>	<b>Nombre</b>	<b>Gen</b>	<b>Enlace</b>	<b>Locus</b>
S01.087	serina proteasa de tipo membrana	MT-SP1	84000	11q23

- 5 El polipéptido de MT-SP1 de tipo silvestre de SEC ID N°: 1 se proporciona en la Tabla 3 y se denomina TADG-15.

**Tabla 3 Polipéptido MT-SP1 de tipo silvestre (SEC ID N°: 1)**

	<b>1</b>				<b>50</b>
<b>TADG-15</b>	<b>MGSDRARKGG</b>	<b>GGPKDFGAGL</b>	<b>KYNSRHEKVN</b>	<b>GLEEGVEFLP</b>	<b>VNNVKKVEKH</b>
	<b>51</b>				<b>100</b>

TADG-15	GPGRWVVLAA	VLIGLLLVLL	GIGFLVWHLQ	YRDVRVQKVF	NGYMRITNEN	
	101					150
TADG-15	FVDAYENSNS	TEFVSLASKV	KDALKLLYSG	VPFLGPYHKE	SAVTAFSEGS	
	151					200
TADG-15	VIAYYWSEFS	IPQHLVEEAE	RVMAEERVVM	LPPRARSLSKS	FVVTSVVAFP	
	201					250
TADG-15	TDSKTVQRTQ	DNSCSFGLHA	RGVELMRFTT	PGFPDSPYPA	HARCQWALRG	
	251					300
TADG-15	DADSVLSLTF	RSFDLASCDE	RGSDLVTVYN	TLSPMEPHAL	VQLCGTYPPS	
	301					350
TADG-15	YNLTFHSSQN	VLLITLITNT	ERRHPGFEEAT	FFQLPRMSSC	GGRLRKAQGT	
	351					400
TADG-15	FNSPYYPGHY	PPNIDCTWNI	EVPNNQHVKV	SFKFFYLLEP	GVPAGTCKPKD	
	401					450
TADG-15	YVEINGEKYC	GERSQFVVTS	NSNKITVRFH	SDQSYTDTGF	LAEYLSYDSS	
	451					500
TADG-15	DPCPGQFTCR	TGRCIRKELR	CDGWADCTDH	SDELNCSCDA	GHQFTCKNKF	
	501					550
TADG-15	CKPLFWVCDS	VNDCGDNSE	QGCSCPAQTF	RCSNGKCLSK	SQQCNGKDDC	
	551					600
TADG-15	GDGSDEASCP	KVNVVTCTKH	TYRCLNGLCL	SKGNPECDGK	EDCSDGSDEK	
	601					650
TADG-15	DCDCGLRSFT	RQARVVGTD	ADEGEWPWQV	SLHALGQGHI	CGASLISPW	
	651					700
TADG-15	LVSAAHCYID	DRGFRYSIPT	QWTAFLGLHD	QSORSAPGVQ	ERRLKRIISH	
	701					750
TADG-15	PPFNDFTFDY	DIALLELEKP	AEYSSMVRPI	CLPDASHVFP	AGKAIWVTGW	
	751					800
TADG-15	GHTQYGGTGA	LILQKEIRV	INQTTCEPLL	PQQITPRMMC	VGFLSGGVDS	
	801					850
TADG-15	CQGDSSGPLS	SVEADGRIFQ	AGVVSXWGDGC	AQRNKPGVYT	RLPLFRDWIK	
TADG-15	ENTGV	(SEQ ID NO:1)				

En la Tabla 4 se proporciona un alineamiento de ClustalW, que compara el polipéptido MT-SP1 de tipo silvestre de SEC ID N°: 1, denominado TADG-15, con el dominio de proteasa MT-SP1 de SEC ID N°: 2. Los restos de dominio de proteasa MT-SP1 dirigidos para mutagénesis se muestran en negritas. El dominio de proteasa MT-SP1 está compuesto de una pro-región y un dominio catalítico. La parte catalíticamente activa comienza después del sitio de autoactivación: RQAR con la secuencia WGG (subrayada).

Tabla 4 ClustalW de Dominio de Proteasa MT-SP1

```

FileUp
MSF: 855  Type: P  Check: 4738  ..
Name: MTSP_protease_domain  Len: 855  Check: 8683  Weight: 0
Name: TADG-15  Len: 855  Check: 6055  Weight: 0

//
MTSP_protease_domain 1 ..... 50
TADG-15 MGS DRARKGG GPKDFGAGL KYNSRHEKVN GLEEGVEFLP VNNVKKVEKH

MTSP_protease_domain 51 ..... 100
TADG-15 GPGRWVFLAA VLIGLLLVLL GIGFLVWHLQ YRDVVRQKVF NGYMRITNEN

MTSP_protease_domain 101 ..... 150
TADG-15 FVDAYENSNS TEFVSLASKV KDALKLLYSG VPFLGPYHKE SAVTAFSEGS

MTSP_protease_domain 151 ..... 200
TADG-15 VIAYYWSEFS IPQHLVEEAE RVMAEERVVM LPPRARSLKS FVVTSVVAFP

MTSP_protease_domain 201 ..... 250
TADG-15 TDSKTVQRTQ DNSCSFGLHA RGVELMRFTT PGFPDSPYPA HARCQWALRG

MTSP_protease_domain 251 ..... 300
TADG-15 DADSVLSLTF RSFDLASCDE RGS DLVTVYN T LSPMEPHAL VQLCGTYPPS

MTSP_protease_domain 301 ..... 350
TADG-15 YNLTFHSSQN VLLITLITNT ERRHPGFEAT FFQLPRMSSC GGRLRKAQGT

MTSP_protease_domain 351 ..... 400
TADG-15 FNSPYYPGHY PPNIDCTWNI EVPNNQHVKV SFKFFYLLEP GVPAGTCKPKD

MTSP_protease_domain 401 ..... 450
TADG-15 YVEINGEKYC GERSQFVVTS NSNKITVRFH SDQSYTDITGF LAEYLSYDSS

MTSP_protease_domain 451 ..... 500
TADG-15 DPCPGQFTCR TGR CIRKELR CDGWADCTDH SDELNCSCDA GHQFTCKNKF

MTSP_protease_domain 501 ..... 550
TADG-15 CKPLFWVCDS VNDCGDNSDE QGCSCPAQTF RCSNGKCLSK SQQCNGKDDC

MTSP_protease_domain 551 ..... 600
TADG-15 GDGSDEASCP KVNVTCTKH TYRCLNGLCL SRGNPECDGK EDCSDGSDEK

MTSP_protease_domain 601 ..... 650
TADG-15 DCDCGLRSFT RQARVVGTD ADEGEWPQV SLHALGQGHI CGASLISPW

MTSP_protease_domain 651 ..... 700
TADG-15 LVSAACYID DRGFRYSPT QWTAFLGLHD QSQRSAPGVQ ERRLKRIISH

MTSP_protease_domain 701 ..... 750
TADG-15 LVSAACYID DRGFRYSPT QWTAFLGLHD QSQRSAPGVQ ERRLKRIISH
    
```

MTSP_protease_domain	PPFNDFTFDY	DIALLELEKP	AEYSSMVRPI	CLPDASHVFP	AGKAIWVTGW
TADG-15	PPFNDFTFDY	DIALLELEKP	AEYSSMVRPI	CLPDASHVFP	AGKAIWVTGW
	751				800
MTSP_protease_domain	GHTQYGGTGA	LILQKGEIRV	INQTTCEENLL	PQQITPRMMC	VGFLSGGVDS
TADG-15	GHTQYGGTGA	LILQKGEIRV	INQTTCEENLL	PQQITPRMMC	VGFLSGGVDS
	801				850
MTSP_protease_domain	CQGDSGGPLS	SVEADGRIFQ	AGVVSWDGDC	AQRNKPGVYT	RLPLFRDWIK
TADG-15	CQGDSGGPLS	SVEADGRIFQ	AGVVSWDGDC	AQRNKPGVYT	RLPLFRDWIK
	851				
MTSP_protease_domain	ENTGV	(SEQ ID NO:2)			
TADG-15	ENTGV	(SEQ ID NO:1)			

5 En la Tabla 5 se proporciona un alineamiento ClustalW, que compara el dominio de proteasa MT-SP1 de tipo silvestre de SEC ID N°: 2 con quimotripsina humana. Los restos de dominio de proteasa MT-SP1 dirigidos para mutagénesis se enumeran de acuerdo con quimotripsina.

**Tabla 5 Alineamiento Clustal W de quimotripsina humana y dominio de proteasa MT-SP1**

Chymotrypsin B	16	30	31	45	46	60	61	66
MTSP_protease_domain	IVNGEDAVPGSWPWQ	VVGGTDADEGEWPWQ	VSLQDKTGFHFCGGS	VSLHALGQGHICGAS	LISEDWVVTAAHCGV	LISPNNLVSAAHCYI	-----RTSDVV	DDRGFRYSDPTQWTA
	67	80	81	95	96	11	111	125
Chymotrypsin B	VAGEFDQGS-DEENI	QVLKIAKVFKNPKFS	ILTVNNDITLLKLAT	PARFSQTVSAVCLPS				
MTSP_protease_domain	FLGLHDQSQRSAPGV	QERRLKRIISHPPFN	DFTFDYDIALLELEK	PAEYSSMVRPICLPD				
	126	140	141	155	156	17	171	184
Chymotrypsin B	ADDDFPAGTLCATTG	WGKTKYNANKTPDKL	QQAALPLLSNAECKK	SWGRRITDVMICAG-				
MTSP_protease_domain	ASHVFPAGKAIWVTG	WGHTQYGG-TGALIL	QKGEIRVINQTTCEEN	LLPQQITPRMMC				
	185	198	199	212	213	22	227	240
Chymotrypsin B	-ASGVSSCMGDSGGP	L-VCQKDGAWTLVGI	VSWGSDTCSTSS-PG	VYARVTKLIPWVQKI				
MTSP_protease_domain	LSGGVDSCQGDSSGP	LSSVEADGRIFQAGV	VSWGSDG-	VYTRLPLFRDWIKEN				
	241		6	CAQRNKPG				
Chymotrypsin B	LAAN (SEQ ID NO: 3)							
MTSP_protease_domain	TGV- (SEQ ID NO: 2)							

10 En la Tabla 6 se proporciona una secuencia de ADN que codifica el dominio catalítico (SEC ID N°: 2) de dominio de proteasa MT-SP1 de tipo silvestre como está contenido dentro del vector de clonación pQE.

**Tabla 6 . La secuencia de ADN del dominio catalítico de MT-SP1de tipo silvestre**

ggt	ggt	ggg	ggc	acg	gat	gcg	gat	gag	ggc	gag	tgg	ccc	tgg	cag	gta	agc	ctg	cat	gct
ctg	ggc	cag	ggc	cac	atc	tgc	ggt	gct	tcc	ctc	atc	tct	ccc	aac	tgg	ctg	gtc	tct	gcc
gca	cac	tgc	tac	atc	gat	gac	aga	gga	ttc	agg	tac	tca	gac	ccc	acg	cag	tgg	acg	gcc
ttc	ctg	ggc	ttg	cac	gac	cag	agc	cag	cgc	agc	gcc	cct	ggg	gtg	cag	gag	cgc	agg	ctc
aag	cgc	atc	atc	tcc	cac	ccc	ttc	aat	gac	ttc	acc	ttc	gac	tat	gac	atc	gcg	ctg	ctg
ctg	gag	ctg	gag	aaa	ccg	gca	gag	tac	agc	tcc	atg	gtg	cgg	ccc	atc	tgc	ctg	ccg	gac
gcc	tcc	cat	gtc	ttc	cct	gcc	ggc	aag	gcc	atc	tgg	gtc	acg	ggc	tgg	gga	cac	acc	cag
tat	gga	ggc	act	ggc	gcg	ctg	atc	ctg	caa	aag	ggt	gag	atc	cgc	gtc	atc	aac	cag	acc
acc	tgc	gag	acc	ctc	ctg	ccg	cag	cag	atc	acg	ccg	cgc	atg	atg	tgc	gtg	ggc	ttc	ctc
agc	ggc	ggc	gtg	gac	tcc	tgc	cag	ggt	gat	tcc	ggg	gga	ccc	ctg	tcc	agc	gtg	gag	gcg
gat	ggg	cgg	atc	ttc	cag	gcc	ggt	gtg	gtg	agc	tgg	gga	gac	ggc	tgc	gct	cag	agg	aac
aag	cca	ggc	gtg	tac	aca	agg	ctc	cct	ctg	ttt	cgg	gac	tgg	atc	aaa	gag	aac	act	ggg
gta	tag	(SEC ID N°: 4)																	

15 **Ingeniería genética de muteínas de MT-SP1**

20 Prácticamente cada aspecto de una proteasa, incluyendo MT-SP1, se puede someter nuevamente a ingeniería genética, incluyendo la especificidad de secuencia sustrato, termoestabilidad, perfil de pH, eficacia catalítica,

estabilidad oxidativa y función catalítica de la enzima.

La proteasa MT-SP1 de tipo silvestre se usa de acuerdo con los métodos de la invención como un armazón para incorporar diversas mutaciones que cambian su especificidad de sustrato. Entre los determinantes de especificidad de secuencia sustrato en serina proteasas provienen de las posiciones S1-S4 en el sitio activo, donde la proteasa está en contacto con los restos P1-P4 de la secuencia sustrato peptídica. En algunos casos, existe poca (si existe alguna) interacción entre los bolsillos S1-S4 del sitio activo, de forma que cada bolsillo parece reconocer y unirse al resto correspondiente en la secuencia sustrato peptídica independiente de otros bolsillos. Por tanto, los determinantes de especificidad generalmente se pueden cambiar en un bolsillo sin afectar la especificidad de los otros bolsillos.

Por ejemplo, una proteasa MT-SP1 con especificidad baja por un resto en un sitio de unión particular o por una secuencia particular se altera en su especificidad realizando mutaciones puntuales en el bolsillo de unión de secuencia sustrato. En algunos casos, la muteína de MT-SP1 resultante tiene un aumento de más de 2 veces en la especificidad en un sitio o por una secuencia particular que el tipo silvestre. En otra realización, la muteína de MT-SP1 resultante tiene un aumento de más de 5 veces en la especificidad en un sitio o para una secuencia particular con respecto al tipo silvestre. En otra realización, la muteína de MT-SP1 resultante tiene un aumento de más de 10 veces en la especificidad en un sitio o para una secuencia particular con respecto al tipo silvestre. En otra realización, la muteína de MT-SP1 resultante tiene un aumento de más de 100 veces en especificidad en un sitio o para una secuencia particular con respecto al tipo silvestre. En otra realización, la muteína de MT-SP1 resultante tiene un aumento de más de 1000 veces en la especificidad en un sitio o por una secuencia particular con respecto al tipo silvestre.

En una realización de este ejemplo, la especificidad se mide observando cuántas secuencias sustrato dispares escinden una proteasa de muteína a una actividad dada en comparación con el número en la proteasa de tipo silvestre. Si la proteasa de muteína escinde menos secuencias sustrato que el tipo silvestre, entonces la proteasa de muteína tiene una especificidad mayor que el tipo silvestre. Una muteína que tiene especificidad más de 10 veces mayor que una proteasa de tipo silvestre escinde 10 veces menos secuencias sustrato que la proteasa de tipo silvestre.

La invención también contempla bibliotecas de armazones de MT-SP1 con diversas mutaciones que se generan y seleccionan usando métodos conocidos en la técnica y aquéllos detallados en el presente documento. Las bibliotecas se exploran para determinar la especificidad de secuencias sustrato de los miembros. Las bibliotecas de armazones de MT-SP1 se ensayan para determinar la especificidad exponiendo los miembros a secuencias sustrato peptídicas. El miembro de MT-SP1 con las mutaciones que permite que el mismo escinda la secuencia sustrato se identifica. La biblioteca de armazón del MT-SP1 se construye con una diversidad de mutación suficiente en el armazón de forma que una diversidad de secuencias sustrato peptídicas se escinden por diversos miembros de la biblioteca de armazón de MT-SP1. Por tanto, se puede generar proteasas específicas para cualquier proteína diana.

En el presente documento se describen restos de proteasa particulares que, tras mutación, influyen sobre la actividad y especificidad de la proteasa de armazón de MT-SP1. MT-SP1 es una serina proteasa. Las serina proteasas son miembros de la misma familia que quimotripsina. En una realización de la invención, se generan muteínas de MT-SP1 con especificidad alterada mediante un enfoque de diseño en base a estructura. Cada proteasa tiene una serie de aminoácidos que se alinea con el bolsillo de sitio activo y establece contacto directo con el sustrato. A través de la familia de quimotripsina, la interacción de la estructura principal entre el sustrato y la enzima se conserva completamente, pero las interacciones de cadena lateral varían considerablemente. La identidad de los aminoácidos que comprenden los bolsillos S1-S4 del sitio activo determina la especificidad de sustrato de ese bolsillo particular. El injerto de aminoácidos de una serina proteasa en otra del mismo pliegue modifica la especificidad de una a la otra. Los restos de armazón de serina proteasa se identifican usando numeración de quimotripsina. Por ejemplo, una mutación en la posición 99 en el bolsillo S2 a un aminoácido más pequeño confiere una preferencia por restos hidrófobos más grandes en la posición de sustrato P2. Usando este proceso de mutagénesis selectiva, seguido por exploración de biblioteca de sustrato, se pueden generar e identificar proteasas con especificidades de sustrato novedosas hacia proteínas implicadas en diversas enfermedades.

Los aminoácidos de la proteasa que comprenden los bolsillos S1-S4 son aquellos que tienen cadenas laterales dentro de 4 a 5 Angstroms del sustrato. Las interacciones que estos aminoácidos que tienen con el sustrato de proteasas generalmente se denominan interacciones de "primera capa" debido a que las mismas contactan directamente el sustrato. También existen interacciones de "segunda capa" y "tercera capa" que posicionan en última instancia los aminoácidos de primera capa. La invención también contempla la mutación de esos aminoácidos que experimentan interacciones de segunda y tercera capa con el fin de cambiar la especificidad de índice d de reacción de la muteína de proteasa de la invención.

Los miembros de familia de quimotripsina comparten secuencia y homología estructural con quimotripsina. En base a la numeración de quimotripsina, los restos de sitio activo son Asp102, His57 y Ser 195. La secuencia de aminoácidos lineal se puede alinear con la de quimotripsina y numerar de acuerdo con las láminas  $\beta$  de quimotripsina. Las inserciones y supresiones ocurren en los bucles entre las láminas beta, pero a través de la familia

estructural, las láminas de núcleo están conservadas. Las serina proteasas interactúan con un sustrato de una manera de lámina  $\beta$  conservada. Hasta 6 enlaces de hidrógeno conservados pueden ocurrir entre el sustrato y la enzima. Todas las serina proteasas de la familia de quimotripsina tienen una región conservada en su extremo N que es necesaria para la actividad catalítica. Es generalmente IIGG, VVGG o IVGG (SEC ID N°: 5, 6 y 7 respectivamente). Cuando el primer aminoácido en este cuarteto se enumera de acuerdo con la numeración de quimotripsina, se le asigna la denominación de Ile16. Esta numeración no refleja la longitud de la región precursora. También, en una realización, las muteínas descritas en el presente documento están en el armazón de MT-SP1 de rata. En otra realización, las muteínas descritas en el presente documento están en el armazón humano. La numeración de quimotripsina y los restos a los que se hace referencia en el presente documento se aplican al armazón de MT-SP1 de rata y humano. Las muteínas tanto humanas como de rata se pueden preparar usando los sistemas de expresión de la invención. Los armazones de MT-SP1 aislados o clonados a partir de otras especies también están incluidos dentro de la presente invención.

#### Determinantes estructurales de MT-SP1

Los sitios de reconocimiento de sustrato de serina proteasa se marcan de acuerdo con el método de Schechter y Berger Bioche. Biophys. Res. Commun. 27(1967) 157-162. Los marcadores aumentan el número de P1, P2.... Pn para los aminoácidos sustrato N terminales al enlace escindible y P1', P2', .... Pn' para los aminoácidos sustrato C terminales al enlace escindible. Los bolsillos de reconocimiento de sustrato correspondientes en la enzima se marcan, Sn....S2, S1, S1', S2'... Sn'. Por tanto, P2 interactúa con S2, P1 con S1, P1' con S1', etc. Los aminoácidos en el armazón de MT-SP1 se enumeran de acuerdo con su alineación con la quimotripsina de serina proteasa. Véase, Blow, D. M. (1976) Acc. Chem. Res. 9, 145-152.

Para serina proteasas, los siguientes aminoácidos en la secuencia primaria son determinantes de especificidad: 195, 102, 58 (la triada catalítica); 189, 190, 191, 192 y 226 (P1); 57, el bucle entre 58 y 64 y 99 (P2); 192, 217, 218 (P3), el bucle entre Cys 168 y Cys182, 215 y 97 a 100 (P4). La posición 189 en una serina proteasa es un resto internado en el fondo del bolsillo que determina la especificidad de P1. Para preparar una proteasa variante con un perfil de reconocimiento de sustrato alterado, los aminoácidos en la estructura tridimensional que contribuyen a la selectividad del sustrato (determinantes de especificidad) se dirigen para mutagénesis. Para las serina proteasas, numerosas estructuras de miembros de familia han definido los restos de superficie que contribuyen a la especificidad de sustrato extendida (Wang *et al.*, Biochemistry 2001 Agost 28; 40(34): 10038-46; Hopfner *et al.*, Structure Fold Des. 1999 Agost 15; 7(8): 989-96; Friedrich *et al.*, J Biol Chem. 2002 Jan 18; 277(3): 2160-8; Waugh *et al.*, Nat Struct Biol. 2000 Sep; 7(9): 762-5).

Los determinantes estructurales de MT-SP1 se enumeran en la Tabla 7 siguiendo la numeración de quimotripsina. El número debajo de Cys168-Cys182 y los encabezados de columnas de bucle de 60 indican el número de aminoácidos en el bucle entre los dos aminoácidos. La denominación sí/no debajo del encabezado de la columna Cys191-Cys220 indica si el puente disulfuro está presente en esta proteasa. Estas regiones son variables dentro de la familia de serina proteasas similares a quimotripsina y representan determinantes estructurales en las mismas.

Tabla 7. Determinantes estructurales de MT-SP1

Restos de Armazón que Determinan Especificidad														
S4				S3			S2			S1				
	171	174	180	215	Cys <sup>168</sup> Cys <sup>182</sup>	192	218	99	57	bucle de 60 (58-64)	189	190	226	Cys <sup>191</sup> Cys <sup>220</sup>
MT-SP1	Leu	Gln	Met	Trp	13	Gln	Asp	Phe	His	16	Asp	Ser	Gly	sl



Los resultados de la biblioteca combinatoria sintética de exploración posicional (PSSCL) para las posiciones de sustrato P1 a P4 de MT-SP1, quimotripsina, tripsina y trombina se proporcionan en la Tabla 8. En la Tabla 8 “Hyd” representa cualquier aminoácido hidrófobo (es decir, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina o triptófano). “Xxx” representa cualquier aminoácido.

5

**Tabla 8. Especificidades de sustrato para MT-SP1 y proteasas relacionadas**

	Especificidad de Sustrato			
	P4	P3	P2	P1
MT-SP1	Arg	Hyd	Ser	Arg
	Hyd	Arg	Thr	Lys
Quimotripsina	Xxx	Xxx	Val	Phe
			Pro	Val
Tripsina	Xxx	Xxx	Ala	Arg
			Ser	Lys
Trombina	Phe	Xxx	Pro	Arg
	Leu			Lys

#### Construcciones de muteína de MT-SP1

10 Para cambiar la preferencia de sustrato de un subsitio dado (S1-S4) de un aminoácido dado, los determinantes de especificidad que revisten en el bolsillo de unión se mutan, individualmente o en combinación. El conjunto resultante de muteínas de proteasa, teniendo cada miembro diferente una especificidad diferente y una o más mutaciones diferentes la una de la otra y produciéndolas las secuencias codificantes y vectores de expresión, constituyen aspectos importantes de la presente invención. En una realización de la invención, se usa una técnica de mutagénesis de saturación en la que el resto o restos que revisten el bolsillo se mutan a cada uno de los 20 aminoácidos posibles.

20 Esto se puede conseguir usando el método de Kunkle (En: Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.* (eds.) John Wiley y Sons, Inc., Media Pa.). En resumen, se sintetiza un cebador oligonucleotídico mutagénico que contiene una aleatorización NNS o NNK en el codón deseado. El cebador se hibrida con el molde de ADN monocatenario y se añade ADN polimerasa para sintetizar la cadena complementaria del molde. Después del ligamiento, el molde de ADN bicatenario se transforma en *E. coli* para amplificación. Como alternativa, se realizan cambios de aminoácido único usando kits de mutagénesis dirigida convencionales disponibles en el mercado tales como QuikChange (Stratagene). En otra realización, se podría usar cualquier método conocido comúnmente en la técnica para mutación de aminoácido específica de sitio de MT-SP1 para preparar un conjunto de muteínas de MT-SP1 de la invención que se puedan explorar para identificar muteínas que escinden VEGF, un VEGFR u otra proteína diana.

30 MT-SP1 es una proteína de mosaico que contiene un dominio transmembrana, dos dominios CUB, cuatro repeticiones LDRL y un dominio de serina proteasa. El dominio de proteasa MT-SP1 se ha expresado en bacterias o levaduras en cantidades de miligramos y se ha purificado. La creación de perfiles mediante bibliotecas combinatorias de sustrato de explotación posicional (PSSCL) reveló que tiene actividad similar a tripsina, demostrando una preferencia marcada por restos básicos en la posición P1. La especificidad de P2-P4 extendida de MT-SP1 se muestra en la Tabla 9.

