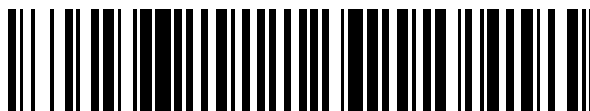


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 306**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/48** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2006 E 06817259 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 1940457**

54 Título: **Proteasas modificadas que inhiben la activación del complemento**

30 Prioridad:

**21.10.2005 US 729817 P**

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

**09.04.2013**

73 Titular/es:

**CATALYST BIOSCIENCES, INC. (100.0%)  
260 LITTLEFIELD AVENUE  
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**MADISON, EDWIN L.;  
NGUYEN, JACK;  
RUGGLES, SANDRA WAUGH y  
THANOS, CHRISTOPHER D.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 400 306 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

Proteasas modificadas que inhiben la activación del complemento

5 **Solicitudes relacionadas**

Se reivindican los derechos de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos N° de Serie 60/729.817, presentada el 21 de Octubre de 2005, titulada "PROTEASAS MODIFICADAS QUE INHIBEN LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO", de Edwin Madison.

10 Esta solicitud está relacionada con la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie (Expediente del Mandatario N° 19049-003001/4903), presentada el 20 de Octubre del 2006, titulada "PROTEASAS MODIFICADAS QUE INHIBEN LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO", de Edwin Madison, Jack Nguyen, Sandra Waugh Ruggles y Christopher Thanos, que también reivindican prioridad con respecto a la Solicitud Provisional de Estados Unidos  
15 N° de Serie 60/729.817.

La presente solicitud está relacionada con la solicitud de Estados Unidos N° de Serie 10/677.977, presentada el 2 de Octubre de 2003, titulada *Métodos de Generación y Selección de Proteasas con Especificidad Modificada*; con la solicitud de Estados Unidos N° de Serie 11/104.110, presentada el 12 de Abril de 2005, titulada *Escisión de VEGF y del Receptor de VEGF por MTSP-1 de Tipo Silvestre y Mutante*; y con la solicitud de Estados Unidos N° de Serie 11/104.111, presentada el 12 de Abril de 2005, titulada *Escisión de VEGFR y del Receptor de VEGF por Proteasas de Tipo Silvestre y Mutantes*.

25 **Campo de la invención**

Se proporcionan medios para modular el sistema del complemento. En particular, se describen compuestos que inhiben la activación del complemento y se describen compuestos que promueven la actividad del complemento. Los compuestos son agentes terapéuticos debido a sus efectos sobre el sistema del complemento. Por tanto, los compuestos que inhiben la activación del complemento pueden usarse para el tratamiento de trastornos isquémicos y de reperfusión, incluyendo infarto de miocardio e ictus, septicemia, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades con un componente inflamatorio, incluyendo la Enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos.

35 **Antecedentes**

El sistema del complemento (C) es parte del sistema inmunitario y desempeña una función en la eliminación de patógenos invasores y en el inicio de la respuesta inflamatoria. El sistema del complemento de seres humanos y de otros mamíferos implica más de 30 proteínas solubles y unidas a la membrana que participan en una secuencia de reacciones ordenada que da como resultado la activación del complemento. El sistema del complemento sanguíneo tiene una amplia serie de funciones asociadas con un amplio espectro de mecanismos de defensa del hospedador que incluyen acciones antimicrobianas y antivirales. Los productos derivados de la activación de los componentes C incluyen las moléculas de reconocimiento de elementos no propios C3b, C4b y C5b, así como las anafilatoxinas C3a, C4a y C5a que influyen sobre diversas respuestas inmunitarias celulares. Estas anafilatoxinas actúan como agentes proinflamatorios.

45 El sistema del complemento se compone de una serie de enzimas y proteínas no enzimáticas y receptores. La activación de complemento se produce por uno de tres modos primarios conocidos como la ruta "clásica", la ruta "alternativa" y la ruta de las "lectinas" (véase la FIGURA 1). Estas rutas pueden diferenciarse por el proceso que inicia la activación del complemento. La ruta clásica se inicia mediante complejos anticuerpo-antígeno o formas agregadas de inmunoglobulinas; la ruta alternativa se inicia mediante el reconocimiento de estructuras sobre superficies microbianas y celulares; y la ruta de la lectina, que es una ruta independiente de anticuerpos, se inicia mediante la unión de la lectina de unión a manano (MBL, denominada también proteína de unión a manosa) a hidratos de carbono tales como los que se presentan en la superficie de las bacterias o virus. La activación de las cascadas da como resultado la producción de complejos implicados en la proteólisis o lisis celular y de péptidos implicados en la opsonización, anafilaxis y quimiotaxis.

60 La cascada del complemento, que es un componente central de la respuesta inmunitaria de un animal, es una cascada irreversible. Numerosos cofactores proteicos regulan el proceso. La regulación inapropiada, típicamente la activación inapropiada, del proceso es un aspecto de, o puede ocurrir en, diversos trastornos que implican respuestas inflamatorias inapropiadas, tales como los observados en enfermedades inflamatorias agudas y crónicas. Estas enfermedades y trastornos incluyen enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide y lupus, trastornos cardíacos y otras enfermedades inflamatorias tales como septicemia y lesión de isquemia-reperfusión.

65 Debido a la implicación de las rutas del complemento en una diversidad de enfermedades y afecciones, los componentes de las rutas del complemento son dianas para una intervención terapéutica, particularmente para la inhibición de la ruta. Los ejemplos de dichos agentes terapéuticos incluyen agentes terapéuticos de molécula

pequeña sintéticos y naturales, inhibidores de anticuerpos y formas solubles recombinantes de reguladores del complemento de membrana. Hay limitaciones en las estrategias para la preparación de dichos agentes terapéuticos. Las moléculas pequeñas tienen cortas semividas *in vivo* y necesitan infundirse de forma continua para mantener la inhibición del complemento, lo cual limita su papel, especialmente en enfermedades crónicas. Los anticuerpos terapéuticos dan como resultado una respuesta inmunitaria en un sujeto y, por tanto, pueden conducir a complicaciones en el tratamiento, particularmente en tratamientos diseñados para modular respuestas inmunitarias. Por lo tanto, existe una necesidad no satisfecha de agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por el complemento en los que intervenga la activación del complemento. Estas incluyen enfermedades inflamatorias agudas y crónicas. Por consiguiente, entre los objetos del presente documento, existe un objeto para proporcionar dichos agentes terapéuticos para dirigir la activación de la cascada del complemento y para proporcionar agentes terapéuticos y métodos del tratamiento de enfermedades.

### Sumario

15 La invención proporciona:

(1) Una proteasa modificada que no pertenece al complemento, que comprende modificaciones en uno cualquiera o más aminoácidos de una proteasa armazón, en la que:

20 el resto o los restos de aminoácidos modificados aumentan una o ambas de la especificidad por un sustrato diana o la actividad hacia un sustrato diana, en la que el sustrato diana es una proteína del complemento; la proteasa armazón es una proteasa MT-SP1, variantes alélicas, isoformas o una parte catalíticamente activa de la misma; y la proteasa modificada que no pertenece al complemento comprende:

25 a) al menos dos o más modificaciones en la proteasa armazón, en la que una modificación está en la posición 146 y la segunda modificación está en la posición 224, en base a la numeración de la quimotripsina, a condición de que:

30 (i) cuando la proteasa solo incluye dos modificaciones, la proteasa no incluya Y146D ni K224F como las dos modificaciones; y  
(ii) cuando la proteasa contiene tres modificaciones, la proteasa no incluya F99V o I o L o T con Y146D y K224F; o

35 b) una o más modificaciones en la proteasa armazón seleccionadas entre una cualquiera o más de D96A, D96V, D96F, D96S, D96T, F99S, F99G, Q174H, Q174A, Q174V, Q174F, Q174R, Q174K, Q174L, Q174Y, Q192L, Q192I, Q192E, Q192K, Q192Y, D217Q, D217N, D217H, Q221aD, en base a la numeración de la quimotripsina; o

40 c) una o más modificaciones en la proteasa armazón seleccionadas entre I41T, I41A, 141L, 141F, 141D, 141E, G147E, G151L, Q221aL, Q221aE, Q175H, Q175L, Q175W, Q175Y, Q175K, K224L, K224R, K224N, K224T, K224Y y K224S, en base a la numeración de la quimotripsina.

(2) La proteasa modificada que no pertenece al complemento de (1), en la que la proteasa MT-SP1 o una parte catalíticamente activa de la misma comprende una secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 2 o 10.

45 (3) La proteasa modificada que no pertenece al complemento de (1), en la que:

la proteasa modificada que no pertenece al complemento se indica en a); y la proteasa modificada que no pertenece al complemento comprende una modificación en la posición 151, en base a la numeración de la quimotripsina.

(4) La proteasa modificada que no pertenece al complemento de (1), en la que:

la proteasa modificada que no pertenece al complemento se indica en a); y la proteasa modificada que no pertenece al complemento comprende una modificación en la posición 41, en base a la numeración de la quimotripsina.

(5) La proteasa modificada que no pertenece al complemento de (1), en la que:

60 la proteasa modificada que no pertenece al complemento se indica en a); y la modificación o modificaciones en una proteasa MT-SP1 o una parte catalíticamente activa de la misma se seleccionan entre Y146E/K224N, I41T/Y146E/Q175D/K224R, I41T/Y146D/K224F, I41T/Y146E/Q175D/K224N, I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224L, Y146E/Q221aE/K224F, I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224R, I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224N, Y146E/K224R, Y146E/Q175D/K224N, Y146D/K224R, I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224F, Y46E/Q75D/K224R, Y146E/K224L, Y146D/Q175D/K224R, Y146D/Q175L/K224L, Y146D/Q175W/K224L, Y146D/K224L,

Y146E/Q221aE/K224R, Y146E/K224A, Y146D/Q175H/K224L, Y146D/Q175Y/K224L, Y146E/K224Y, Y146D/Q175F/K224L, Y46D/Q221aL/K224S, I41EA146D/K224L, Y146D/D217F/K224L, H143V/Y146D/K224F, Y146E/K224F, Y146A/K224F, Y146E/K224T, I41T/Y146E/K224L, 141F/Y146D/K224F, I41L/Y146D/K224F, I41T/Y146D/G151L/K224F, I41A/Y146D/K224F, I41E/Y146D/K224F, I41D/Y146D/K224L, I41D/Y146D/K224F, Y146N/K224F, I41T/Y146D/Q175D/K224F, Y146D/Q192A/K224F, I41T/Y146D/Q175D/K224L, I41T/Y146D/Q175D/K224R, I41T/Y146D/Q175D/K224N, I41T/Y146D/G151L/Q175D/K224F, 141T/Y146D/G151L/Q175D/K224L, I41T/Y146D/G151L/Q175D/K224R, I41T/Y146D/G151L/Q175D/K224N, I41T/Y146E/Q175D/K224F, I41T/Y146E/Q175D/K224L, 141T/Y146D/G151L/K224N, Y146D/Q175D/K224N, Y146D/G151L/K224N, Y146D/Q175R/K224N, Y146D/Q175K/K224N, Y146D/Q175H/K224N, I41T/Y146D/G151L/Q175K/K224F, I41T/Y146D/G151L/Q175R/K224F, I41T/Y146D/G151L/Q175Y/K224F, I41T/Y146D/G151L/Q175K/K224N, I41T/Y146D/G151L/Q175R/K224N, I41T/Y146D/G151L/Q175H/K224N Y146D/K224N, I41T/Y146D/K224L, I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224N, I41T/Y146D/K224N e I41T/Y146D/G151L/Q175Y/K224N, en base a la numeración de la quimotripsina.

(6) La proteasa modificada que no pertenece al complemento de (5), en la que la proteasa modificada que no pertenece al complemento tiene una secuencia de aminoácidos indicada en una cualquiera de las SEC ID N°: 552-559, 561-566, 570-580, 583-591, 594-602, 604, 606-613, 615-620, 624-634, 637-645, 648-656, 658 o 663-710.

(7) La proteasa modificada que no pertenece al complemento de (1) o (2), en la que:

la proteasa modificada que no pertenece al complemento se indica en b) o c); y la modificación o modificaciones en una proteasa MT-SP1 o una parte catalíticamente activa de la misma corresponde a un polipéptido MT-SP1 modificado que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en una cualquiera de las SEC ID N°: 41-51, 56, 57, 60-64, 67, 419-429, 434, 435, 438-442, 445, 524, 525, 527-530, 532, 533, 560, 568, 614 o 622.

(8) Una composición farmacéutica, que comprende una proteasa modificada que no pertenece al complemento de una cualquiera de (1)-(7).

(9) Una combinación, que comprende:

(a) una composición farmacéutica de (8); y (b) un segundo agente o agentes para el tratamiento de un trastorno mediado por el complemento, en el que el segundo agente es un agente antiinflamatorio o un anticoagulante.

(10) La composición farmacéutica de (8), que comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

(11) La composición farmacéutica de (10), en la que la composición farmacéutica se formula para administración sistémica, oral, nasal, pulmonar, local o tópica.

(12) Un kit que comprende la composición farmacéutica de (8), un dispositivo para la administración de la composición y, opcionalmente, instrucciones para la administración.

(13) Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera de las proteasas modificadas que no pertenecen al complemento de (1)-(7).

(14) Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de (13).

(15) Una célula que comprende el vector de (14).

(16) Una proteína de fusión que comprende una parte catalíticamente activa de una proteasa de una cualquiera de las reivindicaciones (1)-(7) que está fusionada a un polipéptido que no es una proteasa.

(17) Una proteasa modificada que no pertenece al complemento de uno cualquiera de (1)-(7) para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado entre un trastorno inflamatorio, un trastorno neurodegenerativo y un trastorno cardiovascular, en el que:

la proteasa que no pertenece al complemento escinde uno cualquiera o más sustratos diana de una ruta del complemento de tal manera que se inhibe la activación del complemento en una ruta que comprende el sustrato diana; y la inhibición de la activación del complemento conduce a una reducción de los síntomas inflamatorios asociados a la enfermedad o al trastorno.