35

**Tabla 9. Especificidad de P2-P4 extendida de MT-SP1 de tipo silvestre**

P4	P3	P2	P1
Arg/Lys	Xxx	Xxx	Arg/Lys o
Xxx	Arg/Lys	Xxx	Arg/Lys
en el que Xxx es cualquier aminoácido			

40 Por tanto, MT-SP1 parece tener un cambio de especificidad, en el que la misma acepta un resto cargado positivamente en la posición P4 o un resto cargado positivamente en la posición P3. La estructura cristalina del dominio de proteasa MT-SP1 se ha resuelto, proporcionando un fundamento estructural para su perfil de especificidad de sustrato.

Para desarrollar muteínas novedosas útiles para atenuar la señalización de VEGF para terapia anti-angiogénesis, los polipéptidos de MT-SP1 se someten a ingeniería genética para escindir e inactivar el receptor 2 de VEGF (KDR)

selectivamente. El dominio de proteasa del MT-SP1 de tipo silvestre (denominado en lo sucesivo en el presente documento MT-SP1) y mutantes de los mismos se clonan, expresan, purifican y someten a creación de perfiles mediante PSSCL. Véase, la publicación PCT WO 01/94332.

- 5 Después MT-SP1 de tipo silvestre y los mutantes se ensayan para determinar la escisión de receptor VEGF purificado, como se ha descrito e ilustrado adicionalmente en los Ejemplos más adelante.

10 Las variantes del MT-SP1 que son capaces de escindir el receptor de VEGF purificado se ensayan para la escisión del receptor en células endoteliales, en las que la escisión da como resultado la abrogación de la proliferación celular que ese produce como resultado de la señalización de VEGF. Véase, por ejemplo Yilmaz *et al.*, 2003 Biochem. Biophys. Res. Commun. 306(3): 730-736; Gerber *et al.*, 1998 J Biol Chem. 273(46): 30336-43. Después se ensayan variantes prometedoras en modelos animales de angiogénesis y crecimiento tumoral, incluyendo el ensayo de microbolsa corneal de ratón y xenoinjertos de tumor. Véase, por ejemplo, Kuo *et al.*, PNAS 2001, 98: 4605-4610.

15 Los mutantes de MT-SP1 se prepararon mediante QuikChange PCR (Stratagene) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En la Tabla 10 se proporciona una lista no limitante de una diversidad de polipéptidos de MT-SP1 mutantes resultantes (muteína) y sus números de CB correspondientes se proporcionan en la Tabla 11. Los restos de tipo silvestre de MT-SP1, identificados usando numeración de quimotripsina, se proporcionan en la columna de la izquierda y los mutantes del MT-SP1 se proporcionan en la columna de la derecha. Asp60b y Arg60c son parte de  
20 una inserción en MTSP que no está presente en quimotripsina, por lo tanto, todos los restos en este bucle se asignan al resto 60 con numeración de quimotripsina.

**Tabla 10 Construcciones de muteína de MT-SP1**

<b>Resto de MT-SP1 de tipo silvestre (numeración de quimotripsina)</b>	<b>Resto de Muteína de Reemplazo</b>
Asp60b	Ala, Arg, Ile, Phe
Arg60c	Ala, Asp, Ile, Phe, Trp
Phe97	Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Trp
Phe99	Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Tyr, Trp, Val
Tyr146	Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Phe, Trp
Leu172	Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Phe
Gln175	Ala, Arg, Asp, Glu, Phe, Val
Met180	Ala, Arg, Glu, Tyr
Gln192	Ala, Arg, Asp, Phe, Val
Trp215	Arg, Asp, Ile, Phe, Tyr
Asp217	Ala, Arg, Glu, Phe, Val
Lys224	Ala, Asp, Phe, Val

25

**Tabla 11 Muteínas de MT-SP1 marcadas mediante número CB**

CB0011	F97N	CB0061	Q192A
CB0012	F97D	CB0062	Q192V
CB0013	97E	CB0063	Q192D
CB0014	F99Y	CB0064	Q192R
CB0015	F99W	CB0065	Q192F
CB0016	Y146F	CB0066	K224A
CB0017	L172N	CB0067	K224F
CB0018	L172D	CB0068	K224V
CB0019	L172E	CB0069	K224D
CB0020	Q175D	CB0070	M180E
CB0021	Q175E	CB0071	M180Y

CB0022	D217A	CB0072	M180R
CB0023	D217V	CB0073	M180A
CB0024	D217F	CB0074	D60bl
CB0031	F97A	CB0075	D60bF
CB0032	F97W	CB0076	D60bR
CB0033	F97R	CB0077	D60bA
CB0034	F99N	CB0078	R60cl
CB0035	F99D	CB0079	R60cF
CB0036	F99E	CB0080	R60cD
CB0037	F99A	CB0081	R60cA
CB0038	F99V	CB0082	R60cW
CB0039	F99R	CB0083	L172D/Q175D
CB0040	Y146N	CB0150	F99V/L172D
CB0041	Y146D	CB0151	F99V/L172D/Q175d
CB0042	Y146E	CB0152	F99V/K224F
CB0043	Y146A	CB0153	F99V/M180e
CB0044	Y146w	CB0154	F99V/Y146D
CB0045	Y146R	CB0155	Y146D/K224F
CB0046	L172A	CB0156	Y146D/M180E
CB0047	L172V	CB0157	Y146D/L172D/Q175D
CB0048	L172F	CB0158	F99V/Y146D/L172D/Q175D
CB0049	L172R	CB0159	F99I/L172D/Q175D
CB0050	Q175A	CB0160	F99L/L172D/Q175D
CB0051	Q175V	CB0161	F99T/L172d/Q175D
CB0052	Q175F	CB0162	F99A/L172D/Q175D
CB0053	Q175R	CB0173	F99I/K224F
CB0054	D217E	CB0174	F99L/K224F
CB0055	D217F	CB0175	F99T/K224F
CB0056	W215F	CB0176	F99V/Y146D/K224F
CB0057	W215Y	CB0177	F99I/Y146D/K224F
CB0058	W215I	CB0178	F99L/Y146D/K224F
CB0059	W215D	CB0179	F99T/146D/K224F
CB0060	W215R		

5 En la Tabla 11, se identifican mutaciones usando el sistema de numeración de quimotripsina. Por tanto, W215Y significa que un triptófano en la posición 215 de MT-SP1 de acuerdo con el sistema de numeración de quimotripsina se cambia a una tirosina en esa posición.

10 En cualquier realización dada, un polipéptido de MT-SP1 mutado ("muteína") puede contener una mutación única por polipéptido o puede contener dos o más restos mutados por polipéptido, en cualquier combinación. Los reemplazos ilustrativos de restos de tipo silvestre se proporcionan en la Tabla 10. En una realización ilustrativa, un resto de Leu en la posición 172 se reemplaza con un resto de Asp, en el que la muteína se denomina L172D. En otra realización ilustrativa, un resto de Asp60b se reemplaza por uno de Ala, Arg, Ile o Phe. En una realización ilustrativa adicional una MT-SP1 variante incluye al menos uno de Y146F, L172D, N175D y D217F y puede contener dos, tres, cuatro o más reemplazos de tales residuos.

### Expresión y purificación de muteínas de MT-SP1

En una realización, la proteasa se expresa en una forma activa. En otra realización, la proteasa se expresa en una forma inactiva de zimógeno. En una realización, la proteasa se expresa mediante un sistema de expresión heterólogo tal como un sistema de expresión de *E. coli*, *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae* o baculovirus. En una realización preferida, la proteasa se expresa en un sistema de expresión de cultivo de células de mamífero. Los cultivos de mamífero ilustrativos se obtienen a partir de células de rata, ratón o preferentemente humanas. La proteína se puede expresar en un entorno intracelular o excretarse (secretarse) en el medio. La proteasa también se puede expresar en un sistema de expresión *in vitro*.

Para purificar proteasas de MT-SP1 variantes, se puede usar cromatografía en columna. La proteasa se puede someter a ingeniería genética para contener una etiqueta 6-His para purificación en una columna de Níquel. Dependiendo del pI de la proteasa, se puede usar una columna de intercambio catiónico o aniónico en el método de purificación para la proteasa. La purificación también se puede conseguir a través de inmunoabsorción, filtración en gel o cualquier otro método de purificación usado en la técnica. La proteasa se puede almacenar en un tampón de pH bajo que minimiza su actividad catalítica de forma que la misma no se degrade así misma. Esto se ilustra adicionalmente en el Ejemplo 2.

### Síntesis de bibliotecas para caracterización de muteínas de MT-SP1

Los expertos en la materia reconocerán que se pueden usar muchos métodos para preparar los péptidos y las bibliotecas de la invención. Las realizaciones adecuadas se ilustran adicionalmente en el Ejemplo 3.

### Determinación de cambios de especificidad para muteínas de MT-SP1

Los aminoácidos esenciales en las muteínas de MT-SP1 generada usando los métodos de la presente invención se identifican de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de saturación de restos de sitio activo o se divulgan en el presente documento. En una técnica, los restos que forman los bolsillos S1-S4 que se ha demostrado que son determinantes importantes de especificidad se mutan a cada aminoácido posible, solos o en combinación. Véase, por ejemplo, Legendre, *et al.*, JMB (2000) 296: 87-102. Las especificidades de sustrato de los mutantes resultantes se determinarán usando bibliotecas de exploración posicional ACC y mediante ensayos cinéticos de sustrato único. Véase, por ejemplo, Harris, *et al.* PNAS, 2000, 97: 7754-7759.

Se realizan múltiples sustituciones de aminoácidos y se ensayan usando métodos conocidos de mutagénesis y exploración, tales como los que se divulgan en el presente documento o los ya conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Reidhaar-Olson y Sauer 1988 Science 241: 53-57 o Bowie y Sauer 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156. En resumen, estos autores divulgan métodos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar polipéptido funcional y después secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permitibles en cada posición. Otros métodos que se pueden usar incluyen métodos en base a presentación en fago (por ejemplo, Legendre *et al.*, JMB 2000: 296: 87-102; Lowman *et al.*, Biochem. 30: 10832-10837, 1991; Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.223.409; Huse, Publicación PCT WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a región (Derbyshire *et al.*, Gene 46: 145, 1986; Ner *et al.*, DNA 7: 127, 1988).

Los métodos de mutagénesis como se divulgan anteriormente se pueden combinar con métodos de exploración de alto rendimiento automatizados para detectar la actividad de polipéptidos clonados mutagenizados en células hospedadoras. Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican proteínas proteolíticamente activas o precursores de las mismas se recuperan a partir de las células hospedadoras y se secuencian rápidamente usando equipo moderno. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de restos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

En una realización, se usa presentación en fago de proteasa para explorar las bibliotecas de proteasas mutantes de la invención para determinar afinidades diversas a secuencias sustrato específicas como se describe en la técnica. Véase, por ejemplo, Legendre *et al.*, JMB, 2000: 296: 87-102 y Corey *et al.*, Gene, 1993 Jun 15; 128(1): 129-34.

La invención también proporciona métodos para detectar y cuantificar una proteasa enzimáticamente activa de la invención. El método incluye: (a) poner en contacto una muestra con una proteasa, de una manera tal que el resto fluorogénico se libera de la secuencia sustrato peptídica tras la acción de la proteasa, produciendo de ese modo un resto fluorescente; y (b) observar si la muestra experimenta un cambio detectable en fluorescencia, siendo el cambio detectable un indicio de la presencia de la proteasa enzimáticamente activa de la muestra.

En una realización, estos métodos se usan para seleccionar una muteína de MT-SP1 que escinde específicamente una secuencia diana en VEGF o VEGFR y preferentemente para una proteasa enzimáticamente activa. En otra realización, estos métodos se usan para determinar la especificidad de secuencia de una muteína de MT-SP1. Los métodos adecuados para determinar especificidad de muteína de MT-SP1 se ilustran adicionalmente en los Ejemplos 3-S.

Los métodos ilustrados en los Ejemplos 1-5 se pueden repetir de forma iterativa o en paralelo para crear una proteasa variante que tiene la especificidad y selectividad deseada en cada uno de los subsitios de unión extendidos, P2, P3 y P4. En algunos casos, las mutaciones en serina proteasas han demostrado que cada uno de los subsitios que forman el sitio activo (S1-S4) funcionan independientemente los unos de los otros, de forma que la modificación de especificidad en un subsitio tiene poca influencia sobre la especificidad en subsitios adyacentes. Por tanto, la ingeniería genética de especificidad de sustrato y selectividad a través del sitio de unión extendido se puede conseguir de una manera gradual.

Las proteasas mutantes que coinciden con los perfiles de especificidad deseados, determinados mediante bibliotecas de sustrato, después se ensayan usando sustratos peptídicos individuales que corresponden a la secuencia de escisión deseada. Las proteasas variantes también se ensayan para determinar que ellas escindirán la secuencia deseada cuando se presente en el contexto de proteínas de longitud completa. La actividad de la proteína diana también se ensaya para verificar que su función se ha destruido mediante el acontecimiento de escisión. El acontecimiento de escisión se supervisa mediante SDS-PAGE después de incubar la proteína de longitud completa purificada con la proteasa variante. En otra realización, las mutaciones se combinan para adquirir la especificidad de múltiples proteasas. Una mutación en un resto de un armazón, que produce especificidad en un sitio, se combina en la misma proteasa con otra mutación en otro sitio en el armazón para preparar una proteasa de especificidad combinada.

Se puede usar cualquier número de mutaciones en sitios específicos en el mismo armazón para crear una proteasa de especificidad combinada. En una realización, el armazón de MT-SP1 comprende un polipéptido que tiene una identidad del 95% con la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de MT-SP1 de SEC ID N°: 1 y el polipéptido tiene al menos una mutación en una o más de las posiciones 171, 174, 180, 215, 192, 218, 99, 57, 189, 190, 226, 146, 172, 175, 41, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 97, 98, 100, 102, 151, 169, 170, 171 A, 173, 176, 177, 178, 179, 181, 191, 195 ó 224 ó 217, en las que la numeración es para quimotripsina.

Estos sitios pertenecen a los siguientes bolsillos S:

S1': 146, 151,  
 S1: 189, 190, 226, 191, 195  
 S2: 99, 41, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 97, 98, 100, 102  
 S3: 192, 218, 146  
 S4: 171, 174, 179, 180, 215, 99, 172, 175, 97, 98, 169, 170, 171 A, 173, 176, 177, 178, 181, 224, 217

En una realización ilustrativa, la muteína es L172D que comprende leucina reemplazada con ácido aspártico en la posición 172. En otra realización, la muteína es Y146F que comprende tirosina reemplazada con fenilalanina en la posición 146. En otra realización, la muteína es N175D que comprende asparagina reemplazada con ácido aspártico en la posición 175. En otra realización, la muteína es D217F que comprende ácido aspártico reemplazado con fenilalanina en la posición 217. En una realización, al menos un resto se reemplaza en comparación con la secuencia polipeptídica de tipo silvestre de MT-SP1 de SEC ID N°: 1. En el presente documento se proporcionan muteínas de MT-SP1 no limitantes contempladas adicionales.

Las proteínas dirigidas para escisión e inactivación se pueden identificar mediante los siguientes criterios: 1) la proteína está implicada en patología; 2) existe una evidencia marcada de que la proteína es un punto crítico de intervención para tratar la patología; 3) la escisión proteolítica de la proteína destruirá probablemente su función. Mediante estos criterios, VEGF y los VEGFR son dianas excelentes para terapias mediadas por proteasas de la invención. Los sitios de escisión dentro de proteínas diana se identifican mediante los siguientes criterios: 1) los mismos se localizan en las superficie expuesta de la proteína; 2) los mismos se localizan en regiones que están desprovistas de estructuras secundarias (es decir no en láminas  $\beta$  o hélices  $\alpha$ ), determinado mediante estructura atómica o algoritmos de predicción de estructura (estas regiones tienden a ser bucles en la superficie de proteínas o troncos en los receptores de la superficie celular); o 3) los mismos se localizan en sitios que probablemente inactivan la proteína, en base a su función conocida. Las secuencias de escisión tienen, por ejemplo, cuatro restos de longitud para coincidir con la especificidad de sustrato extendida de muchas serina proteasas, pero pueden ser más largas o más cortas.

En una realización de la invención, se usa catálisis asistida por proteína diana para generar proteasas específicas de una proteína VEGF o VEGFR diana. Una mutación única en el sitio de unión de secuencia sustrato de la proteasa puede alterar su especificidad y provocar que la misma tenga un cambio en la especificidad de secuencia sustrato. Por tanto, la especificidad de secuencia sustrato se puede alterar usando una o únicamente un pequeño número de mutaciones.

Usando los métodos divulgados anteriormente, un experto en la materia puede identificar y/o preparar una diversidad de polipéptidos que son sustancialmente homólogos a un armazón de proteasa o variantes alélicas del mismo y que conserva la actividad de proteólisis del armazón de proteína de tipo silvestre pero difiere del mismo en especificidad. En una realización, estos polipéptidos se basan en la secuencia de aminoácidos de armazón de MT-

SP1. Tales polipéptidos pueden incluir opcionalmente un resto de dirección que comprende restos de aminoácidos adicionales que forman un dominio de unión de plegamiento independiente. Tales dominios incluyen, por ejemplo, un dominio de ligando extracelular (por ejemplo, uno o más dominios de fibronectina de tipo III) de un receptor de citoquina; dominios de inmunoglobulina; dominios de unión a ADN (véase, por ejemplo, He *et al.*, Nature 378:92-96,1995); etiquetas de afinidad; y similares. Tales polipéptidos también pueden incluir segmentos polipeptídicos adicionales como se ha divulgado en general anteriormente.

### Polipéptidos de proteasa

Las muteínas de proteasa y bibliotecas de proteasa de la invención incluyen polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de una o más de las proteasas descritas en el presente documento. La invención también proporciona proteasas mutantes o variantes que, con relación a MT-SP1, tienen restos diferentes de los restos correspondientes de MT-SP1, mientras que mantienen su actividad de proteasa y sus funciones fisiológicas y fragmentos funcionales de las mismas. En una realización preferida, las mutaciones en las muteínas de MT-SP1 de la invención se producen en las regiones S1-S4 de la proteasa como se detalla en el presente documento.

En general, una variante de proteasa que conserva la función similar a proteasa incluye cualquier variante en la que los restos en una posición particular en la secuencia se han sustituido por otros aminoácidos e incluyen además variantes producidas, con relación a la secuencia de proteína de tipo silvestre o precursora, mediante la inserción de un resto adicional o restos entre dos restos de la proteína precursora así como mediante la supresión de uno o más restos de la secuencia precursora. Cualquier sustitución, inserción o supresión de aminoácidos se contempla por los métodos, muteínas y bibliotecas de muteínas de la invención. En circunstancias favorables, la sustitución es una sustitución conservativa, como se ha descrito anteriormente.

Un aspecto de la invención se refiere a proteasas aisladas y partes biológicamente activas de las mismas, así como a derivados, fragmentos, análogos u homólogos de las mismas. También se proporcionan fragmentos polipeptídicos adecuados para su uso como inmunógenos para generar anticuerpos anti-proteasa. En una realización, las proteasas de la invención se producen mediante técnicas de ADN recombinante. Como una alternativa a la expresión recombinante, se puede sintetizar una proteína o polipéptido de proteasa químicamente usando técnicas de síntesis peptídica convencionales, como se ha descrito anteriormente.

Las partes biológicamente activas de las proteínas de proteasa incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácido homólogas u obtenidas partir de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de proteasa de longitud completa, pero con menos aminoácidos que las proteínas de proteasa de longitud completa y que muestran al menos una actividad de la proteína de proteasa de longitud completa. Típicamente, las partes biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la proteína de proteasa. Una parte biológicamente activa de una proteína de proteasa es un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 o más restos de aminoácidos de longitud y creciente en longitud de aminoácidos en números enteros completos de uno (1), hasta una longitud de 855 aminoácidos, en el que la MT-SP1 de longitud completa de tipo silvestre se considera que tiene 855 aminoácidos de longitud (SEC ID N°: 1) y madura tiene menos de 855 aa de longitud. En general, un "fragmento" o una "parte" de un polipéptido contiene al menos un resto de aminoácido menos que el polipéptido de longitud completa. El uno o más aminoácidos suprimidos se puede eliminar del extremo N, el extremo C o una parte interna.

Además, otras partes biológicamente activas de una proteína, de la que se han suprimido otras regiones de la proteína, se pueden preparar mediante técnicas recombinantes y evaluarse para una o más de las actividades funcionales de una proteasa nativa.

En una realización, la proteasa tiene una secuencia de aminoácidos de MT-SP1 o uno de los mutantes del armazón de MT-SP1. Por tanto, la proteína de proteasa es sustancialmente homóloga a MT-SP1 o una de sus muteínas y conserva la actividad funcional de MT-SP1, aunque difiere en la secuencia de aminoácidos debido a variación alélica natural o mutagénesis y puede diferir en especificidad, como se ha descrito en el presente documento. Las muteínas de MT-SP1 representativas se divulgan en las Tablas 10 y 11 en el presente documento.

### Determinación de homología entre dos o más secuencias

Para determinar el porcentaje de homología de dos secuencias de aminoácido o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir huecos en las secuencias de una primera secuencia de aminoácido o de ácido nucleico para alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácido o ácido nucleico). Después se comparan los restos de aminoácido o nucleótido en posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son homólogas en esa posición (es decir, como se usa en el presente documento "homología" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "identidad" de aminoácido o ácido nucleico).

La homología de secuencia de ácido nucleico o de aminoácido se puede determinar como el grado de identidad entre dos secuencias. La homología se puede determinar usando programas informáticos conocidos en la técnica, tales como software GAP proporcionado en el paquete de programas GCG. Véase, Needleman y Wunsch, 1970. J Mol Biol 48: 443-453. Mediante el uso del software de GAP de GCG con los siguientes ajustes para comparación de secuencias de ácido nucleico: penalización de creación de HUECO de 5,0 y penalización de extensión de HUECO de 0,3, la región codificante de las secuencias de ácido nucleico análogas a las que se hace referencia anteriormente muestran un grado de identidad preferentemente de al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o el 99%.

El término "identidad de secuencia" se refiere al grado en el que dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas son idénticas en base a resto-por-resto a lo largo de una región particular de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente a lo largo de esa región de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U o I, en el caso de ácido nucleico) en ambas secuencias para producir el número de posiciones iguales, dividiendo el número de posiciones iguales entre el número total de posiciones en la región de comparación (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial" como se usa en el presente documento indica una característica de una secuencia polinucleotídica, en la que el polipéptido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 por ciento, preferentemente una identidad de al menos el 85 por ciento y con frecuencia una identidad de secuencia del 90 al 95 por ciento, más habitualmente una identidad de secuencia de al menos el 99 por ciento en comparación con una secuencia de referencia a lo largo de una región de comparación.

#### *Proteínas quiméricas y de fusión*

La invención también proporciona proteínas quiméricas o de fusión de proteasa. Como se usa en el presente documento, una "proteína quimérica" de proteasa o "proteína de fusión" comprende un polipéptido de proteasa unido operativamente a un polipéptido no proteasa. Un "polipéptido de proteasa" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a uno de los armazones tales como MT-SP1 descritos en el presente documento o uno de los mutantes del armazón de MT-SP1, mientras que un "polipéptido no proteasa" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a una proteína que no es sustancialmente homóloga a uno de los armazones, por ejemplo, una proteína que es diferente del armazón y que se obtiene a partir del mismo organismo o de un organismo diferente. Dentro de una proteína de fusión de proteasa, el polipéptido de proteasa puede corresponder a toda o una parte de una proteína de proteasa precursora o de armazón. En una realización, una proteína de fusión de proteasa comprende al menos una parte biológicamente activa de una proteína de proteasa. En otra realización, una proteína de fusión de proteasa comprende al menos dos partes biológicamente activas de una proteína de proteasa. En otra realización, una proteína de fusión de proteasa comprende al menos tres partes biológicamente activas de una proteína de proteasa. Dentro de la proteína de fusión, el término "unido operativamente" tiene por objeto indicar que el polipéptido de proteasa y el polipéptido no proteasa están fusionados en fase el uno con el otro. El polipéptido no proteasa se puede fusionar en el extremo N o extremo C del polipéptido de proteasa.

En una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión de proteasa GST en la que las secuencias de proteasa están fusionadas en el extremo N de las secuencias de GST (glutación S-transferasa). Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de polipéptidos de proteasas recombinantes.

En otra realización, la proteína de fusión es una fusión Fc en la que las secuencias de proteasa están fusionadas al extremo N del dominio Fc de inmunoglobulina G. Tales proteínas de fusión pueden tener mejores propiedades farmacodinámicas *in vivo*.

En otra realización, la proteína de fusión es una proteína de proteasa que contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N. En determinadas células hospedadoras (por ejemplo, células hospedadoras de mamífero), la expresión y/o secreción de proteasas se puede aumentar mediante el uso de una secuencia señal heteróloga.

Una proteína quimérica o de fusión de proteasa de la invención se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican las secuencias polipeptídicas diferentes se ligan juntos en fase de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, mediante el empleo de extremos romos o escalonados para ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, llenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento de fosfatasa alcalina para evitar unión indeseable y ligamiento enzimático. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos génicos se puede llevar a cabo usando cebadores de anclaje que dan origen a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que se pueden hibridar posteriormente y reamplificar para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Adicionalmente, muchos vectores de expresión están disponibles en el mercado que codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Se puede clonar un ácido nucleico que codifica proteasa en un vector de expresión de este tipo de forma que el resto de fusión esté

enlazado en fase a la proteína de proteasa.