5 (18) La proteasa modificada que no pertenece al complemento para su uso de acuerdo con (17), en el que el trastorno mediado por el complemento se selecciona entre septicemia, artritis Reumatoide (AR), glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP), Esclerosis Múltiple (EM), Miastenia grave (MG), asma, enfermedad intestinal inflamatoria, lesión tisular inflamatoria aguda mediada por el complejo inmune (CI), Enfermedad de Alzheimer (EA) y lesión de isquemia-reperfundición.

(19) La proteasa modificada que no pertenece al complemento para su uso de acuerdo con (17), en el que el trastorno mediado por el complemento es el síndrome de Guillan-Barré.

10 (20) La proteasa modificada que no pertenece al complemento para su uso de acuerdo con (18), en el que la lesión de isquemia-reperfundición se produce por un suceso o tratamiento seleccionado entre infarto de miocardio (IM), ictus, angioplastia, injerto de derivación de arteria coronaria, derivación cardiopulmonar (DCP) y hemodiálisis.

15 (21) La proteasa modificada que no pertenece al complemento para su uso de acuerdo con cualquiera de (17)-(20), en el que el trastorno mediado por el complemento se produce como resultado del tratamiento de un sujeto.

20 (22) La proteasa modificada que no pertenece al complemento para su uso de acuerdo con (21), en el que el tratamiento produce lesión de isquemia-reperfundición mediada por el complemento.

(23) La proteasa modificada que no pertenece al complemento para su uso de acuerdo con (22), en el que el tratamiento es angioplastia o injerto de derivación de arteria coronaria.

## 25 **Breve descripción de las figuras**

La **Figura 1** representa una visión general de las rutas del complemento clásica, de la lectina y alternativa y la activación del complejo del complemento terminal, el complejo de ataque a la membrana (CAM). En particular, la figura representa muchas de las más de 30 proteínas que participan en la cascada del complemento, su acción dentro de la cascada y, si fuera aplicable, sus puntos de convergencia entre las rutas del complemento. Por ejemplo, las tres rutas convergen después de la generación de una C3 convertasa, que escinde C3 para formar una C5 convertasa que produce la formación del complejo CAM. La figura también representa la generación de muchos de los productos de escisión del complemento. Todas las proteínas representadas en las rutas pueden servir como dianas sustrato.

## 35 **Descripción detallada**

### **Diseño**

## 40 **A. Definiciones**

### **B. DIANA: COMPLEMENTO**

- 45 1. Nomenclatura
- 2. Rutas del Inicio del Complemento
  - 50 a. Clásica
  - b. Alternativa
  - c. De la Lectina
- 3. Funciones efectoras mediadas por el complemento
  - 55 a. Lisis mediada por el complemento: Complejo de Ataque a la Membrana
  - b. Inflamación
  - c. Quimiotaxis
  - d. Opsonización
  - 60 e. Activación de la Respuesta Inmunitaria Humoral
- 4. Receptores del Complemento
- 5. Regulación del Complemento
  - 65 a. Factor I
- 6. Enfermedad Mediada por el Complemento

a. Enfermedad mediada por activación del complemento

- i. Artritis Reumatoide
- ii. Septicemia
- iii. Esclerosis Múltiple
- iv. Enfermedad de Alzheimer
- v. Lesión de Isquemia-Reperfusión

b. Enfermedad mediada por deficiencias del complemento

### C. PROTEASAS

1. Clases de proteasas

a. Serina Proteasas

i. MT-SP1

ii. Granzima B

- b. Cisteína Proteasas
- c. Aspártico Proteasas
- d. Metaloproteasas
- e. Treonina Proteasas

### D. PROTEASAS ARMAZÓN

1. Proteasas Armazón Modificadas

a. Modificación Racional

i. Síntesis de Bibliotecas de Exploración Posicional y Exploración Usando Fluorescencia

b. Modificación Empírica

2. Métodos para evaluar la especificidad

3. Polipéptidos de proteasa

a. Polipéptidos de MT-SP1

### E. Ensayos para evaluar o controlar la actividad proteasa modificada sobre funciones mediadas por el complemento

a. Detección de Proteínas

- i. SDS-PAGE
- ii. Inmunoensayo Enzimático
- iii. Radioinmunodifusión (RID)

b. Ensayos hemolíticos

### F. Métodos para producir ácidos nucleicos que codifican proteasas modificadas y métodos para producir polipéptidos de proteasa modificados

1. Vectores y Células

2. Expresión

a. Procariotas

b. Levaduras

c. Células de insecto

d. Células de mamífero

e. Plantas

- 3. Técnicas de Purificación
- 4. Proteínas de Fusión
- 5. Secuencias de nucleótidos

5 G. MÉTODOS DE USO: Formulaciones/Envasado/Administración

- 1. Administración de polipéptidos de proteasa modificados
- 2. Administración de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de proteasa modificados (terapia génica)

10 H. USOS TERAPÉUTICOS

- 1. Enfermedad Inflamatoria inmunomediada
- 2. Enfermedad Neurodegenerativa
- 3. Enfermedad Cardiovascular

15

I. TERAPIAS DE COMBINACIÓN

J. EJEMPLOS

20 A. Definiciones

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen un significado igual al conocido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes de patente publicadas y publicaciones, secuencias de Genbank, bases de datos, sitios web y otros materiales publicados a los que se hace referencia a lo largo de toda la descripción del presente documento, salvo que se especifique otra cosa, se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de que exista una pluralidad de definiciones para términos del presente documento, prevalecen las que se encuentran en esta sección. Cuando se hace referencia a una URL o a otro identificador similar o dirección, debe entenderse que dichos identificadores pueden cambiar y la información particular de Internet puede ir y venir, pero puede encontrarse información equivalente por búsqueda mediante Internet. La referencia a esto pone de manifiesto la disponibilidad y diseminación pública de dicha información.

25

30

Como se usa en el presente documento, MBL (lectina de unión a manosa) también se denomina proteína de unión a manosa (MBP).

35

Como se usa en el presente documento, activación del complemento se refiere a la activación secuencial de componentes séricos C1 a C9, iniciada por diversos activadores que incluyen, por ejemplo, complejos antígeno-anticuerpo, lipopolisacáridos o polisacáridos microbianos, y la producción de una respuesta inflamatoria mediante cualquier ruta.

40

Como se usa en el presente documento, una "proteína del complemento" o un "componente del complemento" es una proteína del sistema del complemento que funciona en la defensa del hospedador contra infecciones y en el proceso inflamatorio. Las proteínas del complemento constituyen sustratos diana para las proteasas y proteasas modificadas proporcionadas en el presente documento.

45

Las proteínas del complemento son un grupo de proteínas y glicoproteínas sanguíneas que interactúan encontradas en todos los vertebrados. Existen al menos 30 proteínas solubles en plasma además de los receptores de la superficie celular que se unen a los productos de reacción del complemento y que aparecen en células inflamatorias y en células del sistema inmunitario. Además, existen proteínas de membrana reguladoras que protegen a las células hospedadoras del ataque accidental del complemento. Las proteínas del complemento incluyen las que funcionan en la ruta clásica, por ejemplo C2, las que funcionan en la ruta alternativa, por ejemplo, Factor B, y las que funcionan en la ruta de la lectina, por ejemplo MASP-1. Entre las proteínas del complemento hay proteasas que participan en las rutas del complemento. Además, como se usa en el presente documento, las proteínas del complemento incluyen cualquiera de los "productos de escisión" (denominados también "fragmentos") que se forman después de la activación de la cascada del complemento. También se incluyen entre las proteínas del complemento formas inactivas o modificadas de proteínas del complemento tales como iC3 y C3a-desArg.

50

55

Por tanto, las proteínas del complemento incluyen, pero sin limitación: C1q, C1r, C1s, C2, C3, C3a, C3b, C3c, C3dg, C3g, C3d, C3f, iC3, C3a-desArg, C4, C4a, C4b, iC4, C4a-desArg, C5, C5a, C5a-des-Arg, C6, C7, C8, C9, MASP-1, MASP-2, MBL, Factor B, Factor D, Factor H, Factor I, CR1, CR2, CR3, CR4, properdina, C1Inh, C4bp, MCP, DAF, CD59 (MIRL), clusterina y HRF y variantes alélicas y de especies de cualquier proteína del complemento.

60

65

Como se usa en el presente documento, una forma "nativa" de una proteína del complemento es una que puede aislarse de un organismo tal como un vertebrado en ausencia de activación del complemento, y que el hombre no ha modificado intencionadamente en el laboratorio. Los ejemplos de proteínas del complemento nativas incluyen C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, Factor B, Factor D, properdina, C5, C6, C7, C8 y C9.

Generalmente, las proteínas del complemento nativas son inactivas y adquieren actividad después de la activación. La activación puede requerir escisión de activación, escisión de maduración y/o formación del complejo con otras proteínas. Una excepción de esto es el Factor I y el Factor D que tienen actividad enzimática en su forma nativa. En algunos ejemplos, la activación de una proteína del complemento nativa se produce después de la escisión de la proteína. Por ejemplo, los zimógenos del complemento, tales como C2 y Factor B, son proteasas que se activan por sí mismas por escisión con proteasa, de tal forma que la escisión de C2 por la proteasa C1s genera C2b, que se asocia con C4b para formar la C4b2b proteolíticamente activa (C3 convertasa) y la escisión del Factor B por la proteasa Factor D genera Bb que se asocia con C3b para formar la C3 convertasa alternativa proteolíticamente activa, C3bBb. En otro ejemplo, la escisión de una proteína del complemento nativa inactiva produce cambios en la estabilidad estructural de una proteína dando como resultado la activación de la proteína. Por ejemplo, C3 y C4 contienen un enlace tioéster interno que en la proteína nativa es estable, pero que puede volverse altamente reactivo y activarse después de cambios conformacionales que resultan de la escisión de la proteína. Por tanto, los productos de escisión de C3 y C4 son biológicamente activos. La activación de C3 y C4 también puede ocurrir espontáneamente en ausencia de escisión. Es la conversión espontánea del enlace tioéster de la C3 nativa la que inicia la ruta del complemento alternativa. En otro ejemplo, la activación de una proteína del complemento nativa ocurre después de la liberación de una molécula reguladora que forma complejos que inhibe la actividad de una proteína del complemento nativa activa de otra manera. Por ejemplo, C1qh se une e inactiva C1s y C1r, a menos que estén formando un complejo con C1q.

Como se usa en el presente documento, la escisión de maduración es un término general que se refiere a cualquier escisión necesaria para la activación de un zimógeno. Esto incluye la escisión que conduce a un cambio conformacional que da como resultado la actividad (es decir, escisión de activación). Esto también incluye la escisión en la que se expone un sitio de unión crítico o se expone un impedimento estérico o se retira o mueve un segmento inhibidor.

Como se usa en el presente documento, forma modificada de una proteína del complemento se refiere a una proteína del complemento que está presente en una forma no nativa resultante de modificaciones en su estructura molecular. Por ejemplo, puede producirse la reacción en C3 del tioéster con agua en ausencia de escisión por convertasa, dando lugar a una forma inactiva hidrolizada de C3 y C4 denominada iC3 e iC4. En otro ejemplo, pueden desarginarse anafilatoxinas, incluyendo C3a, C5a y C4a, por la carboxipeptidasa N para dar formas más estables, menos activas.

Como se usa en el presente documento, un "fragmento" o "producto de escisión" de una proteína del complemento es un subconjunto de una proteína del complemento que contiene una parte de la secuencia polipeptídica de una proteína del complemento nativa. Un fragmento de una proteína del complemento normalmente se produce después de la activación de una cualquiera o más, tal como 1, 2 o 3, de las cascadas del complemento. Generalmente, un fragmento se obtiene por la escisión proteolítica de una proteína del complemento nativa. Por ejemplo, el Factor B se escinde enzimáticamente por el Factor D, dando como resultado dos fragmentos: Ba que constituye la parte N terminal de B; y Bb que constituye la parte C terminal y contiene sitio serina proteasa. Un fragmento de una proteína del complemento también se obtiene por la escisión proteolítica de otro fragmento de una proteína del complemento. Por ejemplo, C3b, un fragmento generado a partir de la escisión de C3, se escinde por el Factor I para generar los fragmentos iC3b y C3f. Generalmente, los productos de escisión de las proteínas del complemento son productos biológicamente activos y actúan como moléculas efectoras de escisión del sistema del complemento. Por tanto, un fragmento o una parte de una proteína del complemento incluye productos de escisión de proteínas del complemento y también partes de las proteínas que conservan o presentan al menos una actividad.

Como se usa en el presente documento, "moléculas efectoras de escisión" o "proteínas efectoras de escisión" se refieren a los productos de escisión activos generados como resultado de la cascada enzimática desencadenada del sistema del complemento. Una molécula efectora de escisión, un fragmento o producto de escisión resultante de la activación del complemento puede contribuir a cualquiera de una o más de las funciones o actividades mediadas por el complemento que incluyen opsonización, anafilaxis, lisis celular e inflamación. Los ejemplos de moléculas de escisión o efectoras incluyen, pero sin limitación, C3a, C3b, C4a, C4b, C5a, C5b-9 y Bb. Las moléculas efectoras de escisión del sistema del complemento, gracias a su participación en la cascada, presentan actividades que incluyen estimulación de la inflamación, facilitación de fagocitosis antigénica y lisado de algunas células directamente. Los productos de escisión del complemento promueven o participan en la activación de las rutas del complemento.

Como se usa en el presente documento, las anafilatoxinas (tales como, por ejemplo, C3a, C4a o C5a) son proteínas efectoras de escisión que desencadenan la desgranulación de (liberación de sustancias a partir de) mastocitos o basófilos, que participan en la respuesta inflamatoria, particularmente como parte de la defensa contra parásitos. Si la desgranulación es demasiado fuerte, esto puede producir reacciones alérgicas. Las anafilatoxinas también median indirectamente espasmos de células musculares lisas (tales como broncoespasmos), un aumento en la permeabilidad de los capilares sanguíneos y quimiotaxis.