#### *Agonistas y antagonistas de proteasa*

5 La invención también se refiere a variantes de las proteínas de proteasa que funcionan como agonistas de proteasa (es decir miméticos) o como antagonistas de proteasa. Las variantes de las proteínas de proteasa se pueden generar mediante mutagénesis (por ejemplo, mutación puntual específica o truncamiento de la proteína de proteasa). Un agonista de la proteína de proteasa conserva sustancialmente la misma o un subgrupo de las actividades biológicas de la forma de origen natural de la proteína de proteasa. Por ejemplo, una proteasa agonista activa una proteína diana (por ejemplo, un receptor de superficie celular) escindiendo una secuencia sustrato dentro de la proteína. Un antagonista de la proteína de proteasa puede inhibir una o más de las actividades de la forma de origen natural de la proteína de proteasa, por ejemplo, escindiendo la misma proteína diana que la proteína de proteasa. Por tanto, los efectos biológicos específicos se pueden provocar mediante tratamiento con una variante de función limitada. En una realización, el tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subgrupo de las actividades biológicas de la forma de origen natural de la proteína tiene menos efectos secundarios en un sujeto con relación al tratamiento con la forma de origen natural de la proteína de proteasa.

#### **Terapia de proteasa en combinación con agentes anti-cáncer**

20 La señalización mediante el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores está implicada en la angiogénesis patológica y el desarrollo rápido de vasculatura tumoral en cáncer. Los fármacos que bloquean esta ruta de señalización evitan el crecimiento y el mantenimiento del suministro sanguíneo del tumor y conducen a la muerte sistemática del tumor. El éxito reciente del anticuerpo anti-VEGF AVASTIN™ en pacientes con cáncer de colon metastásico ha validado VEGF como una diana para terapia anti-angiogénica de cáncer. A pesar de estos resultados alentadores, la progresión tumoral ha continuado ocurriendo a pesar del tratamiento anti-VEGF. Los mecanismos de la influencia de los anticuerpos sobre la función de VEGF y cómo el anticuerpo impide el crecimiento del tumor se desconocen. Los experimentos de volteo (“knock-down”) muestran que el bloqueo de la función de VEGF bloquea la angiogénesis. Por tanto la inhibición de la señalización angiogénica a través de VEGFR-2 representa un área terapéutica no desarrollada ideal para el desarrollo de proteasas sometidas a ingeniería genética con dirección novedosa.

Debido a su naturaleza catalítica y tamaño más pequeño, las proteasas producidas por ingeniería genética prometen un nuevo tratamiento terapéutico con ventajas con relación a las proteínas de unión dirigidas competidoras. Las ventajas esperadas incluyen, pero sin limitación: mejor penetración tumoral, mejor saturación diana, eficacia más elevada y potencialmente dosificación más baja. En particular, debido a que se une, hidroliza y libera, una proteasa única podría escindir e inactivar cientos a miles de receptores de VEGF sustrato, ofreciendo una amplificación terapéutica sustancial.

En una realización, se proporciona el tratamiento de una patología, tal como un cáncer, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita cantidades terapéuticamente eficaces de una proteasa que escinde específicamente e inactiva la señalización del complejo VEGF/VEGFR-2, tal como proteasa MT-SP1 o una muteína de MT-SP1 descrita en el presente documento, que se administra sola o en combinación con al menos un agente anti-cáncer. La terapia anti-angiogénica ha demostrado ser satisfactoria frente tanto a cánceres sólidos como a malignidades hematológicas. Véase, por ejemplo, Ribatti *et al.* 2003 J Hematother Stem Cell Res. 12(1), 11-22. Por lo tanto, las composiciones de la invención proporcionadas como terapia anti-angiogénica facilitarán el tratamiento de malignidades tanto hematológicas como de tejido sólido. Las composiciones y métodos de tratamiento proporcionados en la invención se pueden administrar solos o en combinación con cualquier otro tratamiento anti-cáncer apropiado conocido por un experto en la materia. Por ejemplo, MT-SP1 y las muteínas de MT-SP1 de la invención se pueden administrar en combinación con o en lugar de AVASTIN™ en cualquier terapia en la que la administración de AVASTIN™ proporciona beneficio terapéutico.

En una realización, el agente anti-cáncer es al menos un agente quimioterapéutico. En una realización relacionada, la administración de la proteasa es en combinación con al menos una radioterapia. La administración de la terapia de combinación atenuará la señal angiogénica y creará una combinación del receptor soluble que reduce los niveles de VEGF libres. En una realización específica, una proteasa MT-SP1 variante de la invención tiene una especificidad *in vitro* que coincide con una región crítica del receptor, el tronco Flk-1/KDR, a lo largo de una región de seis aminoácidos.

El polipéptido de muteína de MT-SP1 de la invención se puede administrar en una composición que contiene más de un agente terapéutico. Los agentes terapéuticos pueden ser, por ejemplo, radionúclidos terapéuticos, fármacos, hormonas, antagonistas de hormonas, antagonistas de receptores, enzimas o proenzimas activadas por otro agente, autocrinas, citoquinas o cualquier agente anti-cáncer adecuado conocido por los expertos en la materia. En una realización, el agente anti-cáncer administrado en conjunto con el MT-SP1 o muteína de MT-SP1 es AVASTIN™. También se pueden usar toxinas en los métodos de la presente invención. Otros agentes terapéuticos útiles en la presente invención incluyen anti-ADN, anti-ARN, oligonucleótidos marcados radiactivamente, tales como oligonucleótidos antisentido, agentes citotóxicos o antimicrobianos, antiproteína y anticromatina. Otros agentes



terapéuticos se conocen por los expertos en la materia y el uso de tales agentes terapéuticos diferentes de acuerdo con la presente invención se contempla específicamente.

5 El agente antitumoral puede ser uno de numerosos agentes quimioterapéuticos tales como un agente alquilante, un antimetabolito, un agente hormonal, un antibiótico, un anticuerpo, un anti-cáncer biológico, Gleevec, colchicina, un alcaloide de vinca, L-asparaginasa, procarbazona, hidroxiaurea, mitotano, nitrosoureas o una imidazol carboxamida. Los agentes adecuados son aquellos agentes que promueven la despolarización de tubulina o prohíben la proliferación de células tumorales. Los agentes quimioterapéuticos contemplados dentro del alcance de la invención incluyen, pero sin limitación, agentes anti-cáncer enumerados en el Orange Book of Approved Drug Products With  
10 Therapeutic Equivalence Evaluations, recopilado por la Administración de Alimentos y Fármacos del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. Además de los agentes quimioterapéuticos anteriores, las proteasas MT-SP1 de la invención también se pueden administrar junto con tratamiento de terapia de radiación. Los tratamientos adicionales conocidos en la técnica se contemplan como que están dentro del alcance de la invención.

15 El agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos se conocen en la técnica e incluyen al menos los taxanos, mostazas de nitrógeno, derivados de etilenimina, alquilsulfonatos, nitrosoureas, triazenos; análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, alcaloides de vinca, antibióticos, enzimas, complejos de coordinación de platino, urea sustituida, derivados de metilhidrazina, supresores o antagonistas adrenocorticales. Más específicamente, los agentes quimioterapéuticos pueden ser uno o más  
20 agentes elegidos entre el grupo no limitante de esteroides, progestinas, estrógenos, anti-estrógenos o andrógenos. Aún más específicamente, los agentes quimioterapéuticos pueden ser azaribina, bleomicina, briostatina-1, busulfan, carmustina, clorambucilo, cisplatino, CPT-11, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, dexametasona, dietilestilbestrol, doxorubicina, etinil estradiol, etopósido, fluorouracilo, flouximesterona, gemcitabina, caproato de hidroxiprogesterona, hidroxiaurea, L-asparaginasa, leucovorina, lomustina, mecloretamina, acetato de medroprogesterona, acetato de megestrol, melfalan, mercaptopurina, metotrexato, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitotano, fenil butirato, prednisona, procarbazona, semustina estreptozocina, tamoxifeno, taxanos, taxol, propionato de testosterona, talidomida, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinblastina o vincristina. El uso de cualquier combinación de agentes quimioterapéuticos también se contempla. La administración del agente quimioterapéutico puede ser antes, durante o después de la administración del MT-SP1 o del polipéptido de miteína  
30 de MT-SP1.

Otros agentes terapéuticos adecuados para su uso en combinación o para administración conjunta con las proteasas de la invención se seleccionan entre el grupo que consiste en isótopos radiactivos, sumando de boro, inmunomodulador, toxina, agente o colorante fotoactivo, fármaco quimioterapéutico para el cáncer, fármaco antiviral,  
35 fármaco antifúngico, fármaco antibacteriano, fármaco antiprotzoario y agente quimiosensibilizante (Véanse, las Patentes de Estados Unidos N° 4.925.648 y 4.932.412). Los agentes quimioterapéuticos adecuados se describen, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19ª Ed. (Mack Publishing Co. 1995) y en Goodman and Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS (Goodman *et al.*, Eds. Macmillan Publishing Co., New York, ediciones de 1980 y 2001). Otros agentes quimioterapéuticos adecuados, tales como fármacos experimentales, se conocen por los expertos en la materia. Además un isótopo radiactivo terapéutico adecuado se selecciona entre el grupo que consiste en emisores  $\alpha$ , emisores  $\beta$ , emisores  $\gamma$ , emisores de electrones de Auger, agentes de captura de neutrones que emiten partículas  $\alpha$  e isótopos radiactivos que se desintegran mediante captura de electrones. Preferentemente, el isótopo radiactivo se selecciona entre el grupo que consiste en  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{10}\text{B}$  y  $^{211}\text{At}$ .  
45

Cuando se usa más de un agente terapéutico en combinación con las proteasas de la invención, los mismos pueden ser de la misma clase o tipo o pueden ser de clases o tipos diferentes. Por ejemplo, los agentes terapéuticos pueden comprender radionúclidos diferentes o un fármaco y un radionúclido.

50 En otra realización, isótopos diferentes que son eficaces en distancias diferentes como un resultado de sus emisiones de energía individuales se usan como primer y segundo agentes terapéuticos en combinación con las proteasas de la invención. Tales agentes se pueden usar para conseguir tratamientos más eficaces de tumores y son útiles en pacientes que presentan múltiples tumores de tamaños diferentes, al igual que en circunstancias clínicas normales.

55 Pocos de los isótopos disponibles son útiles para tratar los depósitos tumorales más pequeños y células únicas. En estas situaciones, un fármaco o toxina puede ser un agente terapéutico más útil para administración conjunta con una proteasa de la invención. Por consiguiente, en algunas realizaciones de la presente invención, se usan isótopos en combinación con especies no isotópicas tales como fármacos, toxinas y agentes de captura de neutrones y se administran en conjunto con una proteasa de la invención. Muchos fármacos y toxinas se conocen que tienen efectos citotóxicos sobre las células y se pueden usar en combinación con las proteasas de la presente invención. Los mismos se encuentran en compendios de fármacos y toxinas, tales como el Merck Index, Goodman y Gilman y similares y en las referencias citadas anteriormente.

65 Los fármacos que interfieren con la síntesis de proteína intracelular también se pueden usar en combinación con una proteasa en los métodos terapéuticos de la presente invención; tales fármacos se conocen por los expertos en la

materia e incluyen puromicina, cicloheximida y ribonucleasa.

Los métodos terapéuticos de la invención se pueden usar para terapia del cáncer. Se conoce bien que los isótopos radiactivos, fármacos y toxinas se pueden conjugar a anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a marcadores que se producen por o están asociados con células cancerosas y que tales conjugados de anticuerpo se pueden usar para dirigir los isótopos radiactivos, fármacos o toxinas a sitios tumorales para potenciar su eficacia terapéutica y minimizar los efectos secundarios. Los ejemplos de estos agentes y métodos se revisan en Wawrzynczak y Thorpe (en *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*, L. M. Franks y N. M. Teich, eds, Chapter 18, págs. 378-410, Oxford University Press, Oxford, 1986), en *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel, ed., 3-300, Oxford University Press, N.Y., 1987), en Dillman, R. O. (*CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology* 1:357, CRC Press, Inc., 1984), en Pastan *et al.* (*Cell* 47:641, 1986), en Vitetta *et al.* (*Science* 238:1098-1104, 1987) y en Brady *et al.* (*Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 13:1535-1544, 1987). Otros ejemplos del uso de inmunoconjugados para cáncer y otras formas de terapia se han divulgado, entre otros, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.331.647, 4.348.376, 4.361.544, 4.468.457, 4.444.744, 4.460.459, 4.460.561, 4.624.846, 4.818.709, 4.046.722, 4.671.958, 4.046.784, 5.332.567, 5.443.953, 5.541.297, 5.601.825, 5.635.603, 5.637.288, 5.677.427, 5.686.578, 5.698.178, 5.789.554, 5.922.302, 6.187.287 y 6.319.500.

Adicionalmente, los métodos de tratamiento de la invención incluyen aquellos en los que una proteasa de la invención se usa con otros compuestos o técnicas para prevenir, mitigar o revertir los efectos secundarios de determinados agentes citotóxicos. Los ejemplos de tales combinaciones incluyen, por ejemplo, administración de IL-1 junto con un anticuerpo para eliminación rápida, como se describe por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.624.846. Tal administración se puede realizar de 3 a 72 horas después de la administración de un tratamiento terapéutico primario con una muteína de MT-SP1 en combinación con un agente anti-cáncer (por ejemplo, con un isótopo radiactivo, fármaco o toxina como el componente citotóxico). Esto se puede usar para potenciar la eliminación del conjugado, fármaco o toxina de la circulación y para mitigar o revertir la toxicidad mieloide y otra toxicidad hematopoyética provocada por el agente terapéutico.

En un aspecto de la invención y como se ha indicado anteriormente, la terapia puede implicar una combinación de más de un agente tumoricida, por ejemplo, un fármaco y un isótopo radiactivo o un isótopo radiactivo y un agente de Boro-10 para terapia activada de neutrones o un fármaco y un modificador de la respuesta biológica o un conjugado de molécula de fusión y modificador de la respuesta biológica. La citoquina se puede integrar en un régimen terapéutico de este tipo para maximizar la eficacia de cada componente del mismo.

De forma similar, determinados anticuerpos anti-leucémicos y anti-linfoma conjugados con isótopos radiactivos que son emisores  $\beta$  o  $\alpha$  pueden incluir efectos secundarios mieloides y hematopoyéticos de otro tipo cuando estos agentes no se dirigen únicamente a las células tumorales. Esto se observa particularmente cuando las células tumorales están en la circulación y en los órganos de formación de sangre. La administración conjunta y/o posterior de al menos una citoquina hematopoyética (por ejemplo, factores del crecimiento, tales como factores estimulantes de colonias, tales como G-CSF y GM-CSF) se prefiere para reducir o aliviar los efectos secundarios hematopoyéticos, a la vez que se aumentan los efectos anti-cancerosos.

Se conoce bien en la técnica que se pueden usar diversos métodos de terapia de radionúclido para el tratamiento de cáncer y otras afecciones patológicas, como se describe, por ejemplo, en Harbert, "Nuclear Medicine Therapy", New York, Thieme Medical Publishers, 1087, págs. 1-340. Un médico con experiencia en estos procedimientos será capaz de adaptar fácilmente la terapia adyuvante de citoquina descrita en el presente documento a tales procedimientos para aliviar cualquier efecto secundario hematopoyético de los mismos. De forma similar, la terapia con fármacos citotóxicos, administrados en conjunto con MT-SP1 o una muteína de MT-SP1, se pueden usar, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer, enfermedades infecciosas o autoinmunes y para terapia de rechazo de órgano. Tal tratamiento se rige por principios análogos a la terapia de isótopo radiactivo con isótopos o anticuerpos marcados radiactivamente. Por tanto, el médico experto será capaz de adaptar la descripción del uso de citoquina para aliviar la supresión de la médula y otros efectos secundarios hematopoyéticos mediante la administración de la citoquina antes, durante y/o después de la terapia anti-cáncer primaria.

## 55 **Composiciones farmacéuticas**

La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada MT-SP1 terapéutico y otros agentes terapéuticos combinados con la proteasa se puede efectuar mediante cualquier vía apropiada incluyendo, pero sin limitación, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejidos de membrana mucosa. MT-SP1 y otros agentes terapéuticos se pueden administrar mediante la misma vía o mediante vías diferentes. Por ejemplo, MT-SP1 se puede administrar mediante inyección intravenosa mientras que el otro agente o agentes terapéuticos de la combinación se pueden administrar por vía oral. Como alternativa, por ejemplo, el otro agente o agentes terapéuticos se pueden administrar mediante inyección intravenosa. La secuencia en la que los agentes terapéuticos se administran no es estrictamente crítica.

La administración de MT-SP1 también se puede acompañar mediante la administración de los otros agentes

terapéuticos como se ha descrito anteriormente en combinación adicional con otros ingredientes biológicamente activos y terapias no farmacológicas (por ejemplo, cirugía o tratamiento de radiación) o con terapias no farmacológicas en solitario con MT-SP1. Cuando la terapia de combinación comprende además un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico se puede conducir en cualquier momento adecuado siempre y cuando se consiga un efecto beneficioso a partir de la acción conjunta de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso se consigue cuando el tratamiento no farmacológico se elimina temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, tal vez por días o incluso semanas.

Por tanto, MT-SP1 y el otro agente farmacológicamente activo se pueden administrar en un paciente simultáneamente, secuencialmente o en combinación. Si se administran secuencialmente, el tiempo entre las administraciones generalmente varía de 0,1 a aproximadamente 48 horas. Se apreciará que cuando se usa MT-SP1 con otro agente o agentes terapéuticos, los mismos pueden estar en el mismo vehículo farmacéuticamente aceptable y por lo tanto administrarse simultáneamente. Los mismos pueden estar en vehículos farmacéuticos separados tales como formas de dosificación orales convencionales que se toman simultáneamente.

Una terapia para afección angiogénica incluye MT-SP1 y AVASTIN™. En una realización, esta afección es cáncer.

Una terapia para el cáncer, inflamación, diabetes o degeneración macular incluye MT-SP1. En otra realización, esta terapia incluye además otro agente terapéutico como se ha definido anteriormente.

Las ventajas atribuidas a la administración de MT-SP1 y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico incluyen, pero sin limitación, acción conjunta farmacocinética o farmacodinámica que se produce como resultado de la combinación de agentes terapéuticos. En una realización, la acción conjunta de los agentes terapéuticos es aditiva. En otra realización, la acción conjunta de los agentes terapéuticos es sinérgica. En otra realización, la acción conjunta de los agentes terapéuticos mejora el régimen terapéutico de uno o ambos agentes.

La invención se refiere además a kits para tratar pacientes que tienen una afección angiogénica, tal como cáncer, que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de MT-SP1 para tratar o al menos aliviar parcialmente los síntomas de la afección (por ejemplo, AVASTIN™) en el mismo envase o en envases separados e instrucciones para su uso.

La presente invención es adecuada para la reducción de los síntomas del cáncer. Estos síntomas del cáncer incluyen sangre en la orina, dolor o ardor tras la micción, micción frecuente, orina turbia, dolor en hueso o inflamación alrededor del sitio afectado, fracturas óseas, debilidad, fatiga, pérdida de peso, infecciones repetidas, náuseas, vómitos, estreñimiento, problemas con la micción, debilidad o entumecimiento en las piernas, golpes y moretones que persisten, mareos, somnolencia, movimientos oculares anormales o cambios en la visión, debilidad, pérdida de la sensación en brazos o piernas o dificultades para caminar, ataques o convulsiones, cambios en la personalidad, memoria o habla, dolores de cabeza que tienden a empeorar en la mañana y a mejorar durante el día, que pueden estar acompañados por náuseas o vómitos, un bulto o engrosamiento del seno, descarga del pezón, cambio en la piel del seno, una sensación de calor o ganglios linfáticos hipertrofiados bajo el brazo, hemorragia rectal (sangre roja en las heces o heces negras), calambres abdominales, estreñimiento que alterna con diarrea, pérdida de peso, pérdida del apetito, debilidad, tez pálida, dolor sordo o dolor en la espalda o costado, bulto en área renal, algunas veces acompañado por presión arterial elevada o anomalía en el recuento de glóbulos rojos, debilidad, palidez, fiebre y síntomas similares a la gripe, moretones y hemorragia prolongada, ganglios linfáticos hipertrofiados, bazo, hígado, dolor en huesos y articulaciones, infecciones frecuentes, pérdida de peso, sudores nocturnos, sibilancias, tos persistente durante meses, esputo con estria de sangre, dolor persistente en el pecho, congestión en los pulmones, ganglios linfáticos hipertrofiados en el cuello, cambio en lunar u otro bulto en la piel, incluyendo hemorragia o cambio en el tamaño, forma, color o textura, inflamación indolora en los ganglios linfáticos en el cuello, axila o ingle, fiebre persistente, sensación de fatiga, pérdida de peso inexplicable, picazón en la piel y erupciones, pequeños bultos en la piel, dolor óseo, inflamación en el abdomen, hipertrofia de hígado o bazo, un bulto en la boca, ulceración del labio, lengua o en el interior de la boca que no sana en un par de semanas, dentaduras postizas que ya no se ajustan bien, dolor oral, hemorragia, mal aliento, dientes flojos, cambios en el habla, inflamación abdominal, hemorragia vaginal anormal, molestias digestivas, dolor abdominal superior, pérdida de peso inexplicable, dolor cerca del centro de la espalda, intolerancia de alimentos grasos, coloración amarillenta de la piel, masas abdominales, hipertrofia del hígado y bazo, dificultades para orinar debido al bloqueo de la uretra, la vejiga retiene orina, creando sensaciones frecuentes de urgencia para orinar, especialmente durante la noche, la vejiga no se vacía completamente, micción con ardor o dolor, orina sanguinolenta, sensibilidad en la vejiga, dolor sordo en la pelvis o espalda, indigestión o acidez, malestar o dolor en el abdomen, náusea y vómitos, diarrea o estreñimiento, distensión abdominal después de las comidas, pérdida del apetito, debilidad y fatiga, hemorragia, vomitar sangre o sangre en las heces, hemorragia vaginal anormal, una secreción con sangre aguada en mujeres post menopáusicas, micción dolorosa, dolor durante relaciones sexuales y dolor en el área pélvica.

Preferentemente, el tratamiento debe continuar siempre y cuando se sospechen o se observen síntomas de cáncer.

La presente invención es adecuada para la reducción de síntomas de degeneración macular. Estos síntomas de degeneración macular incluyen visión borrosa, líneas que se forman en la visión y pérdida gradual o rápida de la visión.

- 5 La presente invención es adecuada para la reducción de los síntomas de diabetes. Estos síntomas de diabetes incluyen pérdida de la visión y ceguera.

10 Para evaluar si un paciente se está beneficiando del (tratamiento), se examinarían los síntomas del paciente de una manera cuantitativa, mediante la reducción en la frecuencia de las recaídas o un aumento en el tiempo de la progresión sostenida o una mejora y se compara la medición del estado del paciente antes y después del tratamiento. En un tratamiento satisfactorio, el estado del paciente habrá mejorado. La medición del número o frecuencia de recaídas habrá disminuido o el tiempo hasta la progresión sostenida habrá aumentado.

15 Con respecto a cada fármaco, la dosis es una parte importante del éxito del tratamiento y la salud del paciente. En cada caso, en el intervalo especificado, el médico tiene que determinar la mejor dosis para un paciente dado, de acuerdo con el género, la edad, el peso, la altura, la patología y otros parámetros.

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de MT-SP1. La cantidad del compuesto dependerá del paciente que se esté tratando. El peso del paciente, la gravedad de la enfermedad, la manera de administración y el juicio del médico tratante se tomarán en cuenta para decidir la cantidad apropiada. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de MT-SP1 u otro agente terapéutico está dentro de las capacidades de un experto en la materia.

25 En algunos casos, puede ser necesario usar dosis fuera de los intervalos indicados en el prospecto farmacéutico para tratar un paciente. Esos casos serán evidentes para el médico tratante. Cuando sea necesario, un médico también sabrá cómo y cuándo interrumpir, ajustar o terminar el tratamiento junto con una respuesta de un paciente particular.

### 30 **Formulación (por separado o en conjunto) y administración**

Los compuestos de la presente invención se administran por separado o se formulan en conjunto en una forma de dosificación formulada en conjunto adecuada. Los compuestos, que incluyen aquellos usados en terapias de combinación se administran a un paciente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable o en una composición farmacéutica. Un compuesto que se administra en una composición farmacéutica se mezcla con un vehículo adecuado o excipiente de forma que una cantidad terapéuticamente eficaz esté presente en la composición. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto que es necesaria para conseguir un punto final deseado (por ejemplo, reducir los síntomas asociados con el cáncer).

40 Se puede usar una diversidad de preparaciones para formular composiciones farmacéuticas que contienen MT-SP1 otros agentes terapéuticos. Las técnicas de formulación y administración se pueden encontrar en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Twentieth Edition," Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. Los comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, grageas, geles, pastas, ungüentos, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes y aerosoles son ejemplos de tales formulaciones. Las formulaciones se pueden administrar de una manera local o sistémica o de una forma de liberación prolongada o sostenida. La administración de la composición se puede realizar en una diversidad de maneras. Las composiciones y terapias de combinación de la invención se pueden administrar en combinación con una diversidad de excipientes farmacéuticos, incluyendo agentes estabilizantes, vehículos y/o formulaciones de encapsulación como se describe en el presente documento.

50 La preparación de composiciones farmacéuticas o farmacológicas será conocida por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Típicamente, tales composiciones se pueden preparar como inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones; formas sólidas adecuadas para solución en o suspensión en líquido antes de la inyección; como comprimidos u otros sólidos para administración oral; como cápsulas de liberación temporalizada o de cualquier otra forma usada actualmente, incluyendo cremas, lociones, enjuagues bucales, inhalantes y similares.

55 Para administración a seres humanos, las preparaciones deben satisfacer los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la FDA.

60 La administración de compuestos solos o en terapias de combinación puede ser, por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa o cualquier otra vía de administración adecuada. Una frecuencia particularmente conveniente para la administración de los compuestos de la invención es una vez al día.

65 Tras la formulación, los agentes terapéuticos se administrarán de una manera compatible con la formulación de la dosis y en una cantidad tal que sea farmacológicamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación, tal como las soluciones inyectables descritas, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares. En este contexto, la cantidad de ingrediente activo y el volumen de la composición que se tiene que administrar dependen del animal hospedador que se esté tratando. Las cantidades

exactas de compuesto activo necesarias para la administración dependen del juicio del facultativo y son propias de cada individuo.

5 Típicamente se utiliza un volumen mínimo de una composición necesario para dispersar los compuestos activos. Los regímenes adecuados para administración también son variables, pero se caracterizan por la administración inicial del compuesto y la supervisión de los resultados y después se proporcionan dosis adicionales controladas en intervalos adicionales.

10 Un vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso en la composición de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

20 Los conservantes adecuados para su uso en solución incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorobutanol, timerosal y similares. Los tampones adecuados incluyen ácido bórico, bicarbonato de sodio y de potasio, boratos de sodio y de potasio, carbonato de sodio y de potasio, acetato de sodio, bifosfato de sodio y similares, en cantidades suficientes para mantener el pH a entre aproximadamente pH 6 y pH 8 y preferentemente, entre aproximadamente pH 7 y pH 7,5. Los agentes de tonicidad adecuados son dextrano 40, dextrano 70, dextrosa, glicerina, cloruro de potasio, propilenglicol, cloruro de sodio y similares, de forma que el cloruro de sodio equivalente a la solución oftálmica está en el intervalo del 0,9 más o menos el 0,2%. Los antioxidantes y estabilizantes adecuados incluyen bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfito de sodio, tiourea y similares. Los agentes humectantes y clarificantes adecuados incluyen polisorbato 80, polisorbato 20, poloxamer 282 y tiloxapol. Los agentes de aumento de viscosidad incluyen dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroetilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, vaselina, polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa y similares.

35 Los compuestos y terapias de combinación de la invención se pueden formular mediante la disolución, suspensión o emulsión en un disolvente acuoso o no acuoso. Los aceites vegetales (por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de cacahuete) o similares, glicéridos de ácido alifático sintético, ésteres de ácidos alifáticos superiores y propilenglicol son ejemplos de disolventes no acuosos. Las soluciones acuosas tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica también se pueden usar. En todos los casos la forma tiene que ser estéril y tiene que ser fluida hasta el punto de que exista inyectabilidad fácil. La misma debe ser estable en condiciones de preparación y almacenamiento y se tiene que conservar frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

40 Las soluciones de compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada de forma adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

50 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con diversos de los ingredientes diferentes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido por esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan incluyendo los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios entre aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y secado por congelación que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente estéril por filtración de la misma.

55 La preparación de soluciones más o más elevadamente concentradas para inyección subcutánea o intramuscular también se contempla. Con respecto a esto, el uso de DMSO como disolvente se prefiere ya que esto dará como resultado una penetración extremadamente rápida, administrando concentraciones elevadas del compuesto o los compuestos o agente o agentes activos a un área pequeña.

60 Cuando se proporciona uno o ambos ingredientes activos de la terapia de combinación por vía oral, el mismo se puede formular a través de la combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables que se conocen bien en la técnica. Los vehículos posibilitan que el compuesto se formule, por ejemplo, como un comprimido, píldora, cápsula, solución, suspensión, formulación de liberación sostenida; polvo, líquido o gel para ingestión oral por el paciente. El uso oral de formulaciones se puede obtener en una diversidad de formas, incluyendo mezclar el compuesto con un excipiente sólido, opcionalmente moler la mezcla resultante, añadir sustancias auxiliares adecuadas y procesar la

mezcla de gránulos. La siguiente lista incluye ejemplos de excipientes que se pueden usar en una formulación oral: azúcares tales como lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y polivinilpirrolidona (PVP). Las formulaciones orales incluyen excipientes usados normalmente tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares.

En determinadas realizaciones definidas, las composiciones farmacéuticas orales comprenderán un diluyente inerte o vehículo comestible asimilable o las mismas se pueden incluir en cápsulas de gelatina de capa dura o blanda o las mismas se pueden comprimir en comprimidos o las mismas se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta. Para administración terapéutica oral, los compuestos activos se pueden incluir en excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos el 0,1% de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente el 75% del peso de la unidad o preferentemente entre el 25-60%. La cantidad de compuestos activos en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosis adecuada.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes, tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio y un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina se puede añadir o un agente saporífero, tal como menta, aceite de gaulteria o saporífero de cereza. Cuando la forma unitaria de dosis es una cápsula, la misma puede comprender, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Diversos materiales diferentes pueden estar presentes como revestimientos o para modificar de otra manera la forma física de la unidad de dosis. Por ejemplo, comprimidos, píldoras o cápsulas pueden estar revestidos con goma-laca, azúcar o ambos. Un jarabe de elixir puede contener los compuestos activos, sacarosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y saporífero, tal como sabor de cereza o de naranja.

Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios. Para supositorios los aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0,5% al 10%, preferentemente el 1%-2%.

El sujeto tratado por los métodos de la invención es un mamífero, más preferentemente un ser humano. Las siguientes propiedades o aplicaciones de estos métodos se describirán básicamente para seres humanos aunque las mismas también se pueden aplicar a mamíferos no humanos, por ejemplo, simios, monos, perros, ratones, etc. Por lo tanto la invención también se puede usar en un contexto veterinario.

Los siguientes ejemplos son no limitantes y tienen por objeto únicamente ilustrar diversos aspectos de la invención.

## EJEMPLOS

### **Ejemplo 1: Métodos de clonación y caracterización de proteasa MT-SP1 sometida a ingeniería genética con especificidad de sustrato alterada en base a armazones de partida bien entendidos.**

La serina proteasa MT-SP1 se ha elegido como proteasa de armazón para mutagénesis hacia proteólisis específica de VEGF y VEGFR en parte debido a que se ha caracterizado bien con técnicas bioquímicas y estructurales [Harris, Recent Results Cancer Res. 1998;152: 341-52].

MT-SP1 es una serina proteasa unida a membrana con múltiples dominios de interacción proteína extracelular-proteína. Se han creado los perfiles del dominio de proteasa en solitario usando PSSCL totalmente diverso y de P1-Lys (Figura 4A-4C) que revela una especificidad extendida de (básico)-(no básico)-Ser-Arg o (no básico)-(básico)-Ser-Arg/Lys. La estructura cristalográfica de rayos X de MT-SP1 revela componentes que se propone que regulan la actividad y una inserción de nueve aminoácidos en el bucle de 60 que puede determinar especificidad de P2.

Se han creado y caracterizado las variantes de MT-SP1. Diversas muteínas de proteasas se han expresado y purificado, como se ha descrito más adelante. Se ha realizado la actividad inicial para verificar la actividad y especificidad y en las Figuras 1-11 se proporcionan resultados de muestra.

### **Ejemplo 2. Expresión y purificación de MT-SP1.**

Un polipéptido de MT-SP1 mutado ("muteína") puede contener una mutación única por polipéptido o puede contener dos o más restos mutados en cualquier combinación, como se ilustra en la Tabla 11.

MT-SP1 de tipo silvestre y mutante se clonan en el vector de expresión bacteriano pQE (Qiagen) que contiene una

etiqueta de 6 histidina N-terminal, prodominio y dominio de proteasa y las construcciones resultantes se transformaron en células BL21 de *E. coli*. Las células se cultivan en cultivos de 100 ml a una DO de 0,6 y la expresión de la proteasa en cuerpos de inclusión se induce añadiendo IPTG a una concentración final de 1 mM. Después de 4-6 horas, las bacterias se sedimentan mediante centrifugación y el sedimento se resuspende en Tris 50 mM pH 8, KCl 500 mM y glicerol al 10% (tampón A). Las células se lisan mediante sonicación y se sedimentan por centrifugación a 6000 xg. Los sedimentos se resuspenden en Tris 50 mM pH 8, urea 6 M, NaCl 100 mM y 2-mercaptoetanol al 1% (tampón B). La membrana y organelas se sedimentan mediante centrifugación a 10000 xg y el sobrenadante se pasa sobre una columna NTA de níquel (Quiagen). La columna se lava con Tris 50 mM pH 8, urea 6 M, NaCl 100 mM, imidazol 20 mM, 2-mercaptoetanol al 1% y Tween 20 al 0,01% (tampón D). La columna se lava nuevamente con tampón D sin Tween 20. Después la proteasa se eluye de la columna con Tris 50 mM pH 8, urea 6 M, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol al 1% e imidazol 250 mM (tampón E). Después la proteasa se concentra hasta un volumen de ~1 ml y después se dializa a 4° durante una noche en 1 l de Tris 50 mM pH 8, urea 3 M, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol al 1% y glicerol al 10%. Finalmente, la proteasa se dializa en Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM y glicerol al 10% a 4°C durante una noche. Durante la última etapa de diálisis, la proteasa se autoactiva mediante auto-escisión, dando como resultado la eliminación de la etiqueta de 6 histidina y el prodominio.

**Resultado.** Se obtienen cantidades en multi-miligramo usando este sistema de expresión bacteriano. La proteasa se produce en cuerpos de inclusión y se purifica mediante un procedimiento de purificación de una columna y después se vuelve a plegar a través de etapas de diálisis sucesivas (Figura 1). Una vez plegada nuevamente, la proteasa se activa así misma mediante escisión en la unión entre el prodominio y el dominio de proteasa en la secuencia RQAR/WGG.

### Ejemplo 3. Síntesis y exploración de bibliotecas combinatorias para caracterización de MT-SP1 de tipo silvestre y muteínas

#### Método de aminoácido fijo en P1

Se añadió resina de aminoácido ACC con Fmoc sustituido en P1 individual (ca. 25 mg, 0,013 mmol) a pocillos de un aparato de reacción de 96 pocillos Multi-Chem. Los pocillos que contenían resina se solvataron con DMF (0,5 ml). Se añadió una piperidina al 20% en solución de DMF (0,5 ml) seguido por agitación durante 30 min. Los pocillos del bloque de reacción se filtraron y lavaron con DMF (3 x 0,5 ml). Con el fin de introducir la posición P2 aleatorizada, se activó previamente una mezcla isocinética (Ostresh, J. M., *et al.*, (1994) Biopolymers 34: 1681-9) de Fmoc-aminoácidos (4,8 mmol, 10 equiv/pocillo; Fmoc-aminoácido, mol %: Fmoc-Ala-OH, 3,4; Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 6,5; Fmoc-Asn(Trt)-OH, 5,3; Fmoc-Asp(O-t-Bu)-OH, 3,5; Fmoc-Glu(O-t-Bu)-OH, 3,6; Fmoc-Gln(Trt)-OH, 5,3; Fmoc-Gly-OH, 2,9; Fmoc-His(Trt)-OH, 3,5; Fmoc-Ile-OH, 17,4; Fmoc-Leu-OH, 4,9; Fmoc-Lys (Boc)-OH, 6,2; Fmoc-Nle-OH, 3,8; Fmoc-Phe-OH, 2,5; Fmoc-Pro-OH, 4,3; Fmoc-Ser(O-t-Bu)-OH, 2,8; Fmoc-Thr(O-t-Bu)-OH, 4,8; Fmoc-Trp(Boc)-OH, 3,8; Fmoc-Tyr(O-t-Bu)-OH, 4,1; Fmoc-Val-OH, 11,3) con DIPI (390 µl, 2,5 mmol) y HOBt (340 mg, 2,5 mmol) en DMF (10 ml). La solución (0,5 ml) se añadió a cada uno de los pocillos. El bloque de reacción se agitó durante 3 h, se filtró y se lavó con DMF (3 x 0,5 ml). Las posiciones P3 y P4 aleatorizadas se incorporaron de la misma manera. El Fmoc del aminoácido en P4 se eliminó y la resina se lavó con DMF (3 x 0,5 ml) y se trató con 0,5 ml de una solución de nivelación de AcOH (150 µl, 2,5 mmol), HOBt (340 mg, 2,5 mmol) y DIPI (390 µl, 2,5 mmol) en DMF (10 ml). Después de 4 h de agitación, la resina se lavó con DMF (3 x 0,5 ml), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 0,5 ml) y se trató con una solución de 95:2,5:2,5 TFA/TIS/H<sub>2</sub>O. Después de incubar durante 1 h el bloque de reacción se abrió y se colocó en una placa de titulación de 96 pocillos profundos y los pocillos se lavaron con solución de escisión adicional (2 x 0,5 ml). La placa de recolección se concentró y los pocillos que contenían sustrato se diluyeron con EtOH (0,5 ml) y se concentró dos veces. Los contenidos de los pocillos individuales se liofilizaron a partir de mezclas CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O. La cantidad total de sustrato en cada pocillo se estimó de forma conservadora que era 0,0063 mmol (50%) en base a rendimientos de sustratos únicos.

#### Método de aminoácido diverso en P1

Se preparó ácido 7-Fmoc-aminocumarin-4-acético tratando ácido 7-aminocumarin-4-acético con Fmoc-Cl. Se mezclaron ácido 7-aminocumarin-4-acético (10,0 g, 45,6 mmol) y H<sub>2</sub>O (228 ml). NaHCO<sub>3</sub> (3,92 g, 45,6 mmol) se añadió en pequeñas partes y seguido por la adición de acetona (228 ml). La solución se enfrió con un baño helado y se añadió Fmoc-Cl (10,7 g, 41,5 mmol) con agitación durante el transcurso de 1 h. El baño helado se retiró y la solución se agitó durante una noche. La acetona se eliminó con evaporación giratoria y el sólido gomoso resultante se recogió mediante filtración y se lavó con varias partes de hexano. Se preparó ACC-resina mediante condensación de resina Rink Amide AM con ácido 7-Fmoc-aminocumarin-4-acético. La resina Rink Amide AM (21 g, 17 mmol) se solvató con DMF (200 ml). La mezcla se agitó durante 30 min y se filtró con una cánula de filtro, tras lo cual se añadió piperidina al 20% en DMF (200 ml). Después de agitación durante 25 min, la resina se filtró y se lavó con DMF (3 veces, 200 ml cada vez). Se añadieron ácido 7-Fmoc-aminocumarin-4-acético (15 g, 34 mmol), HOBt (4,6 g, 34 mmol) y DMF (150 ml), seguido por diisopropil-carbodiimida (DIPI) (5,3 ml, 34 mmol). La mezcla se agitó durante una noche, se filtró, se lavó (DMF, tres veces con 200 ml; tetrahidrofurano, tres veces con 200 ml; MeOH, tres veces con 200 ml) y se secó sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. El nivel de sustitución de la resina fue 0,58 mmol/g (>95%) determinado por análisis de Fmoc.

**Síntesis de biblioteca con P1 diverso**

Se añadió resina de aminoácido ACC con Fmoc sustituido en P1 individual (~25 mg, 0,013 mmol) a pocillos de un aparato de reacción de 96 pocillos MultiChem. Los pocillos que contenían resina se solvataron con DMF (0,5 ml). Después de filtración se añadió piperidina al 20% en solución de DMF (0,5 ml), seguido por agitación durante 30 min. Los pocillos del bloque de reacción se filtraron y se lavaron con DMF (tres veces con 0,5 ml). Para introducir la posición P2 aleatorizada, se preactivó una mezcla isocinética de Fmoc-aminoácidos [4,8 mmol, 10 eq por pocillo; Fmoc-aminoácido, mol %: Fmoc-Ala-OH, 3,4; Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 6,5; Fmoc-Asn(Trt)-OH, 5,3; Fmoc-Asp(O-*t*-Bu)-OH, 3,5; Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH, 3,6; Fmoc-Gln(Trt)-OH, 5,3; Fmoc-Gly-OH, 2,9; Fmoc-His(Trt)-OH, 3,5; Fmoc-Ile-OH, 17,4; Fmoc-Leu-OH, 4,9; Fmoc-Lys(Boc)-OH, 6,2; Fmoc-Nle-OH, 3,8; Fmoc-Phe-OH, 2,5; Fmoc-Pro-OH, 4,3; Fmoc-Ser(O-*t*-Bu)-OH, 2,8; Fmoc-Thr(O-*t*-Bu)-OH, 4,8; Fmoc-Trp(Boc)-OH, 3,8; Fmoc-Tyr(O-*t*-Bu)-OH, 4,1; Fmoc-Val-OH, 11,3] con DICl (390  $\mu$ l, 2,5 mmol) y HOBt (340 mg, 2,5 mmol) en DMF (10 ml). La solución (0,5 ml) se añadió a cada uno de los pocillos. El bloque de reacción se agitó durante 3 h, se filtró y se lavó con DMF (tres veces con 0,5 ml). Las posiciones P3 y P4 aleatorizadas se incorporaron de la misma manera. El Fmoc del aminoácido en P4 se eliminó y la resina se lavó con DMF (tres veces con 0,5 ml) y se trató con una solución de nivelación de AcOH (150  $\mu$ l, 2,5 mmol), HOBt (340 mg, 2,5 mmol) y DICl (390  $\mu$ l, 2,5 mmol) en DMF (10 ml). Después de 4 h de agitación, la resina se lavó con DMF (3 veces con 0,5 ml) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (tres veces con 0,5 ml) y se trató con una solución de 95:2,5:2,5 TFA/TIS/H<sub>2</sub>O. Después de incubación durante 1 h el bloque de reacción se abrió y se colocó en una placa de titulación de 96 pocillos profundos y los pocillos se lavaron con solución de escisión adicional (dos veces con 0,5 ml). La placa de recolección se concentró y el material en los pocillos que contenían sustrato se diluyó con EtOH (0,5 ml) y se concentró dos veces. El contenido de los pocillos individuales se liofilizó a partir de mezclas de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O. La cantidad total de sustrato en cada pocillo se estimó de forma conservadora que era 0,0063 mmol (50%) en base a los rendimientos de sustratos únicos.

**Métodos de exploración usando ambas bibliotecas**

Cantidades multigramo de resina ACC P1-sustituida se pueden sintetizar mediante los métodos descritos. Resina ACC Fmoc-aminoácido-sustituida se colocó en 57 pocillos de un bloque de reacción de 96 pocillos: las subbibliotecas se indicaron mediante la segunda posición fija (P4, P3, P2) de 19 aminoácidos (cisteína se omitió y norleucina se sustituyó por metionina). La síntesis, protección y escisión de los sustratos fue idéntica a las descritas en la sección anterior, con la excepción de que para las subbibliotecas P2, P3 y P4, se incorporaron aminoácidos individuales (5 eq de monómero de Fmoc-aminoácido, 5 eq de DICl y 5 eq de HOBt en DMF), en lugar de mezclas isocinéticas, en las posiciones P2, P3 o P4 dirigidas espacialmente.

La preparación de las bibliotecas combinatorias diversa completa y con P1 fijo se realizó como se ha descrito anteriormente. La biblioteca se dividió en alícuotas en placas de 96 pocillos hasta una concentración final de 250  $\mu$ M. Las proteasas variantes se diluyeron en tampón de actividad de MTSP (Na HEPES 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM Tween-20 al 0,01%) hasta concentraciones entre 50 nM y 1  $\mu$ M. La actividad inicial frente a Ac-QGR-AMC se usó para ajustar la concentración de proteasa variante a una aproximadamente igual a MT-SP1 de rata de tipo silvestre 50 nM. La actividad enzimática en la biblioteca P1-Arg se ensayó durante una hora a 30°C en un fluorímetro Spectra Max Delta (Molecular Devices). La excitación y emisión se midieron a 380 nm y 460 nm, respectivamente.

**Síntesis y exploración de fluorescencia de bibliotecas.****Biblioteca con P1 diverso****A(i). Síntesis**

Se sintetizaron bibliotecas con P1 diverso como se ha proporcionado anteriormente. La especificidad de las diversas muteínas de MT-SP1 se caracterizó en comparación con MT-SP1 de tipo silvestre.

**A(ii). Ensayo enzimático de biblioteca**

La concentración de enzimas proteolíticas se determinó mediante absorbancia medida a 280 nm (Gill, S. C., *et al.*, (1989) Anal Biochem 182:319-26). La proporción de trombina, plasmina, tripsina, uPA, tPA y quimotripsina catalíticamente activos se cuantificó mediante titulación de sitio activo con MUGB o MUTMAC (Jameson, G. W., *et al.*, (1973) Biochemical Journal 131: 107-117).

Sustratos de los PSSCL se disolvieron en DMSO. Aproximadamente  $1,0 \times 10^{-9}$  mol de cada sub-biblioteca de P1-Lys, P1-Arg o P1-Leu (361 compuestos) se añadieron a 57 pocillos de una microplaca de flúor de 96 pocillos (Dynex Technologies, Chantilly, Va.) para una concentración final de 0,1  $\mu$ M. Aproximadamente  $1,0 \times 10^{-10}$  mol de cada subbiblioteca con P1 diverso (6859 compuestos) se añadieron a 20 pocillos de una placa de 96 pocillos para una concentración final de 0,01  $\mu$ M en cada compuesto. Las reacciones de hidrólisis se iniciaron mediante la adición de enzima (0,02 nM-100 nM) y se supervisaron fluorométricamente con un Espectrómetro de Luminiscencia Perkin Elmer LS50B, con excitación a 380 nm y emisión a 450 nm o 460 nm. Los ensayos de la serina proteasa se



realizaron a 25 °C en un tampón que contenía Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, Tween-20 0,01% y DMSO al 1% (de los sustratos). El ensayo de las proteasas de cisteína, papaína y cruzaina, se realizó a 25 °C en un tampón que contenía acetato de sodio 100 mM, pH 5,5, NaCl 100 mM, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, Brij-35 al 0,01% y DMSO al 1% (de los sustratos).

5

#### **B. Creación de Perfiles de Proteasas con una Biblioteca con P1 diverso de 137.180 Secuencias Sustrato**

Para ensayar la posibilidad de unir todos los aminoácidos al sitio P1 en la secuencia sustrato se creó una biblioteca de tetrapéptidos de P1 diverso. La biblioteca de P1 diverso consiste en 20 pocillos en los que únicamente la posición P1 se mantiene constante sistemáticamente como todos los aminoácidos, excluyendo cisteína e incluyendo norleucina. Las posiciones P2, P3 y P4 consisten en una mezcla equimolar de todos los aminoácidos para un total de 6.859 secuencias sustrato por pocillo. Varias serina y cisteína proteasas se sometieron a creación de perfiles para ensayar la aplicabilidad de esta biblioteca para la identificación del aminoácido en P1 óptimo. Quimotripsina mostró la especificidad esperada para aminoácidos hidrófobos grandes. Tripsina y trombina mostraron preferencia por aminoácidos básicos en P1 (Arg>Lys). Plasmina también mostró una preferencia por aminoácidos básicos (Lys>Arg). Granzima B, la única serina proteasa de mamífero conocida que tiene especificidad de P1-Asp mostró una preferencia diferente por ácido aspártico con respecto a todos los aminoácidos, incluyendo el otro aminoácido ácido, Glu. El perfil de P1 para elastasa de neutrófilo humana tiene la preferencia canónica por alanina y valina. Las cisteinas proteasa, papaína y cruzaina mostraron la especificidad de secuencia del sustrato P1 amplia que se conoce para estas enzimas, aunque existe una preferencia modesta por arginina. La proteasa de tipo silvestre de MT-SP1 prefirió Arg o Lys.

10

15

20

#### **C. Creación de Perfiles de Proteasas MT-SP1 con la Biblioteca con P1 Constante**

Se crea una biblioteca de tetrapéptidos de P1 constante como se ha divulgado anteriormente. La biblioteca de P1 constante consiste en 20 pocillos en los que únicamente la posición P1 se mantiene constante sistemáticamente como todos los aminoácidos, excluyendo cisteína e incluyendo norleucina. Las posiciones P2, P3 y P4 consisten en una mezcla equimolar de todos los aminoácidos para un total de 6.859 secuencias sustrato por pocillo. Se sometieron a creación de perfiles varias serina y cisteína proteasas para ensayar la aplicabilidad de esta biblioteca para la identificación del aminoácido en P1 óptimo. MT-SP1 prefiere los aminoácidos Arg y Lys en P1.

25

30

#### **Ejemplo 4. Determinación de la especificidad extendida de variantes de MT-SP1 por PSSCL.**

La biblioteca de PSSCL con P1-Arg fijo se resuspende en DMSO y dispone en placas de 96 pocillos negras opacas a una concentración de 5-10 nanomoles por pocillo. Las proteasas variantes se diluyen en Tris 50 mM pH 8, NaCl 50 mM y Tween 20 al 0,01% (tampón de activación de MTSP) a una concentración de 5 nM a 5 μM. Cien microlitros de la solución de proteasa se añaden a cada pocillo y la fluorescencia del grupo saliente de ACC se miden mediante excitación a 380 nm y emisión a 460 nm usando un lector de placa fluorescente Spectramax (Molecular Devices). La especificidad de proteasas variantes en cada uno de los subsitios extendidos P4-P2 se determina mediante la fluorescencia de cada uno de los aminoácidos dispuestos en las bibliotecas de PSSCL de P4-P2.

35

40

**Resultado.** La exploración mediante PSSCL confirma que MT-SP1 de tipo silvestre tiene una preferencia por básicos (Arg, Lys) en las posiciones P4 y P3, de acuerdo con los datos publicados por Takeuchi *et al.*, J. Biol. Chem., Vol. 275, Issue 34, 26333-26342, Agosto 25, 2000. Sin embargo, el perfil de PSSCL también revela que su especificidad es algo amplia, de forma que una diversidad de aminoácidos se aceptarán en las posiciones P4 y P3 además de Arg o Lys (FIGURA 2A). Se generaron varios mutantes (véase anteriormente) para limitar la especificidad de sustrato y para dirigirlo hacia sitios de escisión potenciales identificados en el receptor de VEGF (véase más adelante). Un mutante, L172D (CB18), muestra un perfil de especificidad muy estrecho, de forma que se prefieren de forma marcada Arg o Lys con respecto a cualquier otro aminoácido en las posiciones P4 y P3. Se ha identificado una secuencia de escisión potencial en VEGFR2 (RRVR) que coincide con el perfil de especificidad de L172D (RRXR). Las variantes de MT-SP1 se han sometido a creación de perfil con el PSSCL de P1-Arg (para variantes específicas, véase la Tabla 11). Todas las variantes muestran un aumento en la selectividad en una o más posiciones de secuencia sustrato. Los perfiles representativos se muestran en la Figura 2A a H.