Como se usa en el presente documento, quimiotaxis se refiere a un movimiento mediado por receptores de leucocitos hacia un quimioatrayente, típicamente en la dirección de la concentración creciente del mismo, tal como en la dirección de una concentración creciente de una anafilatoxina.



Como se usa en el presente documento, opsonización se refiere a la modificación de la superficie de un patógeno o de otra partícula de tal manera que puedan ingerirse por fagocitos. Una proteína que se une o modifica la superficie de un patógeno se denomina opsonina. Los anticuerpos y las proteínas del complemento opsonizan bacterias extracelulares para su captación y destrucción por fagocitos tales como neutrófilos y macrófagos.

5 Como se usa en el presente documento, lisis celular se refiere a la ruptura abierta de una célula por la destrucción de su pared o membrana. La hemólisis de eritrocitos es una medida de lisis celular.

10 Como se usa en el presente documento, “proteasas”, “proteinasas” y “peptidasas” se usan de manera indistinta para referirse a enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos covalentes. Estas denominaciones incluyen formas zimógenas y formas activadas de cadena sencilla, doble y múltiple de las mismas. Para una mayor calidad, la referencia a proteasas se refiere a todas las formas. Las proteasas incluyen, por ejemplo, serina proteasas, cisteína proteasas, aspártico proteasas, treonina y metaloproteasas dependiendo de la actividad catalítica de su sitio activo y del mecanismo de escisión de enlaces peptídicos de un sustrato diana.

15 Como se usa en el presente documento, un zimógeno se refiere a una proteasa que está activada por escisión proteolítica, incluyendo escisión de maduración tal como escisión de activación y/o formación de complejos con otra proteína (o proteínas) y/o cofactor (o cofactores). Un zimógeno es un precursor inactivo de una enzima proteolítica. Dichos precursores son generalmente más grandes, aunque no necesariamente más grandes que la forma activa.

20 Con referencia a las serina proteasas, los zimógenos se convierten en enzimas activas mediante escisión específica, incluyendo escisión catalítica y autocatalítica, o mediante la unión de un cofactor de activación, que genera una enzima activa. Un zimógeno, por lo tanto, es una proteína enzimáticamente inactiva que se convierte en una enzima proteolítica mediante la acción de un activador. La escisión puede efectuarse autocatalíticamente. Diversas proteínas del complemento son zimógenos; son inactivas pero se escinden y activan después de la iniciación del sistema del complemento después de una infección. Generalmente, los zimógenos son inactivos y pueden

25 convertirse en polipéptidos activos maduros por escisión catalítica o autocatalítica de la prorrogió del zimógeno.

30 Como se usa en el presente documento, una “prorrogió”, “propéptido” o “prosecuencia” se refiere a una región o a un segmento que se escinde para producir una proteína madura. Esto puede incluir segmentos que actúan suprimiendo la actividad enzimática enmascarando la maquinaria catalítica y, por tanto, previniendo la formación de productos intermedios catalíticos (es decir, ocluyendo estéricamente el sitio de unión al sustrato). Una prorrogió es una secuencia de aminoácidos posicionada en el extremo amino de un polipéptido maduro biológicamente activo y puede tener solamente unos pocos aminoácidos o puede ser una estructura multidominio.

35 Como se usa en el presente documento, una secuencia de activación se refiere a una secuencia de aminoácidos en un zimógeno que es el sitio necesario para la escisión de activación o la escisión de maduración para formar una proteasa activa. La escisión de una secuencia de activación puede catalizarse autocatalíticamente o mediante compañeros de activación.

40 La escisión de activación es un tipo de escisión de maduración en la que se necesita un cambio conformacional para que se produzca la actividad. Se trata de una ruta de activación clásica, por ejemplo, para serina proteasas en la que una escisión genera un nuevo extremo N que interacciona con las regiones conservadas de la maquinaria catalítica, tales como restos catalíticos, para inducir cambios conformacionales necesarios para la actividad. La activación puede dar como resultado la producción de formas multicatenarias de las proteasas. En algunos casos, formas

45 monocatenarias de la proteasa pueden presentar actividad proteolítica como una sola cadena.

Como se usa en el presente documento, dominio se refiere a una parte de una molécula, tal como proteínas o ácidos nucleicos codificantes, que es estructural y/o funcionalmente distinta de otras partes de la molécula y es identificable.

50 Como se usa en el presente documento, un dominio proteasa es la parte catalíticamente activa de una proteasa. La referencia a un dominio proteasa de una proteasa incluye las formas monocatenarias, bicatenarias y multicatenarias de estas proteínas. Un dominio proteasa de una proteína contiene todas las propiedades requeridas de la proteína necesarias para su actividad proteolítica, tales como, por ejemplo, su centro catalítico.

55 Como se usa en el presente documento, una parte catalíticamente activa de una proteasa se refiere al dominio proteasa o cualquier fragmento o parte del mismo que conserva la actividad proteasa. De manera significativa, al menos *in vitro*, las formas monocatenarias de las proteasas y dominios catalíticos o partes proteolíticamente activas de las mismas (típicamente truncamientos C terminales) presentan actividad proteasa.

60 Como se usa en el presente documento, un “ácido nucleico que codifica un dominio proteasa o parte catalíticamente activa de una proteasa” se refiere a un ácido nucleico que codifica solamente el dominio proteasa de cadena única indicado o una parte activa de la misma, y no a las otras partes contiguas de la proteasa como una secuencia continua.

65

Como se usa en el presente documento, la indicación de que un polipéptido consiste esencialmente en el dominio proteasa significa que solamente una parte del polipéptido es un dominio proteasa o una parte catalíticamente activa de la misma. El polipéptido, opcionalmente y generalmente, incluirá secuencias de aminoácidos adicionales no derivadas de proteasa.

5 Como se usa en el presente documento, "S1-S4", se refiere a restos de aminoácidos que forman los sitios de unión para los restos P1-P4 de un sustrato (véase, por ejemplo, Schechter y Berger (1967) *Biochem Biophys Res Commun* 27: 157-162). Cada uno de S1-S4 contiene uno, dos o más restos, que pueden ser no contiguos. Estos sitios se numeran secuencialmente a partir del sitio de reconocimiento N terminal con respecto al sitio de proteolisis, denominado enlace escindible.

15 Como se usa en el presente documento, los términos "P1-P4" y "P1'-P4'" se refieren a los restos en un péptido sustrato que interactúan específicamente con los restos S1-S4 y con los restos S1'-S4', respectivamente, y que se escinden por la proteasa. P1-P4 se refiere a las partes de restos del lado N terminal del sitio de escisión; P1'-P4' se refiere a las posiciones de restos del lado C terminal del sitio de escisión. Los restos de aminoácidos se etiquetan desde el extremo N al extremo C de un sustrato polipeptídico (Pi, ..., P3, P2, P1, P1', P2', P3', ..., Pj). Los subsitios de unión respectivos se etiquetan (Si, ..., S3, S2, S1, S1', S2', S3', ..., Sj). La escisión se cataliza entre P1 y P1'.