45

50

#### **Ejemplo 5. Selección de variantes de MT-SP1 capaces de escisión diana específica de secuencia peptídica usando presentación en fago de proteasa**

El fagémido se construye de forma que el mismo (i) porta todos los genes necesarios para morfogénesis de fago M13; (ii) el mismo porta una señal de empaquetamiento que interacciona con el origen de replicación del fago para iniciar la producción de ADN monocatenario; (iii) el mismo porta un origen de replicación de fago alterado y (iv) el mismo porta un gen de resistencia a ampicilina.

60

La combinación de un origen de replicación de fago ineficaz y un origen de replicación de plásmido intacto favorece la propagación del vector en la bacteria hospedadora como un plásmido (como ADN, forma replicante, FR) en lugar de como un fago. Por lo tanto, se puede mantener sin destruir al hospedador. Además, la posesión de un origen de plásmido significa que el mismo se puede replicar independientemente de la propagación similar a fago eficaz del

65

fagémido. En virtud del gen de resistencia a ampicilina, el vector se puede amplificar, lo cual a su vez aumenta el empaquetamiento del ADN de fagémido en partículas de fago.

La fusión del gen de variante de MT-SP1 a cualquiera de las proteínas de revestimiento de M13 del gen 3 o gen 8 se puede construir usando métodos de clonación convencionales (Sidhu, Methods in Enzymology, 2000, V328, pág. 333). Una biblioteca combinatoria de variantes dentro del gen que codifica MT-SP1 después se presenta en la superficie de M13 como una fusión a las proteínas de revestimiento de M13 p3 o p8 y se selecciona frente a un péptido inmovilizado que contiene aldehído que corresponde a la escisión diana de interés. El resto de aldehído inhibirá la capacidad de la proteasa de escindir el enlace escindible de la proteasa, sin embargo, este resto no interfiere con el reconocimiento de proteasa del péptido. El fago con proteasa variante presentado con especificidad por el péptido diana inmovilizado se unirá a placas revestidas con el péptido diana, mientras que el fago inespecífico se lavará. A través de ciclos consecutivos de selección, se pueden aislar las proteasas con especificidad potenciada hacia la secuencia diana. La secuencia diana después se puede sintetizar sin el aldehído y el fago aislado se puede ensayar para determinar hidrólisis específica del péptido.

**Ejemplo 6. Identificación de escisión de muteína de MT-SP1 en la región de tronco de VEGFR2**

La secuencia polipeptídica del receptor 2 de VEGF (VEGF-R2/KDR), que muestra las secuencias respectivas de los dominios extracelular (SEC ID N°: 8) e intracelular (SEC ID N°: 9), se proporciona en la Tabla 12. Las secuencias que coinciden con la especificidad de sustrato nativo P4-P1 de MT-SP1 se muestran en negritas. Dos secuencia coinciden con el perfil de reconocimiento tanto de L172D como de MT-SP1: la secuencia RVRK dentro del recuadro y la secuencia RRVR con subrayado doble.

**Tabla 12. Especificidad de Sustrato de VEGFR2/KDR de Proteasas MT-SP1 Dirigidas**

<b>Extracelular</b>	<p>KQSKVLLAVALWLCVETRAASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDL          WLWPNNQSGSBQRVEVTECSDFLCKTLTI PKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQD          YRSPFIASVSDQHGCVYITENKNTFVVIPCLGSI SNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWD          SKKGFTIPSYMISYAGMVFCFAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGE          KLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPS SKHQHKKLVNRDLKTSQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS          DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRI PAKYLGYP          EIKWYKNGI PLESNHTIKAGHVLTIMEVSRDTGNVTVILTNPI SKEKQSHVVSLVYVVP          PQIGEKSLISPVDYQYGTQTTLCTVYAI PPHHHIHWYQLEEECANEPSQAVSVTNPY          PCEEWRSVEDFQGGNKIEVNKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGE          RVISFHVTRGPEITLQPDMPTEQESVSLWCTADRSTFENLTYKLGPPPLPHVGELEPT          PVCKNLDTLWKLNATMFSNSTNDILIMELKNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVVRLT          VLERVAPTITGNLENQTTSIGESIEVSTAGNPPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNR          NLTI<b>RVRK</b>EEDEGLYTCQACSVLGCCKVEAFFIIEGAQEKTNLE (SEC ID N°: 8)</p>
<b>Intracelular</b>	<p>IIILVGTAVIAMFFWLLLVII LR TVK RANGGELKTGYLSIVMDPDELPLDEHCERLPYDA          SKWEFPRDRLLKLGKPLGRGAFGQVIEADAFGIDKTAT CRTVAVKMLKEGATHSEHRMS          ELKILIHIGHHLNVNLLGACTKPGGPLMVIVEFCKFGNLSTYLRSKRNEFVYPYKTKGAR          FRQGDYVGAIPVDLKRRLDSITSSQSSASSGFVEEKSLSDVEEBEAPEDLYKDFLTLEH          LICYSFQVAKGMEFLASRCKIHRDLAARNILLSEKNVVKICDFGLARDIYKDPDYVRKGD          ARLPLKWMAPETIFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVKIDEFCRRLKEGTR          MRAPDYTTPEMYQIMLDCWHGEPSPRPTFSELVEHLGNLLQANAQQDGKDYIVLPISETL          SMEEDSGLSLPTSPVSCMEEEVCDPKFHYDNTAGISQYLQNSKRKSRPVSVKTFEDIPL          EEPVVKVIPPDDNQTDSGMVLASEELKTLEDRTKLSPSFGGMVPSKSRRESVASEGSNQTSG          YQSGYHSDDTDTTVYSSEEAELLKLEIGVQTGSTAQILQPDSGTTLSSPPV          (SEC ID N°: 9)</p>

El dominio extracelular purificado de VEGF-R2 (Fik1) fusionado al dominio Fc de IgG de ratón (2,5 5 µg) se resuspendió con MT-SP1 1 µM y proteasas variantes en 17,1 µl de tampón de activación de MTSP. La reacción se incubó a 37 °C durante 2 horas, se desglucosiló con PNGasaF y se separó mediante electroforesis de SDS-PAGE. Fik1-Fc de longitud completa y los productos de escisión se identificaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie y el extremo N se secuenció mediante el protocolo de Edman. VEGFR2-Fc purificado se escinde mediante MT-SP1 de tipo silvestre y mutante en una secuencia RRVR/KEDE en la región de tronco extracelular del receptor. Por tanto, la presente invención proporciona proteasas que pueden escindir el VEGFR en la región de tronco y en una realización de la invención, tales proteasas se administran a un paciente que necesita tratamiento para el cáncer, degeneración macular u otra enfermedad en la cual la angiogénesis juega un papel causal o contributivo.

**Ejemplo 7. Ensayo de escisión de receptor de VEGF purificado**

El dominio extracelular purificado de VEGF-R2 fusionado al dominio Fc de IgG de ratón (3-10 µg) se resuspende en

tampón de activación MTSP (20  $\mu$ l). Se añaden proteasas variantes a una concentración final de 100 nM a 1  $\mu$ M. La reacción se incubó a 37 °C durante 1-2 horas y después se separa mediante electroforesis de SDS-PAGE. Las bandas se visualizan mediante tinción de azul de Coomassie, tinción de plata y/o transferencia de Western.

5 *Resultado.* El VEGFR2-Fc purificado se escinde de forma eficaz mediante MT-SP1 de tipo silvestre y mutante (FIGURA 3). La escisión mediante proteasas variantes produce productos de escisión con pesos moleculares aparentes de ~80 kDa y 30 kDa; el análisis de los sitios de escisión potenciales en VEGFR2 sugiere que las variantes de MT-SP1 se dirigen a la región de tronco (membrana proximal) de VEGFR2. El mutante L172D escinde VEGFR2 de longitud completa pero a una velocidad reducida en comparación con el tipo silvestre. Varios mutantes (N175D y D217F) escinden el receptor con mayor eficacia que el tipo silvestre. Ninguna de las variantes de proteasa o de tipo silvestre escinde los dominios Fc.

#### Ejemplo 8. Ensayo de la escisión del receptor de VEGF a partir de células endoteliales

15 Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se adquirieron en Cambrex y se cultivaron en EBM-2 (medio basal de células endoteliales, Cambrex) con complementos completos que incluyen suero fetal bovino al 2% (FCS) y antimicóticos-antibióticos. Para ensayos de supervivencia, las células se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/ml en EBM-2 en placas de 96 pocillos durante una noche. Al día siguiente, las células se privaron de suero mediante reemplazo del medio con DMEM + FCS al 10% durante 24 horas. Las proteasas después se añadieron a concentraciones variables de 10-1000 nM y las células se incubaron en presencia de proteasa durante 20 horas. Se añadió VEGF a una concentración final de 20 ng/ml y las células se incubaron durante 72 horas. Al final de las 72 horas, el recuento celular se determinó mediante ensayo de MTT (Sigma) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

25 Para visualizar la escisión del receptor de VEGF de la superficie de las células endoteliales, las células se cultivaron hasta una confluencia de ~70% en placas de 24 pocillos, punto en el cual el medio se retiró y 200  $\mu$ l de DMEM más FCS al 10% se añadieron a cada pocillo. Las proteasas que se tienen que ensayar se añadieron a concentraciones finales de 100-1000 nM. Las células se incubaron en presencia de las proteasas durante 1-3 horas y el medio se retiró. Las células se lavaron con 1 ml de PBS helado (3 veces) y se rasparon de la placa usando la punta de una pipeta. Las células resuspendidas se centrifugaron a 5000 rpm y el sobrenadante se eliminó. Las células se lisaron en 50  $\mu$ l de tampón de lisis (PBS + NP40 al 0,1%) mediante tres ciclos de congelamiento-descongelamiento en hielo seco. La solución celular se centrifugó a 15.000 rpm para eliminar las membranas y organelas y 30  $\mu$ l del sobrenadante se separaron mediante electroforesis en gel de SDS. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se sondearon con un anticuerpo anti-VEGFR2 que reconoce el dominio intracelular (Chemicon).

35 La liberación del receptor de VEGF soluble de la superficie de las células endoteliales mediante escisión proteolítica se detectó usando un ELISA de sándwich. HUVEC se cultivaron en placas de 24 pocillos y se trataron con proteasas como se ha descrito anteriormente. Después de 3 horas de incubación, 100  $\mu$ l de medio se retiraron y se añadió el inhibidor de proteasa Pefabloc (Roche) a una concentración final de 1 mg/ml. Después se añadió el medio a placas Maxisorp (Nunc) que se habían tratado con un anticuerpo monoclonal que reconoce el dominio extracelular de VEGFR2 (MAB3573, R&D Systems, dilución 1:125 en PBS). Después de 1 hora de incubación, las placas se lavaron con PBS + Tween 20 al 0,01% (PBST) y se trataron con un anticuerpo policlonal biotinilado que también reconoce el dominio extracelular (BAF357, R&D Systems, dilución 1:500). Después de 1 hora de incubación, las placas se lavaron con PBST y después se trataron con peroxidasa de rábano picante conjugada a estreptavidina (Upstate). Las placas se incubaron durante 1 hora y después se lavaron con PBST y se desarrollaron usando sustrato TMB (Amersham) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

50 *Resultados.* MTSP de tipo silvestre y los mutantes más específicos, incluyendo CB 18, CB83 y CB 152, inhibieron eficazmente la proliferación dependiente de VEGF de células endoteliales de una manera dependiente de la dosis (FIG. 7A). Consistentes con la predicción de que las variantes de MTSP inhiben la proliferación celular dependiente de VEGF inactivando el receptor de VEGF, la Figura 7B muestra que las variantes de MTSP escinden el receptor de VEGF en la superficie de células endoteliales. Se muestra una transferencia de Western en la que se incubó HUVEC con el tampón de control o variantes de MTSP y después los extractos celulares se sondean con un anticuerpo que reconoce el dominio intracelular de VEGFR2. MTSP de tipo silvestre y las variantes escinden el receptor de longitud completa (banda superior) para generar una forma truncada (banda inferior). Además, el dominio extracelular (ectodominio) del receptor escindido se puede detectar en el medio, como se muestra por el ELISA en la Figura 7C; el ectodominio liberado es detectable en muestras tratadas con MTSP y variantes, pero no en el control.

#### Ejemplo 9. Modelo de microbolsa corneal

60 Para determinar la dosis máxima aguda tolerada, se inyectaron dosis en aumento de MTSP de tipo silvestre y variante purificado i.v. en ratones C57BL/6. Los ratones se observaron para determinar signos externos de toxicidad y muerte.

65 Para el ensayo de microbolsa corneal, los ratones C57BL/6 se anestesian con avertina i.p. y el ojo se trató con

proparacaína-HCl tópica (Allergan, Irvine, CA). Se implantaron gránulos de hidrón/sucralfato que contenían VEGF-A<sub>165</sub> (100 µg, R & D Systems) en una microbolsa corneal a 1 mm del limbo de ambos ojos bajo un microscopio en funcionamiento (Zeiss) seguido por queratotomía lineal intraestromal mediante el uso de un microbisturí (Medtroni Xomed, Jacksonville, FL). Se diseccionó una microbolsa corneal hacia el limbo con un bisturí N° 3 von Graefe (2 x 30 mm), seguido por implantación de gránulo y aplicación de eritromicina tópica. Después de 8 días, la neovascularización se cuantifica mediante el uso de un biomicroscopio de lámpara de rendija y la fórmula  $2\pi \times$  (longitud el vaso/10) x (hora del reloj). Los valores P se determinaron usando un ensayo t de dos colas asumiendo varianzas desiguales (Microsoft EXCEL). Dosis variables de proteasa se inyectaron mediante i.p. dos veces al día a intervalos de 12 horas comenzando el día 0 hasta el día 7.

**Resultados.** MT-SP1 de tipo silvestre se toleró bien por los ratones, con una dosis máxima aguda tolerada (MTD) que se determinó que era 50 mg/kg (FIG. 8). De forma significativa, algunas de las variantes de MT-SP1 que se demostró que tenían una selectividad más estrecha en las bibliotecas de creación de perfil (véase la FIG. 2) se toleraron mejor (es decir, tenían toxicidades más bajas), dando como resultado dosis máximas toleradas más elevadas. CB18 y CB 152, por ejemplo, se toleraron a dosis que dieron como resultado la muerte para MT-SP1 de tipo silvestre. Esto demuestra que limitar la selectividad puede ser un mecanismo para reducir la toxicidad de fármacos de proteasa.

MT-SP1 de tipo silvestre y variantes se ensayaron para determinar su capacidad de inhibir angiogénesis inducida por VEGF en el modelo de microbolsa de córnea de ratón. Como se ha descrito anteriormente, se implantó un gránulo de VEGF en la córnea de ratones, que normalmente es avascular y la cantidad de neovascularización se cuantificó después de 8 días. Cuando los ratones se trataron con MT-SP1 de tipo silvestre o variante, la neovascularización se inhibió de una manera dependiente de la dosis (FIG. 9). El tratamiento de ratones con MT-SP1 de tipo silvestre a la MTD (50 mg/kg) dio como resultado una inhibición del 42% de neovascularización. En el caso de CB18, fue posible dosificar a una concentración más elevada debido a la toxicidad más baja y a la dosis más elevada (80 mg/kg) se consiguió una inhibición del 75%. Por tanto, aunque MT-SP1 de tipo silvestre fue eficaz para inhibir la angiogénesis inducida por VEGF, se obtuvo una mejor eficacia con CB 18 debido al hecho de que se podía dosificar a un nivel más elevado.

#### 50 **Ejemplo 10. Ensayo de Miles para permeabilidad vascular**

Además de la angiogénesis, VEGF también induce la permeabilidad de vasos sanguíneos, dando como resultado la filtración de fluidos en el tejido circundante. La permeabilidad vascular inducida por VEGF se midió usando el ensayo de Miles. En resumen, ratones desnudos (atímicos) se inyectaron con colorante azul de Evan al 0,5% (100 µl en PBS, Sigma) mediante inyección en la vena de la cola. Una hora después de la inyección del colorante, 100 ng de VEGF en 20 µl de PBS se inyectaron por vía intradérmica en la espalda de los ratones en puntos duplicados. La permeabilidad vascular se visualiza mediante la aparición de manchas azules en el sitio de la inyección de VEGF debido a la filtración del colorante. El alcance de la permeabilidad vascular se puede medir de forma semicuantitativa midiendo el área de las manchas azules. Para determinar si los mismos inhibían la permeabilidad vascular, MTSP de tipo silvestre y variantes se inyectaron i.p. a dosis variables inmediatamente después de la inyección del colorante y la cantidad de permeabilidad vascular se determinó midiendo el área de filtración del colorante.

**Resultados.** La inyección de MT-SP1 de tipo silvestre y variante dio como resultado inhibición dependiente de la dosis de permeabilidad vascular (FIG. 10). A la dosis más elevada ensayada, MT-SP1 de tipo silvestre inhibió la permeabilidad vascular hasta el 80%. De forma similar, tanto CB18 como CB152 inhibían la permeabilidad vascular, mostrando CB152 eficacia más elevada a la dosis baja de 10 mg/kg que el tipo silvestre (inhibición del 60% para CB152 en comparación con inhibición del 25% para el tipo silvestre). En sus dosis más elevadas, las tres proteasas tenían eficacia comparable a AVASTIN™, un anticuerpo anti-VEGF aprobado para cáncer de colon.

#### 50 **Ejemplo 11. Modelo de xenoinjerto de tumor**

Células de carcinoma de pulmón de Lewis murinas (LLC) se pasan en la línea media dorsal de ratones C57BL/6 o en DMEM/FCS al 10%/penicilina/estreptomina (PNS)/L-glutamina. Fibrosarcoma murino T241 se cultiva en DMEM/FCS al 10%/PNS/L-glutamina y adenocarcinoma pancreático humano BxPc3 en medio RPMI 1640/FCS al 10%/PNS. Células tumorales ( $10^6$ ) se inyectan s.c. en la línea media dorsal de ratones C57BL/6 (8-10 semanas de edad) para tumores murinos y ratones inmunodeficientes combinados grave (SCID) para tumores humanos, cultivados a 100-200 mm<sup>3</sup> (típicamente 10-14 días) para demostrar crecimiento del tumor y  $10^9$  pfu de adenovirus que codifican proteasa o el adenovirus de control Ad Fc proporcionado por inyección en la vena de la cola i.v.. El tamaño tumoral en mm<sup>3</sup> se calcula mediante mediciones de calibre a lo largo de un periodo de 10 a 14 días mediante el uso de la fórmula  $0,52 \times$  longitud (mm) x ancho (mm), usando el ancho como la dimensión más pequeña. Véase, por ejemplo, Kuo *et al.*, PNAS, 2001, 98: 4605-4610. Los valores de P se determinaron usando un ensayo t de dos colas asumiendo varianzas desiguales (Microsoft EXCEL).

**Resultados.** Dado que la escisión de VEGFR2 inactivará el receptor, entonces la administración sistémica de cantidades terapéuticamente eficaces de proteasa, bien como proteína purificada o codificada por adenovirus dará como resultado la inhibición del crecimiento del tumor LLC. El fracaso en la inhibición del crecimiento tumoral se

puede deber a la inactivación de la proteasa por inhibidores de proteasa endógenos (serpinas). En un caso de este tipo, la unión covalente de la serpina a la proteasa será detectable como un aumento en el tamaño de la proteasa mediante SDS-PAGE. Se pueden realizar mutaciones en la proteasa que la harán resistente a la inactivación por serpina.

5

### Ejemplo 12. Escisión de VEGFR

Como se muestra en la FIG. 1, las proteasas de armazón y variantes se han expresado de forma satisfactoria como proteasas activas en sistemas de expresión de levadura o bacterianos en cantidades multi-miligramo. Véase, por ejemplo, los protocolos descritos en Harris 1998 y Takeuchi, 2000. MT-SP1 se sometió a ingeniería genética para obtener muteínas que escinden selectivamente Flk-1/KDR.

10

15

Las muteínas de MT-SP1 adicionales, mostradas en la Tabla 11, se clonaron y expresaron como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la FIG. 1, las variantes de MT-SP1 se expresaron en bacterias y se purificaron a partir de cuerpos de inclusión. Cada proteasa conserva actividad catalítica elevada y es >99% pura haciéndolas apropiadas para estudios de cristalografía.

20

La Tabla 13 representa las secuencias de escisión diana potenciales para MT-SP1 de tipo silvestre y de muteína. En la tabla, "Hyd" representa cualquier aminoácido hidrófobo (es decir, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina o triptófano) y "Xxx" representa cualquier aminoácido.

**Tabla 13: Secuencias de Escisión de MT-SP1 Potenciales**

	P4	P3	P2	P1	SEC ID N°
MT-SP1					
Especificidad nativa	K/R	Hyd	Xxx	K/R	10
	Hyd	K/R	Xxx	K/R	11
Secuencias de VEGFR2					
	K	V	G	R	12
	R	V	R	K	13
	R	R	V	R	14
	R	K	T	K	15
	K	T	K	K	16
	T	K	K	R	17

25

### Ejemplo 13. Muteínas que consisten en una, dos y tres mutaciones con selectividad aumentada hacia secuencia de región tronco de VEGFR, RRVR

Múltiples muteínas se caracterizaron mediante creación de perfiles de PSSCL que muestran selectividad aumentada hacia la secuencia de escisión diana RRVR (FIGURA 2A-H). Las mismas se agruparon en dos subclases en base a qué perfil de subsitio estaba más influido por la mutación: P2 o P3 y P4. Las mutaciones de Phe99 a Ala, Ile y Val aumentaron la selectividad de P2 de las proteasas hacia Val y redujeron la especificidad de sustratos que contenían Ala. Este efecto se observa en las variantes F99V MT-SP1 (CB38) y F99I/L172D/Q175D MT-SP1 (CB159) (FIG. 2C y D). Las mutaciones tales como Phe99 a Trp, Asn, Asp, Ala o Arg aumentaron la selectividad de P2 por sustratos que contenían Ala, Ser, Trp, Lys e Ile. Mutaciones adicionales que influían la selectividad de P2 fueron Met180 a Glu y Ala a Trp215 a Tyr y Phe.

35

La mutación de Gln192 a Arg y Glu alteró la selectividad de P3 en solitario. Las mutaciones en Tyr 146 (Asp), Leu172 (Asp), Gln175(Asp), Lys224(Phe) y Met180 (Glu) aumentaron la selectividad de las variantes hacia sustratos que contenían Arg y Lys tanto P3 como P4 al igual que en la variante L172D (CB 18) (FIG. 2B). Agrupar estas mutaciones individuales dio como resultado proteasas variantes con perfiles de P3 y P4 altamente selectivos, tales como las variantes L172D/Q175D(CB83) e Y146D/K224F (CB155)(FIG. 2E y F).

40

**Resultados.** Agrupando las mutaciones identificadas individualmente para limitar la selectividad de proteasa en P2 y en P3/P4, se prepararon múltiples variantes que tenían una selectividad mayor de cuatro veces hacia restos de Arg y Lys en las posiciones P3 y P4 y alteraron la especificidad de P2. Dos variantes F99V/L172D/Q175D (CB151) y F99V/K224F (CB152) son al menos 3 veces más selectivas de Arg y Lys que otros aminoácidos en los subsitios P3

45

y P4 y dos veces tan selectivos para Val con respecto a Ala en el subsitio P2 (FIGURA 2G y H). Estas características en el PSSCL demuestran la eficacia de mutaciones a partir de la Tabla 10 para alterar la selectividad de la proteasa MT-SP1 hacia la secuencia de RRVR deseada.

#### 5 **Ejemplo 14. Exploración de escisión preferencial de sustratos RRVR frente a RQAR**

10 Las proteasas mutantes que coinciden con los perfiles de especificidad deseados, determinados mediante bibliotecas de sustrato, se ensayaron usando sustratos peptídicos individuales que corresponden a la secuencia de escisión deseada para determinar la magnitud del cambio en selectividad. Se diseñaron dos sustratos: Ac-RRVR-AMC y Ac-RQAR-AMC. La segunda secuencia, RQAR, es una secuencia preferida de MT-SP1 determinada mediante creación de perfiles de sustrato. La misma también coincide con la secuencia en la proteasa de longitud completa que se tiene que escindir para activación de proteasa.

15 Se determinaron las constantes cinéticas de Michealis-Menton mediante los métodos cinéticos convencionales. En resumen, el sustrato se diluye en una serie de 12 concentraciones entre 1 mM y 2 goma en 50  $\mu$ l de volumen total de tampón de actividad de MT-SP1 en los pocillos de una placa de ensayo de media área negra de 96 pocillos Costar. La solución se calienta a 30 °C durante cinco minutos y se añadieron 50  $\mu$ l de una solución de proteasa entre 0,1 y 20 nM a los pocillos del ensayo. La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro de fluorescencia (Molecular Devices Gemini XPS) a una longitud de onda de excitación de 380 nm, una longitud de onda de emisión de 450 nm y usando un filtro de punto de corte ajustado a 435 nm. El índice de aumento en fluorescencia se midió a lo largo de 30 minutos tomando lecturas a intervalos de 30 segundos. Las constantes cinéticas  $k_{cat}$ ,  $K_m$  y  $k_{cat}/K_m$  se calcularon graficando la inversa de la concentración de sustrato frente a la inversa de la velocidad de escisión de sustrato y ajustando a la ecuación de Lineweaver-Burk ( $1/\text{velocidad} = (K_m/V_{m\acute{a}x})(1/[S]) + 1/V_{m\acute{a}x}$ , donde  $V_{m\acute{a}x} = [E] \cdot k_{cat}$ ). La constante de especificidad ( $k_{cat}/K_m$ ) es una medida de que también un sustrato se corta por una proteasa particular.

25 *Resultados:* Las constantes de especificidad ( $k_{cat}/K_m$ ) para MT-SP1 de tipo silvestre y siete variantes (FIG. 6) demuestran que los resultados semicuantitativos de selectividad relativa entre RQAR y RRVR obtenidos a partir del PSSCL son consistentes cuando se miden para sustratos individuales. La proteasa de tipo silvestre, MT-SP1, prefiere el sustrato RQAR dos veces más que el sustrato RRVR. Cinco de las seis proteasas variantes prefieren la secuencia diana RRVR con respecto a RQAR. Dos variantes, CB152 y CB159, prefieren RRVR a RQAR en más de 8 veces. La única excepción es CB38 donde el perfil sugirió que la selectividad fue exclusivamente en el subsitio P4. Además de la preferencia relativa de RQAR frente a RRVR, las mediciones cinéticas de sustrato individual definen la eficacia de escisión de sustrato para cada variante. Las variantes CB 155 y CB 159 cortan el sustrato Ac-RRVR-AMC en 2,2 y 2,3  $\times 10^5$  M $\cdot$ V $^{-1}$ , respectivamente (FIG. 6). Estos índices están dentro de 3 veces del MT-SP1 de tipo silvestre.

#### 30 **Ejemplo 15. Exploración de escisión de sustratos individuales**

40 Proteasas mutantes que coinciden con los perfiles de especificidad deseados como se determina, por ejemplo, mediante bibliotecas de sustrato, se ensayan usando sustratos peptídicos individuales que corresponden a la secuencia de escisión deseada. Las mediciones cinéticas individuales se realizan usando un fluorímetro Spectra-Max Delta (Molecular Devices). Cada proteasa se diluye hasta entre 50 nM y 1  $\mu$ M en tampón de ensayo. Todos los sustratos ACC se diluyen con MeSO hasta entre 5 y 500  $\mu$ M, mientras que los sustratos de AMC [DEFINED] se diluyen hasta entre 20 y 2000  $\mu$ M. Cada ensayo contiene menos del 5% de MeSO. La actividad enzimática se supervisa cada 15 segundos a longitudes de onda de excitación y emisión de 380 nm y 460 nm, respectivamente, durante un total de 10 minutos. Todos los ensayos se realizaron en DMSO al 1%.

#### 50 **Ejemplo 16. Exploración de escisión de proteínas de longitud completa**

55 Proteasas variantes se ensayan para determinar que las mismas escindirán la secuencia deseada cuando se presenten en el contexto de la proteína de longitud completa y la actividad de la proteína diana se ensaya para verificar que su función se ha destruido por el acontecimiento de escisión. El acontecimiento de escisión se supervisa mediante SDS-PAGE después de incubar la proteína de longitud completa purificada con la proteasa variante. La proteína se visualiza usando tinción de azul de Coomassie convencional, mediante autorradiografía usando proteína marcada radiactivamente o mediante transferencia de Western usando el anticuerpo apropiado. Como alternativa, si la proteína diana es un receptor de superficie celular, las células que expresan la proteína diana se exponen a la proteasa variante. El acontecimiento de escisión se supervisa lisando las células y después separando la proteína mediante SDS-PAGE, seguido por visualización mediante transferencia de Western. Como alternativa, el receptor soluble liberado mediante proteólisis se cuantifica mediante ELISA.

#### **Escisión de VEGF**

65 El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un mitógeno específico de células endoteliales producido normalmente durante la embriogénesis y la vida adulta. VEGF es un mediador significativo de la angiogénesis en

una diversidad de procesos normales y patológicos, incluyendo desarrollos de tumor. Se han identificado tres receptores afines de afinidad elevada para VEGF; VEGFR-1/FIM, VEGFR-2/KDR y VEGFR-3/Flt-4.

Para determinar si MT-SP1 escinde la molécula de señalización además del receptor, se ensayó una versión recombinante de 165 aminoácidos de VEGF, VEGF<sup>165</sup>, mediante SDS-PAGE. VEGF<sup>165</sup> se reconstituyó en PBS hasta una concentración de 0,2 µg/µl y se diluyó hasta una concentración final de 5 µM. Las soluciones sin proteasa y MT-SP1 o CB152 100 nM se incubaron con el VEGF a 37 °C durante cinco horas. Los productos de escisión de proteína resultantes se desglucosilaron, se separaron mediante SDS-PAGE y se tiñeron con plata (FIG. 11). MT-SP1 escinde eficazmente VEGF<sup>165</sup> en las condiciones de ensayo mientras que la variante más selectiva CB152 no lo hace. Este resultado demuestra que MT-SP1 de tipo silvestre se puede usar para bloquear la señalización de VEGF a través de dos mecanismos diferentes: escisión del mitógeno y escisión del receptor. CB152, una variante con selectividad estrecha para la secuencia RRVR en la región tronco de VEGFR2, no escinde VEGF, pero sí escinde VEGFR y se puede dosificar a concentraciones más elevadas debido a toxicidad reducida.

### 15 **Escisión de VEGFR**

<sup>125</sup>I-VEGFR (40.000 cpm) se incubó con concentraciones variables de proteasa, las muestras se someten a ebullición en tampón de ensayo de SDS-PAGE y se examinan en un gel de poliacrilamida al 12%. Los geles se secan y se exponen a película de rayos X (Kodak) a -70 °C.

### 20 **Ensayo de Unión a VEGFR**

<sup>125</sup>I- VEGFR o PMN se incuban con concentraciones variables de proteasas como anteriormente. La unión de <sup>125</sup>I-VEGFR expuesto a proteasas a PMN normal o la unión de <sup>125</sup>I-VEGFR normal a PMN expuesto a proteasas, se cuantifica usando escintilación. En resumen, 10<sup>5</sup> células se incuban con concentraciones variables de <sup>125</sup>I- VEGFR en placas de filtro de 96 pocillos (Millipore) en presencia de inhibidores de proteasa. Las células se lavan tres veces mediante aspiración por vacío y se añaden 30 µl de fluido de escintilación (Wallac) a cada pocillo. La escintilación se cuenta en un contador de escintilación Wallac Microbeta (adaptado de van Kessel *et al.*, J. Immunol. (1991) 147: 3862-3868 y Porteau *et al.*, JBC (1991) 266: 18846-18853).

### 30 **Ejemplo 17. Medición de actividad de MT-SP1 en suero.**

La actividad de MT-SP1 y tripsina se ensayó en presencia de concentraciones crecientes de suero fetal bovino. Las concentraciones elevadas de inhibidores de proteasa macromoleculares presentes en el suero lo hace un buen sistema *in vitro* para ensayar si una proteasa sería activa *in vivo*. MTSP y tripsina se resuspendieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) a 100 nM y 80 nM, respectivamente, con concentraciones de suero creciente (0-10%) en un volumen final de 10 µl. Se añadió un sustrato peptídico fluorogénico (Leu-Val-Arg-aminometilcumarina) a una concentración final de 5 µM y la fluorescencia se detectó en un lector de placas de fluorescencia (Molecular Devices) con una longitud de onda de excitación de 380 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm.

Como se muestra en la FIG. 5, la tripsina muestra actividad muy fuerte en suero al 0%, usando la enzima todo el sustrato después de ~400 segundos. Sin embargo, incluso en la concentración más baja de suero (2,5%), la actividad de tripsina se reduce drásticamente, presumiblemente debido a la unión de inhibidores de proteasa macromoleculares. MT-SP1, por otra parte, muestra prácticamente la misma actividad en todas las concentraciones de suero, lo que sugiere que no existen inhibidores de proteasa endógenos en el suero que inactiven MT-SP1.

### **EQUIVALENTES**

Aunque se han descrito en el presente documento realizaciones particulares en detalle, esto se ha hecho a modo de ejemplo con fines de ilustración únicamente y no tiene por objeto ser limitante con respecto al alcance de las reivindicaciones adjuntas, que están a continuación. En particular, se contempla por los inventores que diversas sustituciones, alteraciones y modificaciones se pueden realizar en la invención sin alejarse del espíritu y del alcance de la invención como se define por las reivindicaciones. La elección del método de exploración, el armazón de proteasa o el tipo de biblioteca se cree que es un asunto de rutina para un experto en la materia con conocimiento en las realizaciones descritas en el presente documento. Se considera que otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición para formular un medicamento para escindir factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF) o receptor del VEGF (VEGFR), en el que:
- 5 la composición comprende una serina proteasa 1 de tipo de membrana de muteína (MT-SP1) que comprende al menos una mutación en una proteasa MT-SP1 de armazón;
- la proteasa MT-SP1 de armazón tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95% a la secuencia de aminoácidos de MT-SP1 de tipo silvestre expuesta en SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 o una parte catalíticamente activa de la misma;
- 10 la muteína de MT-SP1 tiene al menos una mutación en una o más posiciones seleccionadas entre 41, 58, 59, 60b, 60c, 61, 62, 63, 97, 98, 100, 146, 151, 169, 170, 172, 173, 175, 176, 177, 178, 179, 181 y 224, en la que la numeración se basa en quimotripsina;
- la mutación aumenta la actividad y/o modifica la especificidad diana de la proteasa muteína de MT-SP1 en comparación con la proteasa MT-SP1 de tipo silvestre; y
- 15 la proteasa muteína de MT-SP1 escinde VEGF o VEGFR.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que la proteasa muteína de MT-SP1 tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N° o SEC ID N°: 2.
- 20 3. El uso de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que los restos mutados modifican la especificidad diana.
4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la mutación se selecciona entre D60bl, D60bF, D60bR, D60bA, R60cl, R60cF, R60cD, R60cA, R60cW, F97N, F97D, F97E, F97A, F97W, F97R, Y146F, Y146N, Y146D, Y146E, Y146A, Y146W, Y146R, L172N, L172D, L172E, L172A, L172V, L172F, L172R, Q175D, Q175E, Q175A, Q175V, Q175F, Q175R, K224A, K224F, K224V y K224D.
- 25 5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la muteína de MT-SP1 contiene una mutación adicional que se selecciona entre mutaciones que corresponden a D60bl, D60bF, D60bR, D60bA, R60cl, R60cF, R60cD, R60cA, R60cW, F97N, F97D, F97E, F97A, F97W, F97R, F99Y, F99W, F99N, F99D, F99E, F99A, F99V, F99R, Y146F, Y146N, Y146D, Y146E, Y146A, Y146W, Y146R, L172N, L172D, L172E, L172A, L172V, L172F, L172R, Q175D, Q175E, Q175A, Q175V, Q175F, Q175R, M180E, M180Y, M180R, M180A, Q192A, Q192V, Q192D, Q192R, Q192F, W215F, W215Y, W215I, W215D, W215R, D217A, D217V, D217F, D217E, D217R, K224A, K224F, K224V y K224D.
- 30 6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la muteína de MT-SP1 contiene mutaciones seleccionadas entre las mutaciones que corresponden a L172D/Q175D, F99V/L172D, F99V/L172D/Q175D, F99V/K224F, F99V/M180E, F99V/Y146D, Y146D/K224F, Y146D/M180E, Y146D/L172D/Q175D, F99V/Y146D/L172D/Q175D, F99I/L172D/Q175D, F99L/L172D/Q175D, F99T/L172D/Q175D, F99A/L172D/Q175D, F99I/K224F, F99L/K224F, F99T/K224F, F99V/Y146D/K224F, F99I/Y146D/K224F, F99UY146D/K224F y F99T/Y146D/K224F.
- 35 7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la escisión de VEGF o VEGFR inhibe la angiogénesis o abroga la proliferación celular.
- 45 8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la escisión de VEGF o VEGFR inhibe la angiogénesis específica de tumor.
9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la escisión de VEGF o VEGFR logra el tratamiento de una patología relacionada con angiogénesis en un paciente.
- 50 10. El uso de la reivindicación 9, en el que la patología se selecciona entre degeneración macular, cáncer, inflamación y diabetes.
11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que:
- 55 la muteína de MT-SP1 escinde un sitio de reconocimiento de sustrato de P4-P3-P2-P1 en el VEGFR diana; y el sitio P4- P3-P2-P1 comprende una secuencia de cuatro aminoácidos encontrada en un VEGFR.
12. El uso de la reivindicación 11, en el que la muteína de MT-SP1 es más selectiva de un sitio de reconocimiento de sustrato de VEGFR en comparación con el sitio de reconocimiento de sustrato de MT-SP1 de tipo silvestre.
- 60 13. El uso de la reivindicación 11, en el que el sitio de reconocimiento de sustrato de P4-P3-P2-P1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre RRVR, KVGR, RVRK, RGTK, KTKK y KTRR.
14. El uso de la reivindicación 11, en el que el sitio de reconocimiento de sustrato de P4-P3-P2-P1 comprende una secuencia de aminoácidos de RRVR.
- 65



15. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 5-14, en el que la muteína de MT-SP contiene una mutación seleccionada entre L172D, Y146F, N175D, D217F, F99V y K224F.
- 5 16. El uso de la reivindicación 15, en el que la muteína de MT-SP1 contiene mutaciones K224F y F99V.
17. El uso de la reivindicación 12, en el que VEGFR es VEGF-R2/flk-1/KDR.
18. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que la especificidad diana de la proteasa muteína de MT-SP1 está aumentada en al menos 2 veces en comparación con la proteasa MT-SP1 de tipo silvestre.
- 10 19. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 10-18, en el que la patología es cáncer.
20. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que la composición comprende además un agente anticáncer.
- 15 21. Una proteasa muteína de MT-SP1, que comprende al menos una mutación en un armazón, en la que: la proteasa MT-SP1 de armazón tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95% a la secuencia de aminoácidos de MT-SP1 de tipo silvestre expuesta en SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 o una parte catalíticamente activa de la misma;
- 20 la muteína de MT-SP1 tiene al menos una mutación en una o más posiciones seleccionadas entre 41, 58, 59, 60b, 60c, 61, 62, 63, 97, 98, 100, 146, 151, 169, 170, 172, 173, 175, 176, 177, 178, 179, 181 y 224, en la que la numeración se basa en quimotripsina;
- la mutación modifica la especificidad diana y/o aumenta la actividad de la proteasa muteína de MT-SP1 en comparación con la proteasa MT-SP1 de tipo silvestre; y
- 25 la proteasa muteína de MT-SP1 escinde VEGF o un VEGFR.
22. La proteasa MT-SP1 mutante de la reivindicación 21, en la que el polipéptido de armazón de MT-SP1 se expone en SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2.
- 30 23. La proteasa muteína de MT-SP1 de la reivindicación 21 o reivindicación 22, en la que una mutación se selecciona entre D60bl, D60bF, D60bR, D60bA, R60cl, R60cF, R60cD, R60cA, R60cW, F97N, F97D, F97E, F97A, F97W, F97R, Y146F, Y146N, Y146D, Y146E, Y146A, Y146W, Y146R, L172N, L172D, L172E, L172A, L172V, L172F, L172R, Q175D, Q175E, Q175A, Q175V, Q175F, Q175R, K224A, K224F, K224V y K224D.
- 35 24. La proteasa muteína de MT-SP1 de cualquiera de las reivindicaciones 21-23, en la que una mutación adicional se selecciona entre las mutaciones que corresponden a D60bl, D60bF, D60bR, D60bA, R60cl, R60cF, R60cD, R60cA, R60cW, F97N, F97D, F97E, F97A, F97W, F97R, F99Y, F99W, F99N, F99D, F99E, F99A, F99V, F99R, Y146F, Y146N, Y146D, Y146E, Y146A, Y146W, Y146R, L172N, L172D, L172E, L172A, L172V, L172F, L172R, Q175D, Q175E, Q175A, Q175V, Q175F, Q175R, M180E, M180Y, M180R, M180A, Q192A, Q192V, Q192D, Q192R, Q192F, W215F, W215Y, W215I, W215D, W215R, D217A, D217V, D217F, D217E, D217R, K224A, K224F, K224V y K224D.
- 40 25. La proteasa muteína de MT-SP1 de cualquiera de las reivindicaciones 21-24, que comprende mutaciones seleccionadas entre las mutaciones que corresponden a L172D/Q175D, F99V/L172D, F99V/L172D/Q175D, F99V/K224F, F99V/M180E, F99V/Y146D, Y146D/K224F, Y146D/M180E, Y146D/L172D/Q175D, F99V/Y146D/L172D/Q175D, F99I/L172D/Q175D, F99L/L172D/Q175D, F99T/L172D/Q175D, F99A/L172D/Q175D, F99I/K224F, F99L/K224F, F99T/K224F, F99V/Y146D/K224F, F99I/Y146D/K224F, F99L/Y146D/K224F y F99T/Y146D/K224F.
- 45 26. La proteasa muteína de MT-SP1 de la reivindicación 24, que comprende mutaciones seleccionadas entre mutaciones que corresponden a L172D, Y146F, Q175D, D217F, F99V y K224F, en la que la numeración se basa en quimotripsina.
- 50 27. La proteasa muteína de MT-SP1 de la reivindicación 26, que comprende mutaciones que corresponden a F99V/K224F o Y146D/K224F.
- 55 28. Una composición, que comprende una proteasa MT-SP1 mutante de cualquiera de las reivindicaciones 21-27.
29. La composición de la reivindicación 28 que es una composición farmacéutica.
- 60

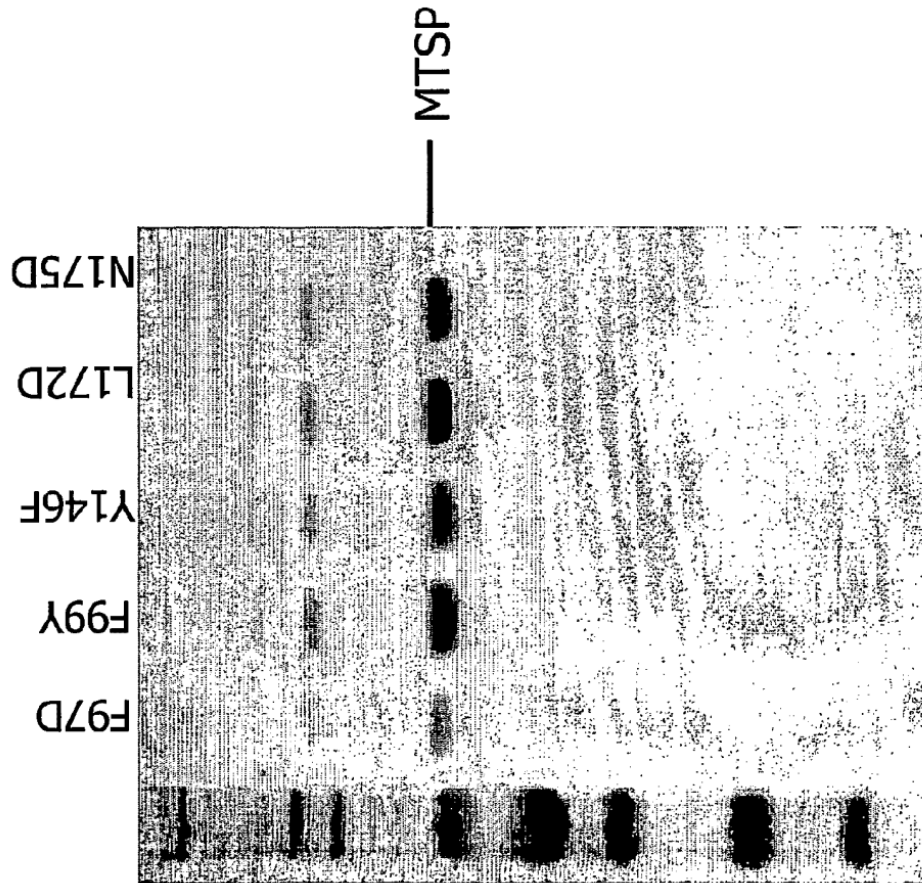
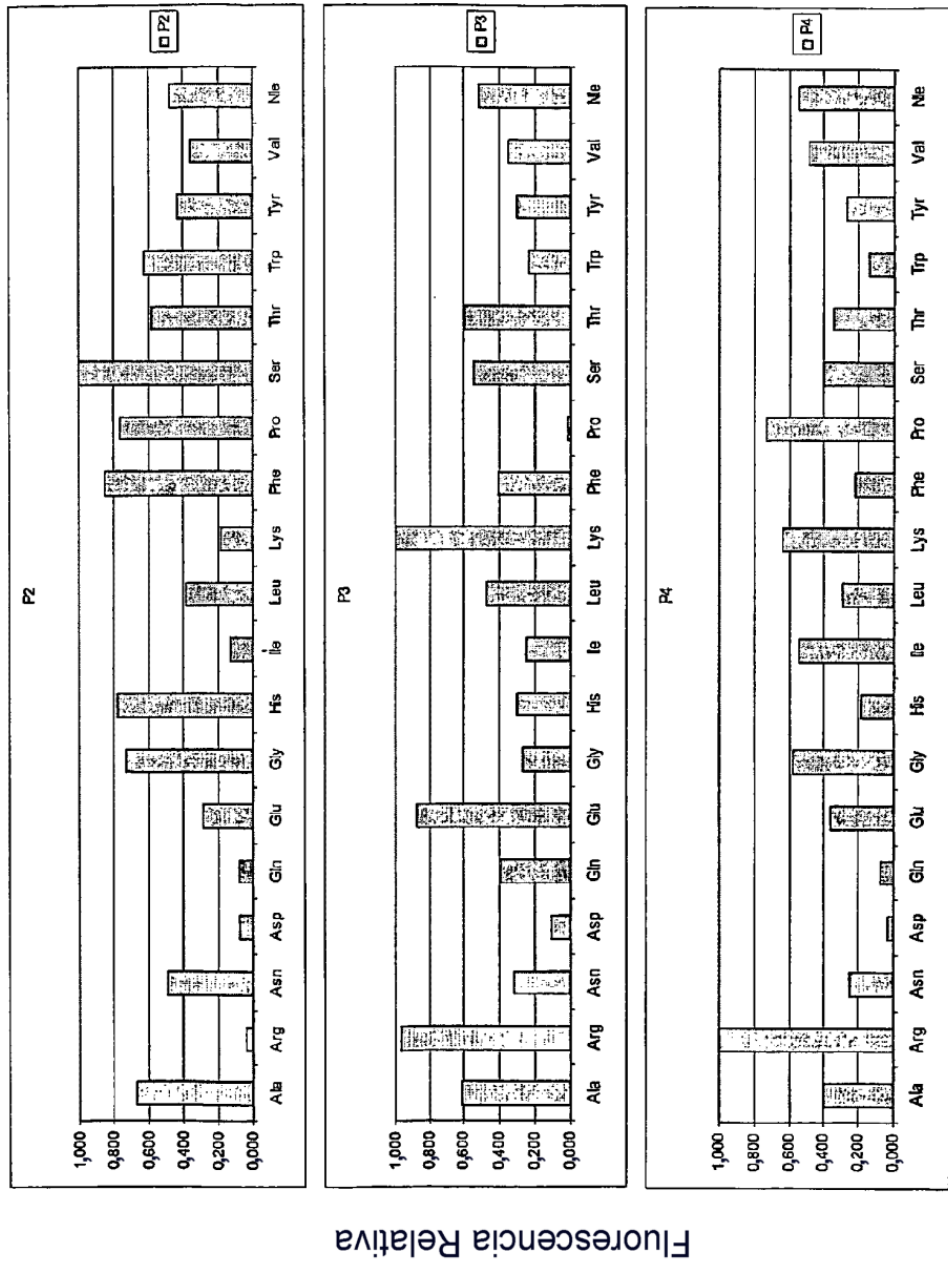


Figura 1: Análisis de SDS-PAGE de Mutantes de MTSP1 a continuación de Purificación con Ni-NTA

Figura 2A: Perfil de PSSCL de MTSP1 de Tipo Silvestre que Muestra Especificidad Extendida de Subsitos P2-P4