20 Como se usa en el presente documento, un "bolsillo de unión" se refiere a uno o más restos que interactúan con uno o más aminoácidos específicos en un sustrato. Un "bolsillo de especificidad" es un bolsillo de unión que aporta más energía que los otros (el bolsillo de unión dominante o más importante). Típicamente, la etapa de unión se produce antes de la formación del estado de transición que es necesario para que se produzca el proceso catalítico. Los aminoácidos S1-S4 y S1'-S4' constituyen el bolsillo de unión a la secuencia sustrato y facilitan el reconocimiento del sustrato por interacción con los aminoácidos P1-P4 y P1'-P4' de un sustrato peptídico, polipeptídico o proteico, respectivamente. Cuando una proteasa interactúa con un sustrato es una función de los aminoácidos en las posiciones S1-S4 y S1'-S4'. Si los aminoácidos en uno cualquiera o más de los subsitios S1, S2, S3, S4, S1', S2', S3' y S4' interactúan con o reconocen uno cualquiera o más de los aminoácidos en los sitios P1, P2, P3, P4, P1', P2', P3' y P4' de un sustrato, entonces la proteasa puede escindir el sustrato. Un bolsillo de unión coloca un aminoácido diana con una proteasa de forma que se consiga la catálisis de un enlace peptídico y la escisión de un sustrato. Por ejemplo, las serina proteasas típicamente reconocen sitios P4-P2' en un sustrato; otras proteasas pueden tener un reconocimiento ampliado más allá de P4-P2'.

30 Como se usa en el presente documento, aminoácidos que "contribuyen a una especificidad de sustrato ampliada" se refiere a los restos presentes en la hendidura del sitio activo además del bolsillo de especificidad. Estos aminoácidos incluyen los restos S1-S4, S1'-S4' en una proteasa.

40 Como se usa en el presente documento, los sitios de interacción secundarios están fuera de la hendidura del sitio activo. Estos pueden contribuir al reconocimiento del sustrato y a la catálisis. Estos aminoácidos incluyen aminoácidos que pueden aportar segundas y terceras interacciones armazón con un sustrato. Por ejemplo, bucles en la estructura de una proteasa que rodean los aminoácidos S1-S4. Los aminoácidos S1'-S4' desempeñan una función en la colocación de los aminoácidos P1-P4, P1'-P4' en el sustrato, registrando de esta manera el enlace escindible en el sitio activo de una proteasa.

45 Como se usa en el presente documento, sitio activo de una proteasa se refiere al sitio de unión al sustrato en el que se produce la catálisis del sustrato. La estructura y propiedades químicas del sitio activo permiten el reconocimiento y la unión del sustrato y la posterior hidrólisis y escisión del enlace escindible en el sustrato. El sitio activo de una proteasa contiene aminoácidos que contribuyen al mecanismo catalítico de la escisión peptídica así como aminoácidos que contribuyen al reconocimiento de la secuencia del sustrato, tales como aminoácidos que contribuyen a la especificidad de unión al sustrato ampliada.

50 Como se usa en el presente documento, una triada catalítica de una serina o cisteína proteasa se refiere a una combinación de tres aminoácidos que están en el sitio activo de una serina o cisteína proteasa y contribuyen al mecanismo catalítico de la escisión peptídica. Generalmente, en las serina proteasas se encuentra una triada catalítica y proporciona una catálisis nucleófila y ácido/base activa. La triada catalítica de las serina proteasas contiene tres aminoácidos, que en la quimotripsina son Asp<sup>102</sup>, His<sup>57</sup> y Ser<sup>195</sup>. Estos restos son críticos para la eficacia catalítica de una serina proteasa.

60 Como se usa en el presente documento, el "sitio de reconocimiento del sustrato" o "secuencia de escisión" se refiere a la secuencia reconocida por el sitio activo de una proteasa que se escinde por una proteasa. Típicamente, por ejemplo, para una serina proteasa, una secuencia de escisión está constituida por los aminoácidos P1-P4 y P1'-P4' de un sustrato, produciéndose la escisión después de la posición P1. Típicamente, una secuencia de escisión para una serina proteasa tiene seis restos de longitud para coincidir con la especificidad de sustrato ampliada de muchas proteasas, pero puede ser más larga o más corta dependiendo de la proteasa. Por ejemplo, el sitio de reconocimiento del sustrato o secuencia de escisión de MT-SP1 requerida para la autocatálisis es RQARVV, en la que R está en la posición P4, Q está en la posición P3, A está en la posición P2 y R está en la posición P1. La escisión en MT-SP1 se produce después de la posición R seguida por la secuencia VVGG.

Como se usa en el presente documento, sustrato diana se refiere a un sustrato que se escinde por una proteasa. Típicamente, el sustrato diana se escinde específicamente en su sitio de reconocimiento de sustrato por una proteasa. Como mínimo, un sustrato diana incluye los aminoácidos que constituyen la secuencia de escisión. Opcionalmente, un sustrato diana incluye un péptido que contiene la secuencia de escisión y cualquier otro aminoácido. Una proteína de longitud completa, variante alélica, isoforma o cualquier parte de la misma, que contiene una secuencia de escisión reconocida por una proteasa, es una secuencia diana para esa proteasa. Por ejemplo, para los fines del presente documento en el que se pretende conseguir la inactivación del complemento, un sustrato diana es uno cualquiera o más, tal como por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o más, proteínas del complemento o cualquier parte o fragmento de una proteína del complemento que contenga una secuencia de escisión reconocida por una proteasa. Dichos sustratos diana pueden ser proteínas purificadas o pueden presentarse en una mezcla, tal como una mezcla *in vitro* o una mezcla *in vivo*. Las mezclas pueden incluir, por ejemplo, sangre o suero u otro fluido tisular. Adicionalmente, un sustrato diana incluye un péptido o proteína que contiene un resto adicional que no influye en la escisión del sustrato por una proteasa. Por ejemplo, un sustrato diana puede incluir un péptido de cuatro aminoácidos o una proteína de longitud completa unida químicamente a un resto fluorogénico. Las proteasas pueden modificarse para presentar mayor especificidad de sustrato por un sustrato diana.

Como se usa en el presente documento, escisión se refiere a la ruptura de enlaces peptídicos por una proteasa. El motivo del sitio de escisión para una proteasa incluye restos N y C terminales con respecto al enlace escindible (los lados no cebados y cebados, respectivamente, definiéndose el sitio de escisión para una proteasa como... P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'..., y la escisión se produce entre los restos P1 y P1'). Típicamente, la escisión de un sustrato es una escisión activadora o una escisión inhibidora. Una escisión activadora se refiere a la escisión de un polipéptido para pasar de una forma inactiva a una forma activa. Esto incluye, por ejemplo, la escisión de un zimógeno para dar una enzima activa y/o la escisión de un precursor de factor de crecimiento para dar un factor de crecimiento activo. Por ejemplo, MT-SP1 puede autoactivarse por escisión de un sustrato diana en la secuencia P1-P4 de RQAR. Una escisión de activación también es una escisión por la que una proteína se escinde en una o más proteínas que tienen actividad por sí mismas. Por ejemplo, el sistema del complemento es una cascada irreversible de sucesos de escisión proteolítica cuya terminación da como resultado la formación de múltiples moléculas efectoras que estimulan la inflamación, facilitan la fagocitosis de antígenos y producen la lisis de algunas células directamente. Por tanto, la escisión de C3 por la convertasa para dar C3a y C3b es una escisión de activación.