Preferencia de aminoácido



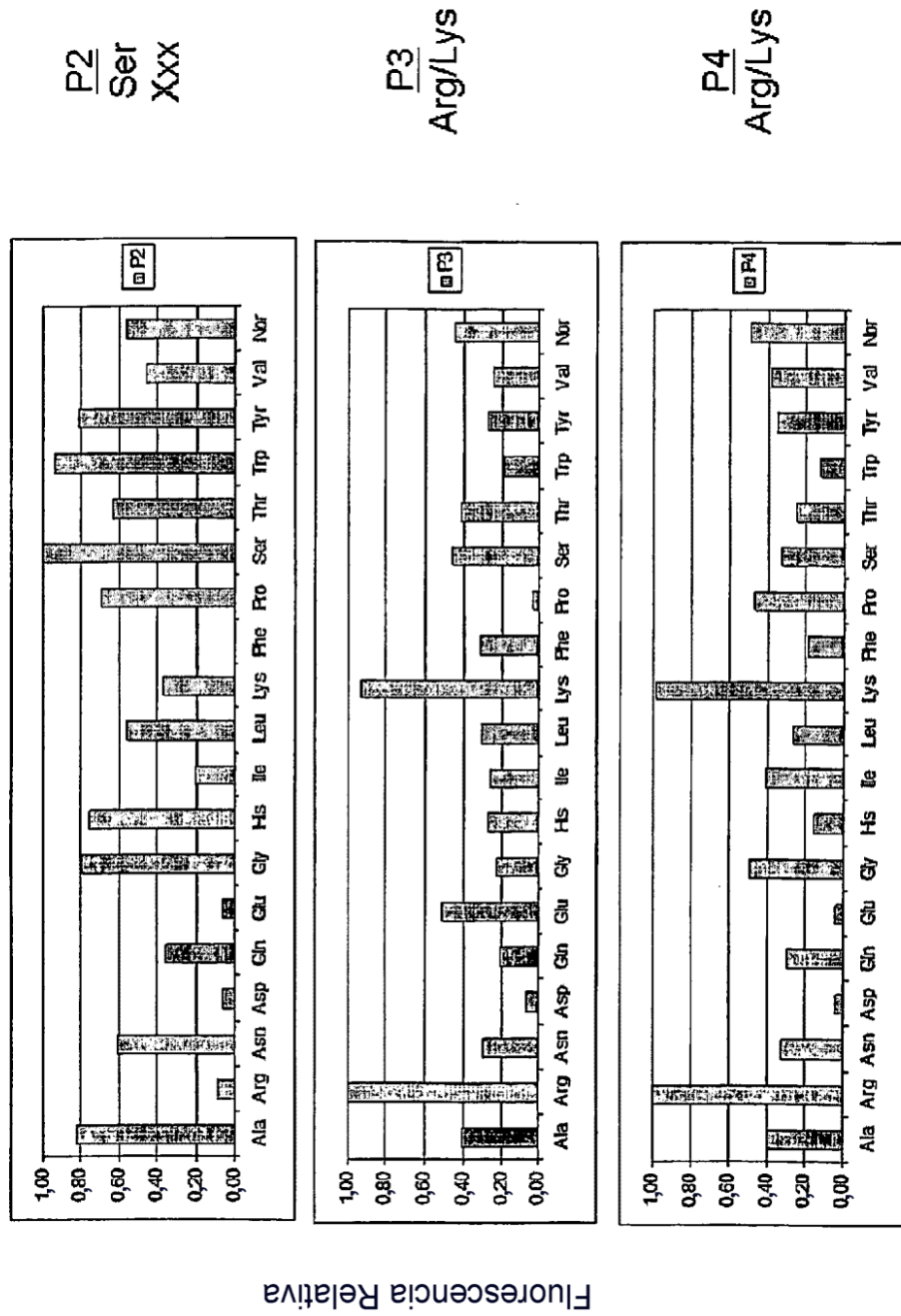
P2  
Ser  
Xxx

P3  
Arg/Lys  
Xxx

P4  
Arg/Lys  
Xxx

Preferencia de aminoácido

**Figura 2B: PSSCL de MT-SP1 L 172D (CB18) que muestra especificidad extendida de sitios P2-P4**



Preferencia  
de aminoácido

Figura 2C: PSSCL de MT-SP1 F99V (CB38)  
que muestra especificidad extendida de sitios P2-P4

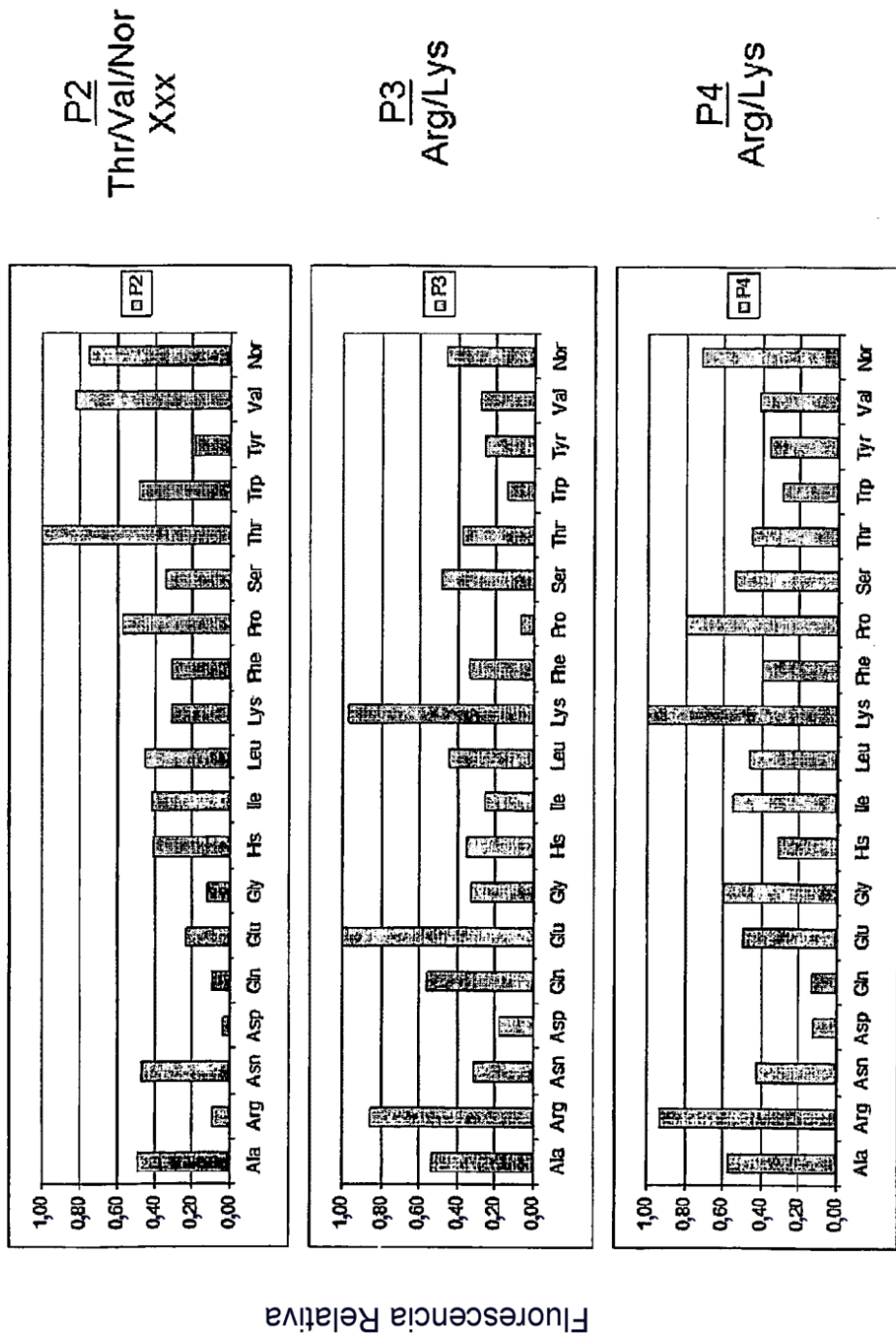
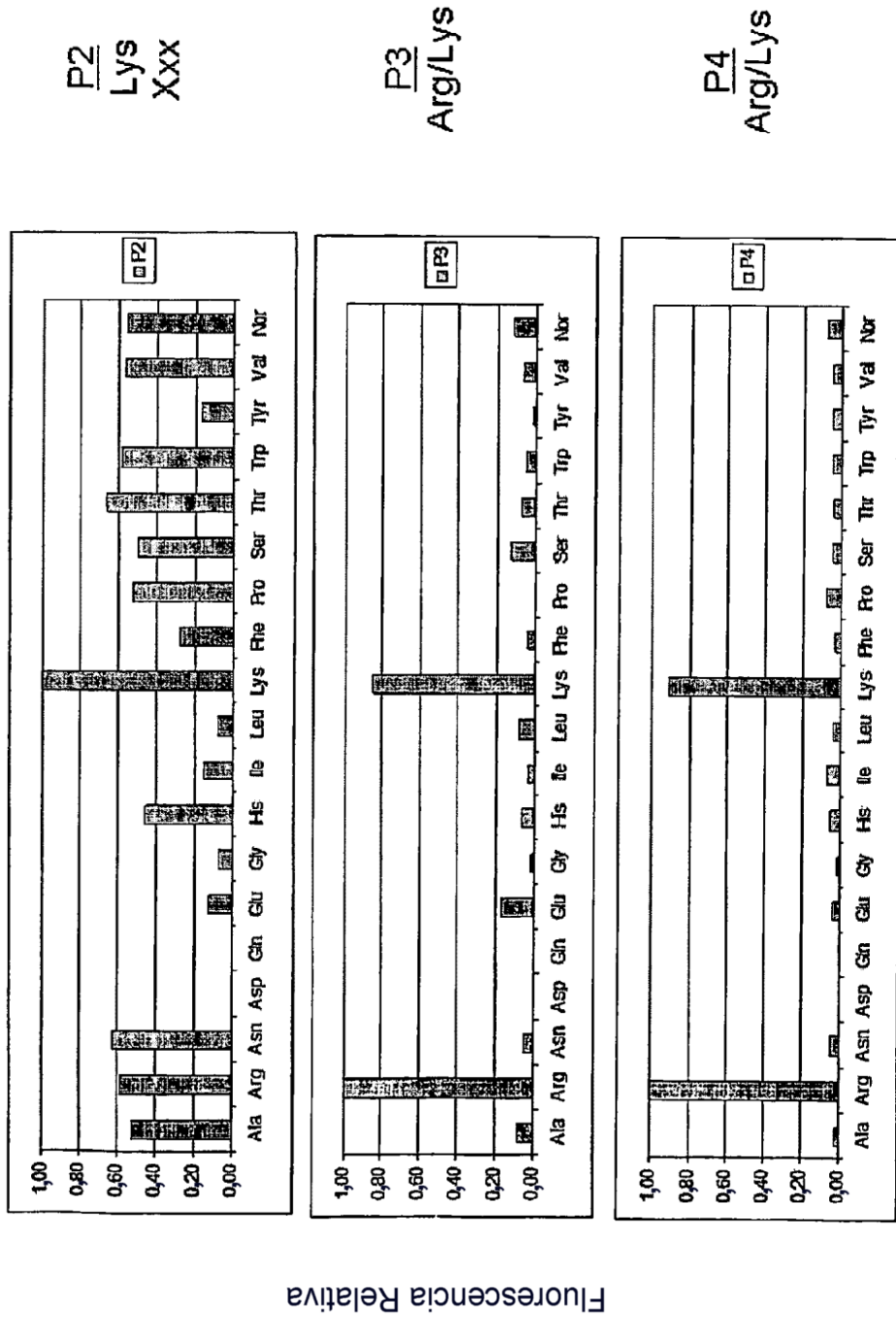


Figura 2D: PSSCL de MT-SP1 L172D/Q175D/F99I (CB159) que muestra especificidad extendida de sitios P2-P4

Preferencia de aminoácido



Preferencia  
de aminoácido

Figura 2E: PSSCL de MT-SP1 L172D/Q175D (CB83)  
que muestra especificidad extendida de sitios P2-P4

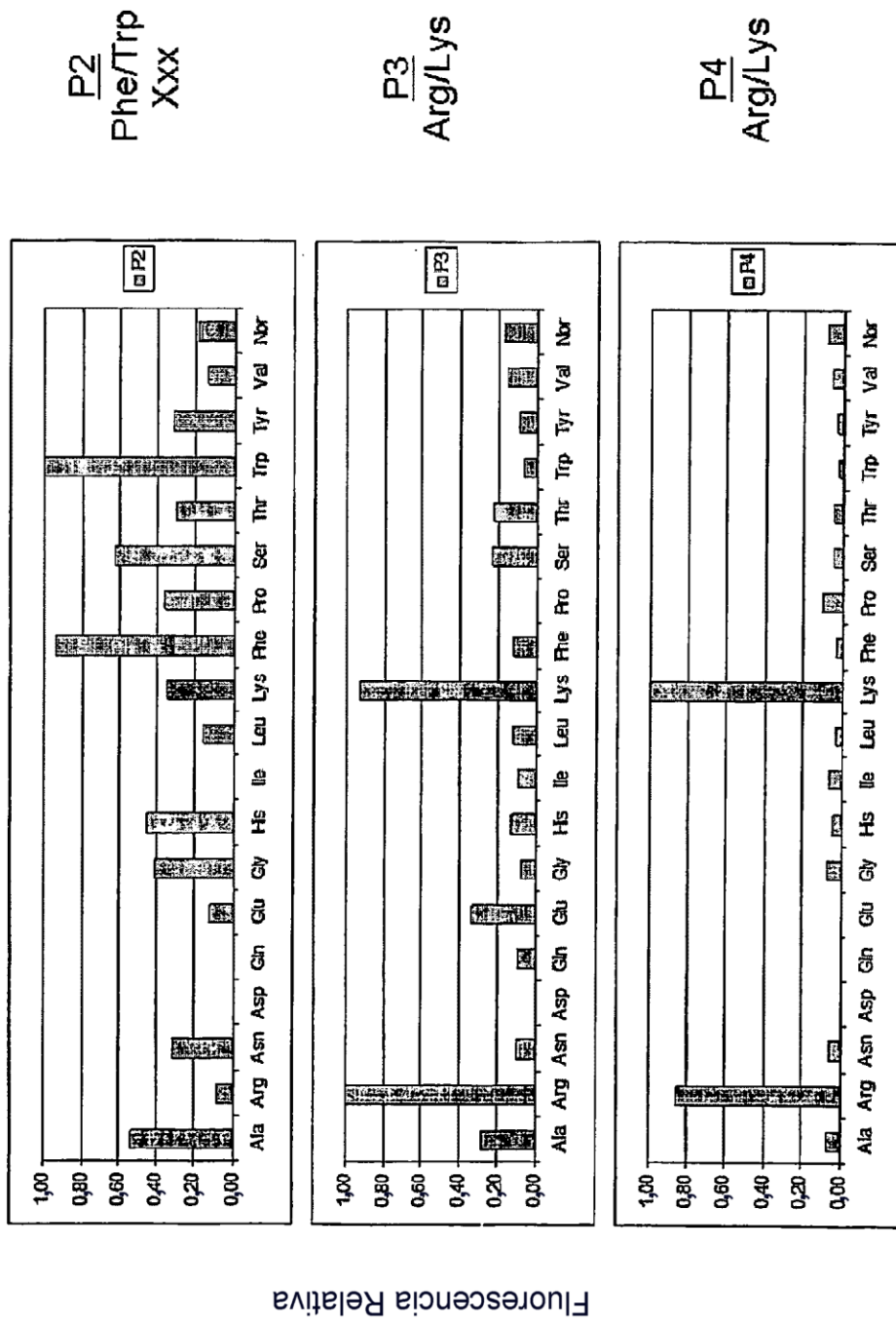


Figura 2F: PSSCL de MT-SP1 Y146D/K224F (CB155) que muestra especificidad extendida de sitios P2-P4

Preferencia de aminoácido

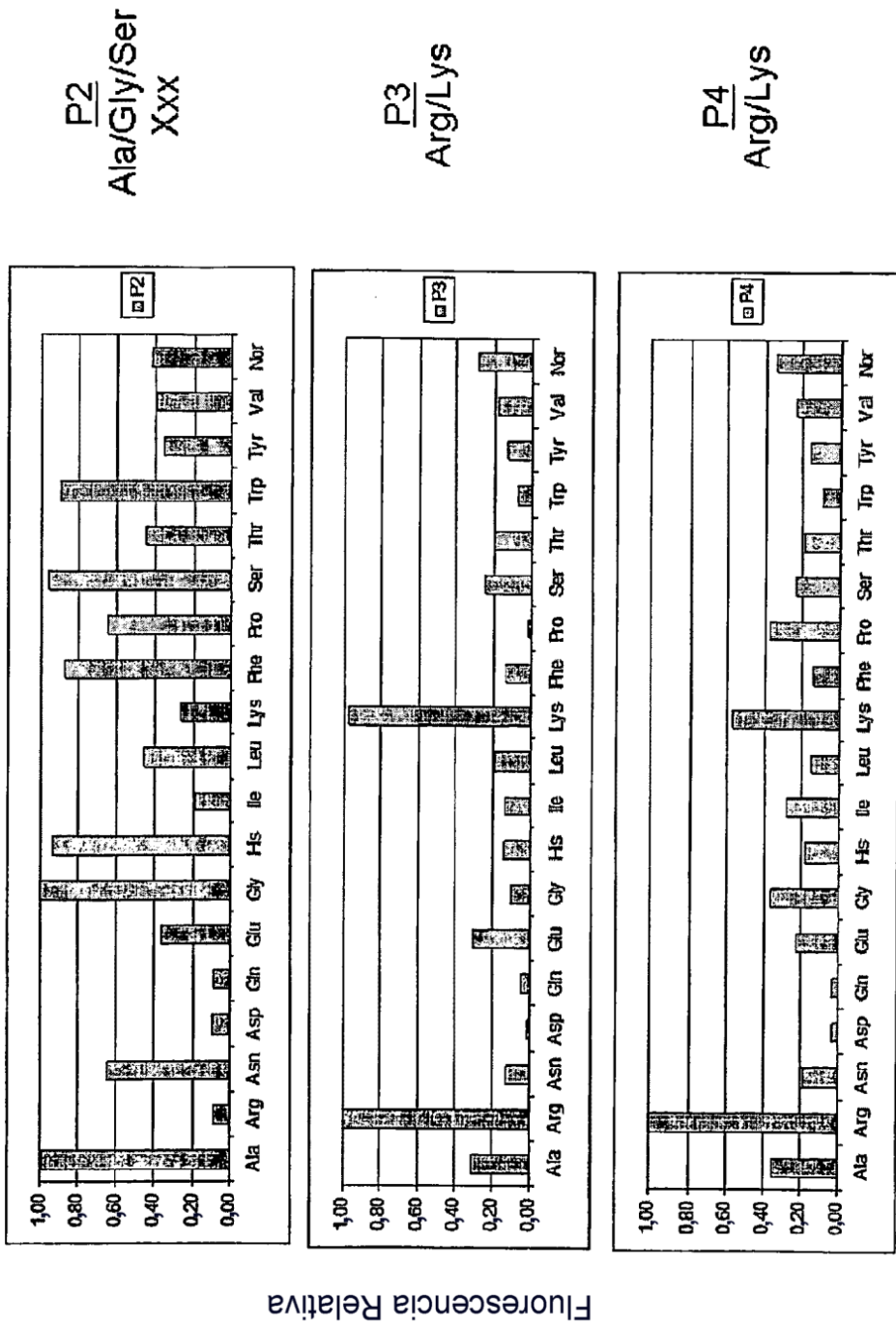
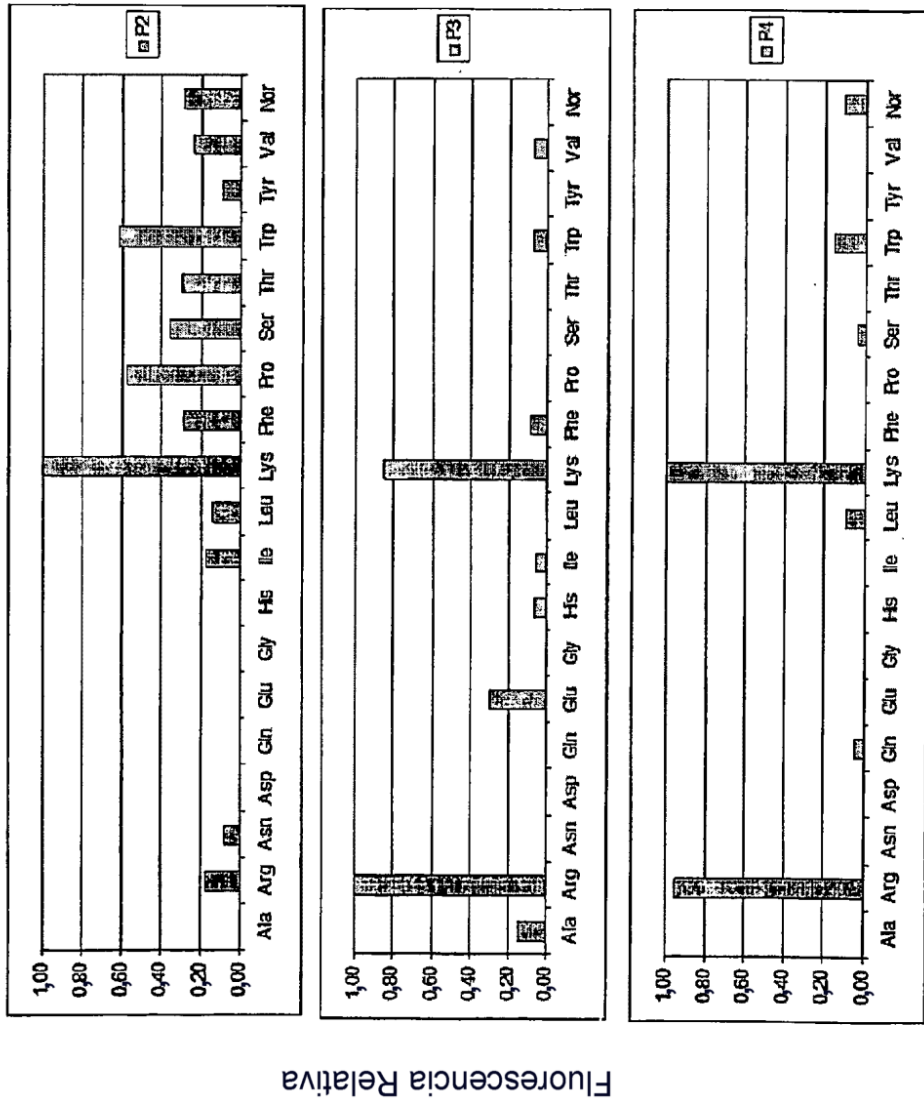




Figura 2G: PSSCL de MT-SP1 L172D/Q175D/F99V (CB151) que muestra especificidad extendida de sitios P2-P4

Preferencia de aminoácido



Preferencia  
de aminoácido

Figura 2H: PSSCL de MT-SP1 K224/F99V (CB152)  
que muestra especificidad extendida de sitios P2-P4

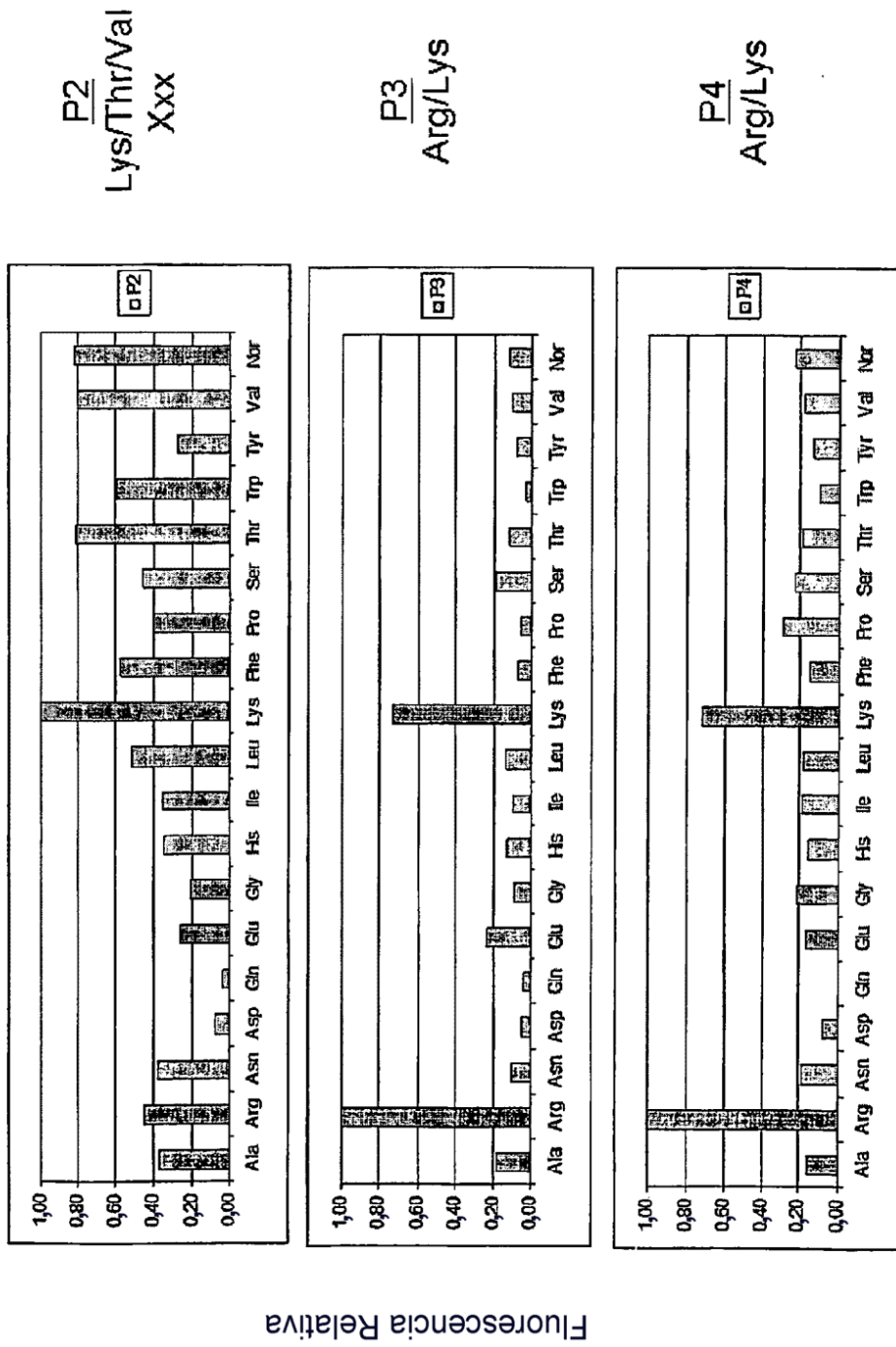
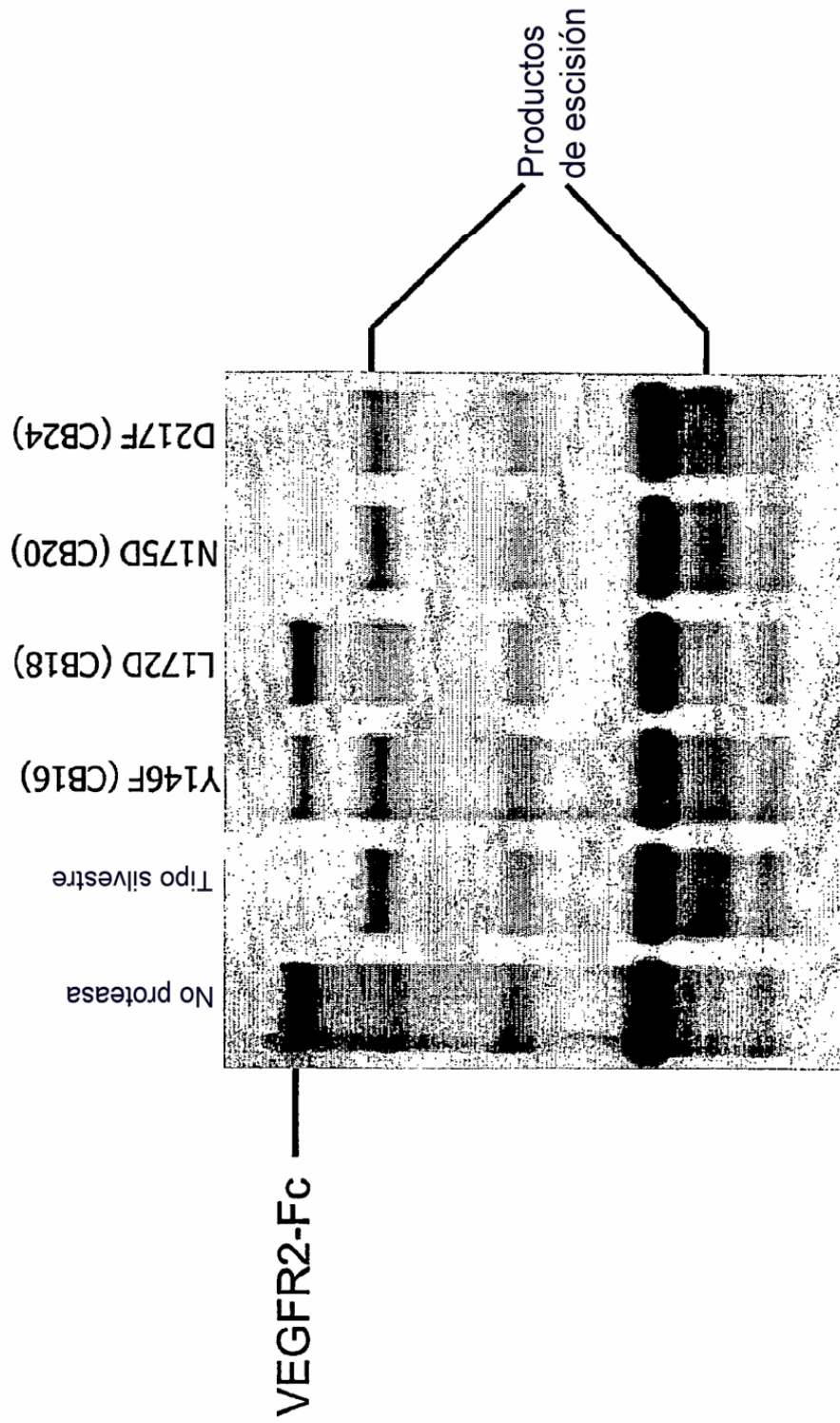
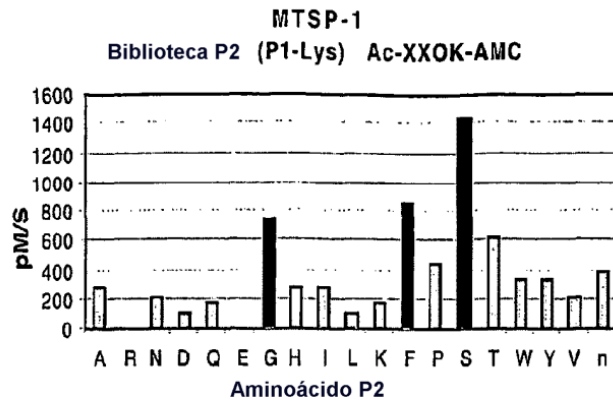