Como se usa en el presente documento, una escisión inhibidora es la escisión de una proteína en uno o más productos de degradación que no son funcionales. La escisión inhibidora da como resultado la disminución o reducción de una actividad de una proteína. Típicamente, la reducción de una actividad de una proteína reduce la ruta o proceso en el que está implicada la proteína. En un ejemplo, la escisión de una o más proteínas del complemento que es una escisión inhibidora da como resultado la reducción o inhibición concomitante de una cualquiera o más de las rutas funcionales clásica, de la lectina o alternativa del complemento. Para ser inhibidora, la escisión reduce la actividad al menos aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99,9% o más en comparación con una forma nativa de la proteína. El porcentaje de escisión de una proteína que se requiere para que la escisión sea inhibidora varía entre las proteínas, pero puede determinarse ensayando la actividad de la proteína.

Como se usa en el presente documento, la referencia a una proteasa que escinde VEGF o un VEGFR se refiere a una proteasa que se modifica para escindir VEGF o un VEGFR o que en su forma nativa escinde VEGF o VEGFR reduciendo o inactivando de esta manera la señalización del complejo VEGF o VEGFR, particularmente la señalización de la proliferación celular que puede manifestarse como un efecto biológico tal como angiogénesis, en particular una angiogénesis no deseada. La escisión de VEGF o VEGFR por una proteasa puede determinarse ensayando la actividad de VEGF o VEGFR usando cualquier método o ensayo conocido por un experto en la materia para evaluar la función de VEGF o VEGFR.

Como se usa en el presente documento, la referencia a una proteasa (modificada o no modificada) que no escinde VEGF o un VEGFR se refiere a una proteasa que no reduce o inactiva la señalización del complejo VEGF o VEGFR. En particular, para los fines del presente documento, la proteasa tiene una mayor especificidad de sustrato o actividad en un sustrato diana (es decir, una proteína del complemento), tal como aproximadamente 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces 300 veces, 400 veces o más veces mayor que para una proteína VEGF o VEGFR o un sustrato peptídico que contiene la correspondiente secuencia de escisión (es decir, RRVR). Para los fines del presente documento, la comparación de la escisión de una proteína del complemento con una proteína o sustrato peptídico VEGF o VEGFR se realiza en condiciones de reacción iguales a aquellas en las que una proteasa escinde una proteína del complemento.

Como se usa en el presente documento, el "armazón" o "armazón de proteasa" se refiere a una proteasa prototipo que puede modificarse para alterar su especificidad por la diana. Los armazones incluyen proteasas de tipo silvestre, variantes alélicas e isoformas. Pueden servir como material de partida para la modificación para producir una proteasa que tenga una especificidad dirigida.

Como se usa en el presente documento, una “proteasa modificada” o “proteasa muteína” se refiere a un polipéptido (proteína) proteasa que tiene una o más modificaciones en la secuencia primaria en comparación con la proteasa armazón. Dichas una o más mutaciones pueden ser uno o más reemplazos (sustituciones), inserciones o deleciones de aminoácidos, y cualquier combinación de los mismos. Un polipéptido proteasa modificado incluye aquellos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más posiciones modificadas. Una proteasa modificada puede ser una proteasa armazón de longitud completa o puede ser una parte catalíticamente activa de una proteasa armazón de longitud completa modificada siempre que la proteasa modificada contenga modificaciones en regiones que alteran la actividad o especificidad por el sustrato de la proteasa y la proteasa sea proteolíticamente activa. Generalmente, estas mutaciones cambian la especificidad y la actividad de las proteasas armazón para escindir una cualquiera o más de las proteínas del complemento. Además de contener modificaciones en regiones que alteran la especificidad del sustrato de una proteasa, una proteasa modificada también puede tolerar otras modificaciones en regiones que no son esenciales para la especificidad por el sustrato de una proteasa. Por lo tanto, una proteasa modificada típicamente tiene una identidad de secuencia del 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor con respecto a una secuencia de aminoácidos correspondiente de una proteasa de tipo silvestre o armazón. Una proteasa de longitud completa modificada o una parte catalíticamente activa de una proteasa modificada puede incluir proteasas que son proteínas de fusión siempre que la propia fusión no altere la especificidad por el sustrato de una proteasa.

Como se usa en el presente documento, la numeración de quimotripsina se refiere a la numeración de aminoácidos de un polipéptido de quimotripsina maduro de la SEC ID N°: 8. El alineamiento de un dominio proteasa de otra proteasa, tal como por ejemplo el dominio proteasa de MT-SP1, puede realizarse con quimotripsina. En tal caso, a los aminoácidos de MT-SP1 que corresponden a los aminoácidos de la quimotripsina se les da la numeración de los aminoácidos de la quimotripsina. Un experto en la materia puede determinar las posiciones correspondientes mediante dicho alineamiento, utilizando alineamientos manuales o utilizando los numerosos programas de alineamiento disponibles (por ejemplo, BLASTP). Las posiciones correspondientes también pueden basarse en alineamientos estructurales, por ejemplo utilizando alineamientos simulados por ordenador de la estructura de proteínas. Cuando se dice que los aminoácidos de un polipéptido corresponden a los aminoácidos de una secuencia descrita, se hace referencia a aminoácidos identificados después del alineamiento del polipéptido con la secuencia descrita para maximizar la identidad u homología (donde se alinean aminoácidos conservados) usando un algoritmo de alineamiento convencional, tal como un algoritmo GAP. Por ejemplo, después del alineamiento del dominio serina proteasa de MT-SP1 (SEC ID N°: 10) con la quimotripsina madura, a la V en la posición 1 de MT-SP1 se le da la numeración de quimotripsina de V16. Los aminoácidos posteriores se numeran de acuerdo con esto. En un ejemplo, una F en la posición de aminoácido 708 de MT-SP1 de longitud completa (SEC ID N°: 2) o en la posición 94 del dominio proteasa de MT-SP1 (SEC ID N°: 10), corresponde a F99 basándose en la numeración de quimotripsina. Cuando en una proteasa existe un resto, pero no está presente en la quimotripsina, al resto de aminoácido se le da una notación con letras. Por ejemplo, los restos de la quimotripsina que forman parte de un bucle con el aminoácido 60 basándose en la numeración de la quimotripsina pero están insertados en la secuencia MT-SP1 en comparación con la quimotripsina, se denominan, por ejemplo, Asp60b o Arg60c.