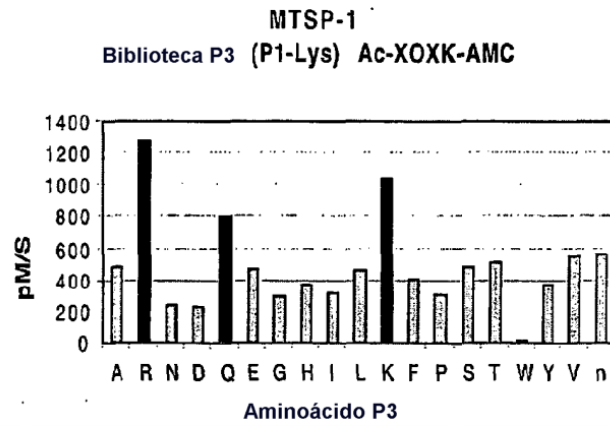
Figura 3: Escisión de VEGFR2-Fc mediante MTSP1 Variante



**Figura 4A:**



**Figura 4B:**



**Figura 4C:**

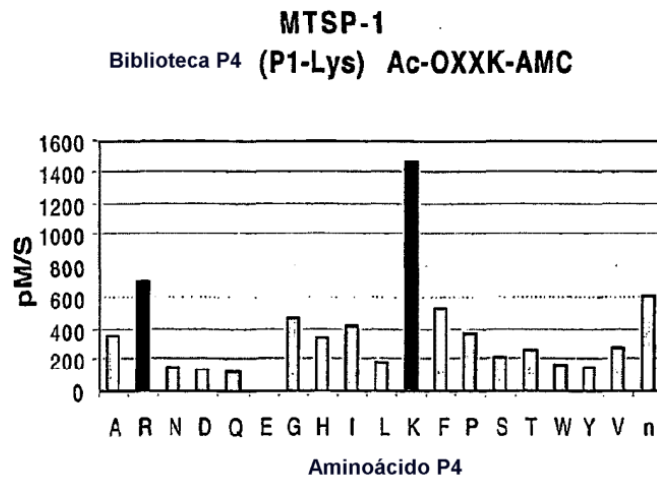
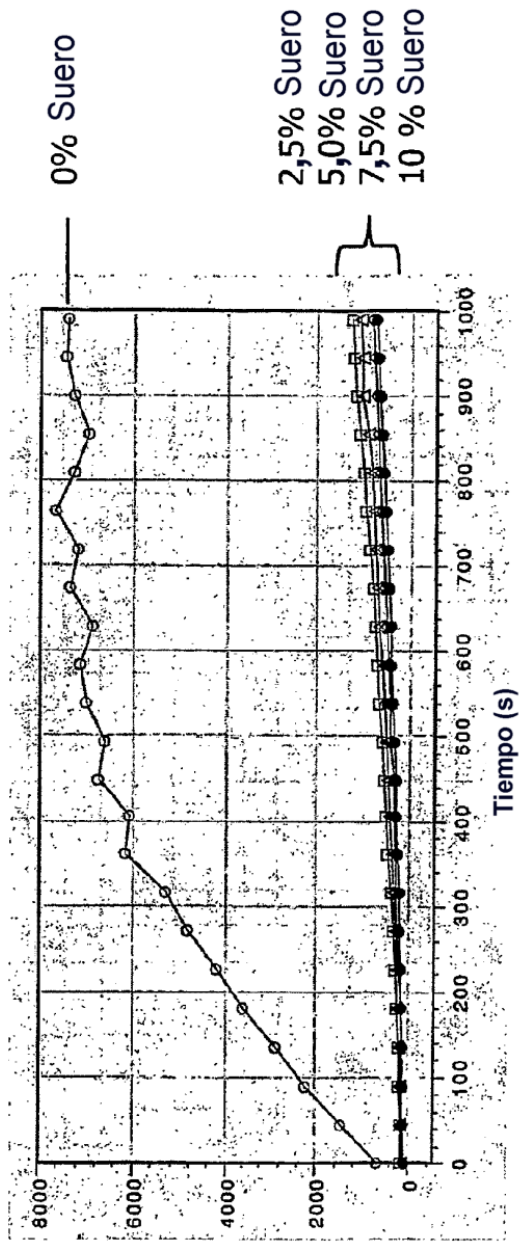
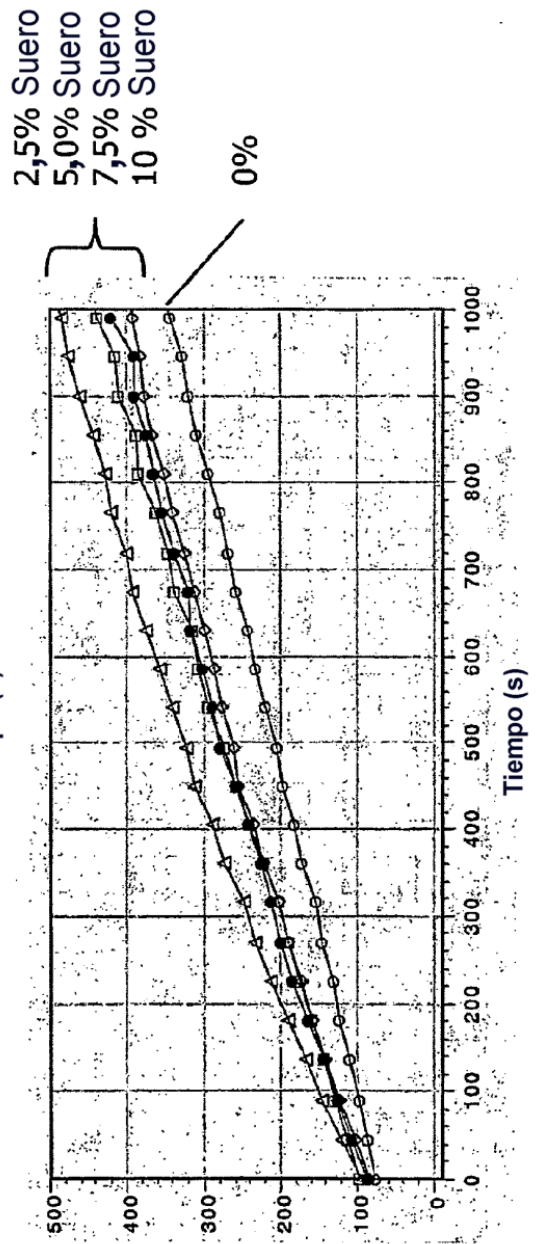


Figura 5 Actividad proteolítica en suero



Tripsina



MTSP1

Figura 6: Constantes de Especificidad para el Sustrato Diana RRVR frente al Sustrato de Tipo Silvestre RQAR para una Serie Selectiva de Variantes de MT-SP1

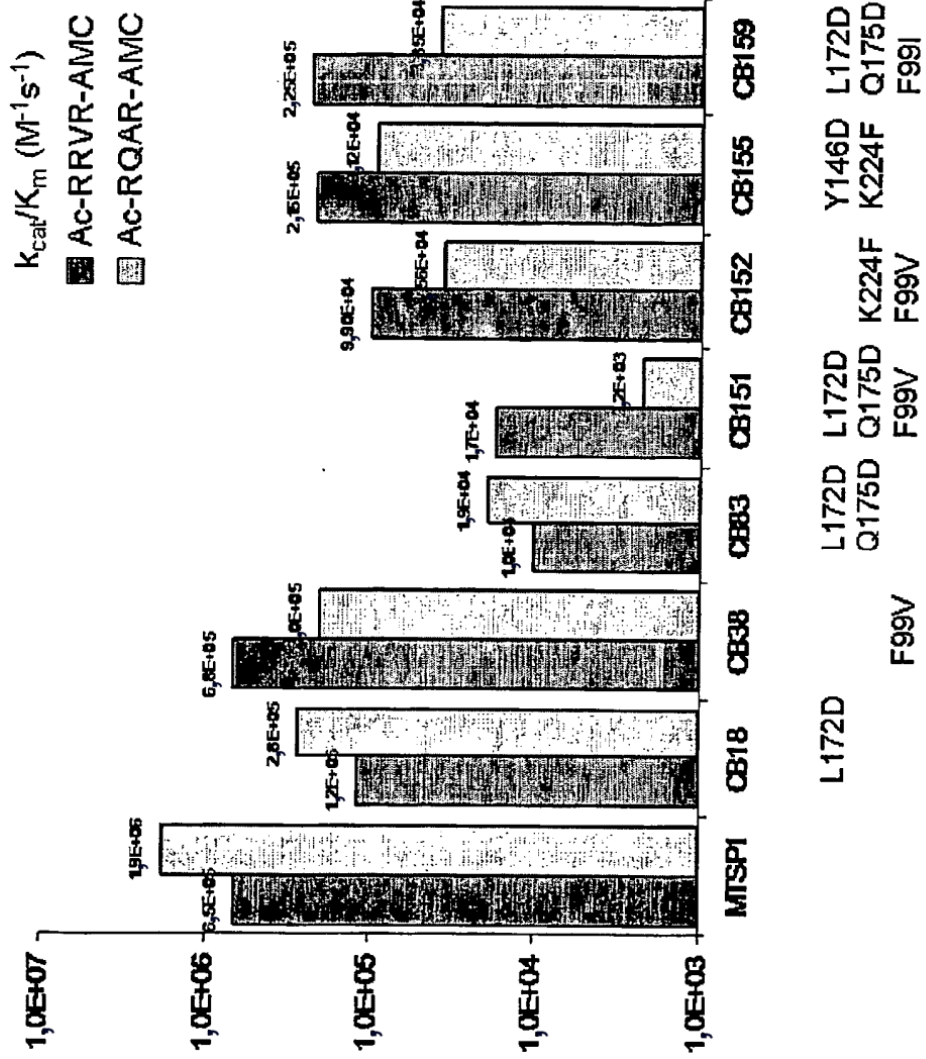


Figura 7A Inhibición de proliferación dependiente de VEGF de células endoteliales

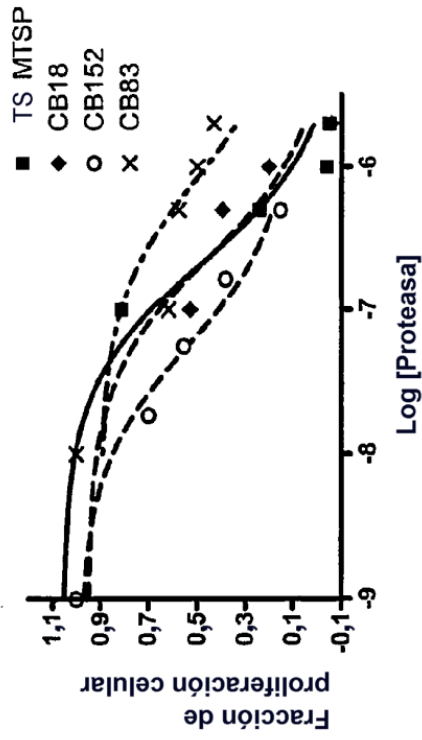


Figura 7B Escisión de VEGFR2 de HUVEC

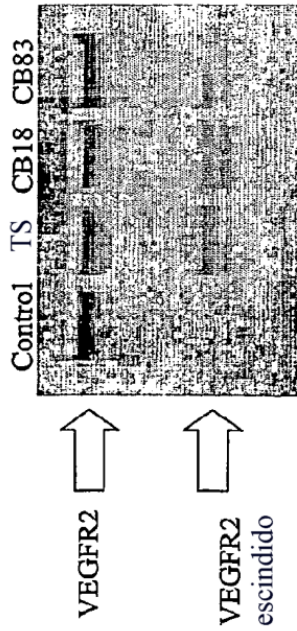
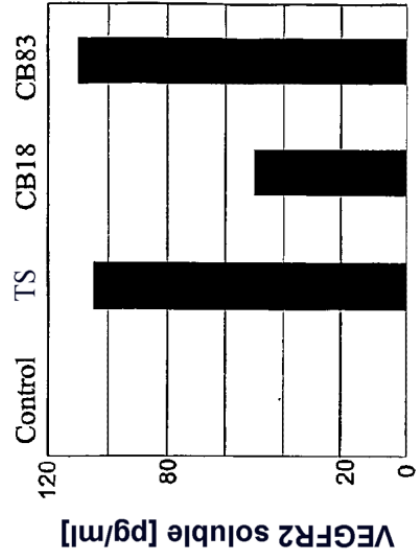


Figura 7C Liberación de VEGFR2 soluble de HUVEC



**Figura 8 Dosis tolerada máxima aguda de variantes de MTSP**

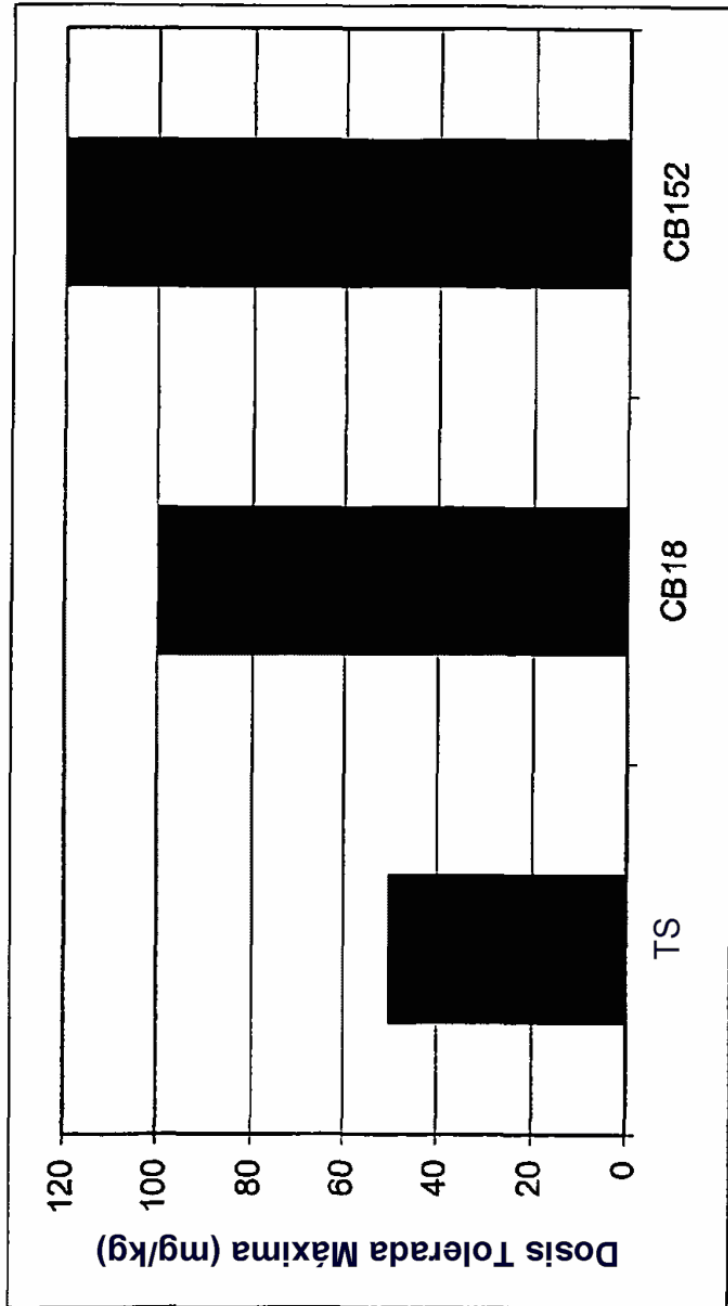




Figura 9 Variantes de MTSP inhiben la neovascularización en un ensayo de microbolsa de córnea de ratón

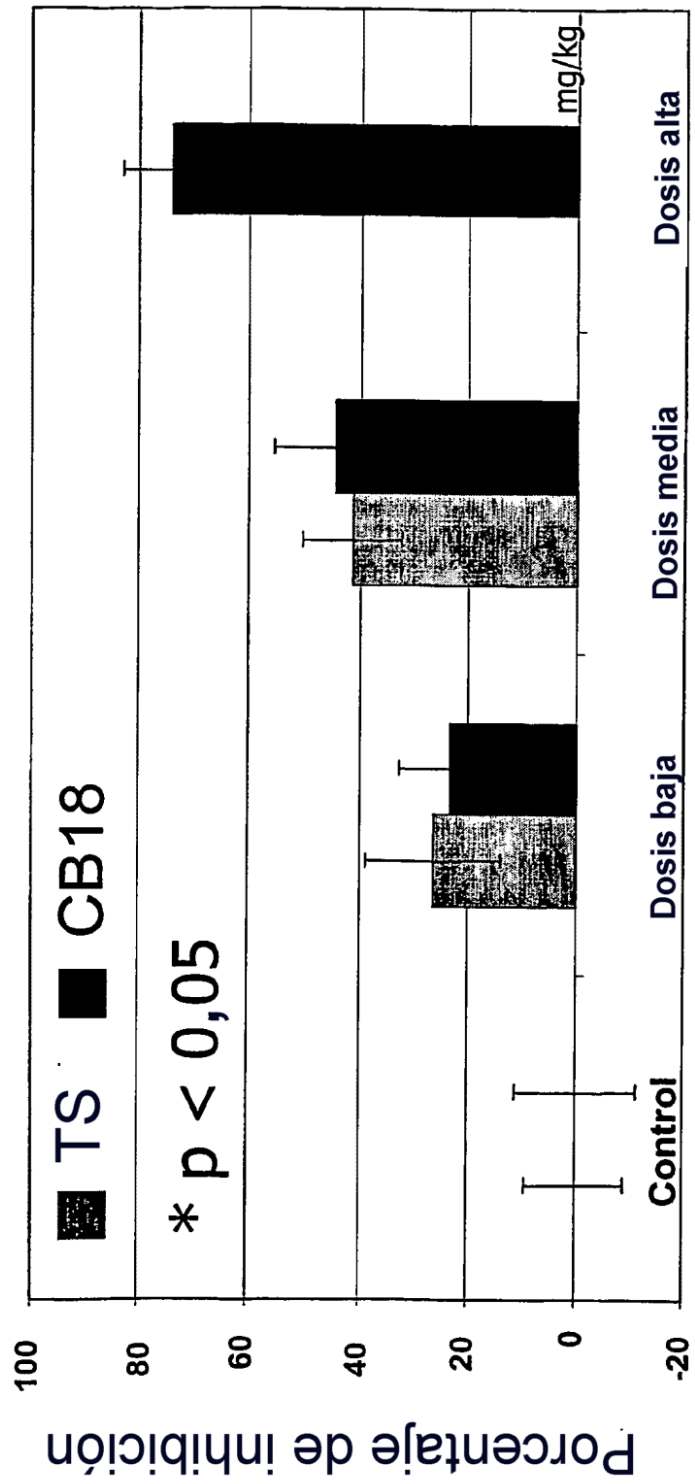


Figura 10 Variantes de MTSP inhiben permeabilidad vascular en el ensayo de Miles de ratón

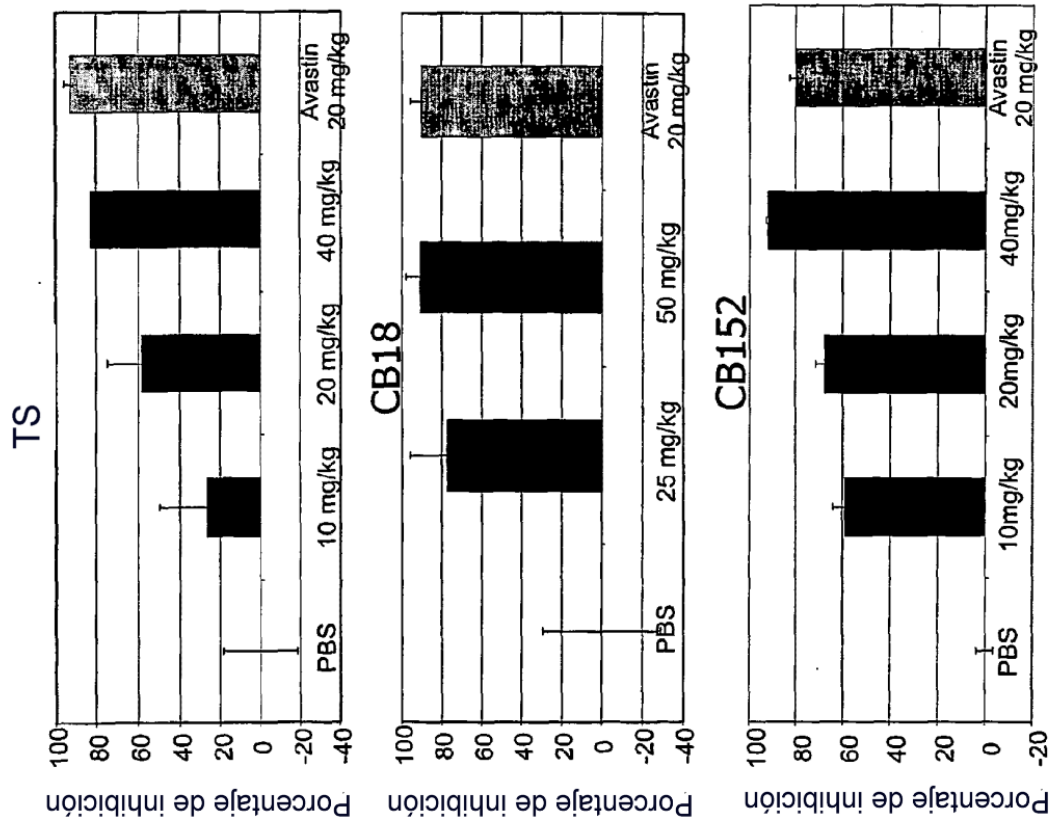


Figura 11: VEGF se corta por MT-SP1 pero no por la variante más específica, CB152