Como se usa en el presente documento, “inhibición de la activación del complemento” o “inactivación del complemento” se refiere a la reducción o disminución de una función o actividad mediada por el complemento de una cualquier o más de las rutas del complemento por una proteasa o de la actividad de cualquiera de las proteínas en una ruta. Una función o actividad del complemento puede producirse *in vitro* o *in vivo*. Los ejemplos de funciones del complemento que pueden ensayarse y que se describen en el presente documento incluyen ensayos hemolíticos y ensayos para medir una o más de las moléculas efectoras del complemento tales como SDS PAGE seguido por Transferencia de Western o Tinción con Azul Brillante de Coomassie o ELISA. Una proteasa puede inhibir la activación del complemento en un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más. En otras realizaciones, la activación del complemento se inhibe por una proteasa en un 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99,9% en comparación con la actividad del complemento en ausencia de una proteasa.

Como se usa en el presente documento, especificidad por un sustrato diana se refiere a una preferencia para que una proteasa escinda un sustrato diana en comparación con otro sustrato, denominado sustrato no diana. La especificidad se refleja en la constante de especificidad ( $k_{cat}/K_m$ ), que es una medida de la afinidad de la proteasa por su sustrato y la eficacia de la enzima.

Como se usa en el presente documento, una constante de especificidad para la escisión es ( $k_{cat}/K_m$ ), en la que  $K_m$  es la constante de Michaelis-Menton ( $[S]$  a la mitad de  $V_{max}$ ) y  $k_{cat}$  es la  $V_{max}/[E_T]$ , en la que  $E_T$  es la concentración enzimática final. Los parámetros  $k_{cat}$ ,  $K_m$  y  $k_{cat}/K_m$  pueden calcularse representando un gráfico de la inversa de la concentración de sustrato frente a la inversa de la velocidad de la escisión del sustrato y ajustando a la ecuación de Lineweaver-Burk ( $1/velocidad = (K_m A_{max})/(1/(S)) + 1/A_{max}$ ; en la que  $V_{max} = [E_T] k_{cat}$ ). Puede usarse cualquier método para determinar la tasa de aumento de escisión a lo largo del tiempo en presencia de diversas concentraciones de sustrato para calcular la constante de especificidad. Por ejemplo, un sustrato se une a un resto fluorogénico, que se libera después de la escisión por una proteasa. Determinando la tasa de escisión a diferentes concentraciones enzimáticas, puede determinarse el valor de  $k_{cat}$  para una proteasa particular. La constante de especificidad puede usarse para determinar preferencias específicas de sitio de un aminoácido en uno cualquiera o más de los bolsillo S1-S4 de una proteasa para un aminoácido P1-P4 concomitante de un sustrato usando métodos convencionales en

la técnica, tal como una biblioteca combinatoria de exploración posicional (PS-SCL). Adicionalmente, la constante de especificidad también puede usarse para determinar la preferencia de una proteasa por un sustrato diana sobre otro sustrato.

- 5 Como se usa en el presente documento, la especificidad del sustrato se refiere a la preferencia de una proteasa por un sustrato diana sobre otro. La especificidad del sustrato puede medirse como una relación de las constantes de especificidad.

- 10 Como se usa en el presente documento, una proporción de especificidad de sustrato es la proporción de las constantes de especificidad y puede usarse para comparar especificidades de dos o más proteasas o de una proteasa por dos o más sustratos. Por ejemplo, la especificidad de sustrato de una proteasa por sustratos competitivos o de proteasas competitivas por un sustrato puede compararse comparando  $k_{cat}/K_m$ . Por ejemplo, una proteasa que tiene una constante de especificidad de  $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  por un sustrato diana y de  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  por un sustrato no diana es más específica por el sustrato diana. Usando las constantes de especificidad anteriores, la proteasa tiene una proporción de especificidad de sustrato de 100 para la proteasa diana.

- 20 Como se usa en el presente documento, la preferencia o especificidad de sustrato por un sustrato diana puede expresarse como una proporción de especificidad de sustrato. El valor particular de la proporción que refleja una preferencia es una función de los sustratos y de las proteasas en cuestión. Una proporción de especificidad de sustrato que es mayor de 1 significa una preferencia por un sustrato diana y una especificidad de sustrato menor de 1 significa una preferencia por un sustrato no diana. Generalmente, una proporción de al menos o de aproximadamente 1 refleja una diferencia suficiente para que una proteasa se considere un agente terapéutico candidato.

- 25 Como se usa en el presente documento, especificidad modificada se refiere a un cambio en la especificidad de sustrato de una proteasa modificada en comparación con una proteasa armazón de partida. Generalmente, el cambio en la especificidad es un reflejo del cambio en la presencia de una proteasa modificada por un sustrato diana en comparación con un sustrato de tipo silvestre de la proteasa armazón (denominado en el presente documento sustrato no diana). Típicamente, las proteasas modificadas proporcionadas en el presente documento presentan mayor especificidad de sustrato por una cualquiera o más de las proteínas del complemento en comparación con la especificidad de sustrato de una proteasa armazón. Por ejemplo, una proteasa modificada que tiene una proporción de especificidad de sustrato de 100 por un sustrato diana frente a un sustrato no diana presenta una especificidad 10 veces mayor en comparación con una proteasa armazón con una proporción de especificidad de sustrato de 10. En otro ejemplo, una proteasa modificada que tiene una proporción de especificidad de sustrato de 1 en comparación con una proporción de 0,1, presenta un aumento de 10 veces en la especificidad de sustrato. Para presentar una especificidad aumentada en comparación con una proteasa armazón, una proteasa modificada tiene una especificidad de sustrato de 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces o más veces mayor por una cualquiera o más de las proteínas del complemento.

- 40 Como se usa en el presente documento, "selectividad" puede usarse de manera indistinta con especificidad cuando se hace referencia a la capacidad de una proteasa para seleccionar y escindir un sustrato diana de entre una mezcla de sustratos competitivos. La selectividad aumentada de una proteasa por un sustrato diana en comparación con otro cualquiera o más sustratos diana puede determinarse, por ejemplo, comparando las constantes de especificidad de la escisión de los sustratos diana por la proteasa. Por ejemplo, si una proteasa tiene una constante de especificidad de escisión de  $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  por un sustrato diana y  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  por otro cualquiera o más sustratos, la proteasa es más selectiva por el primer sustrato diana.

- 50 Como se usa en el presente documento, actividad se refiere a una actividad o actividades funcionales de un polipéptido o parte del mismo asociado con una proteína de longitud completa (completa). Las actividades funcionales incluyen, pero sin limitación, actividades biológicas, actividad catalítica o enzimática, antigenicidad (capacidad para unirse con o competir con un polipéptido por la unión a un anticuerpo antipolipéptido), inmunogenicidad, capacidad para formar multímeros y la capacidad de unirse específicamente a un receptor o ligando para el polipéptido.

- 55 Como se usa en el presente documento, una actividad funcional con respecto a una proteína del complemento se refiere a una función mediada por el complemento incluyendo, pero sin limitación, anafilaxis, opsonización, quimiotaxis o lisis celular. Los ensayos no limitantes para ensayar actividades del complemento incluyen hemólisis de eritrocitos y detección de moléculas efectoras del complemento, tal como por ELISA o SDS-PAGE.

- 60 Como se usa en el presente documento, actividad catalítica o actividad de escisión se refiere a la actividad de una proteasa evaluada en ensayos proteolíticos *in vitro* que detecta la proteólisis de un sustrato seleccionado. La actividad de escisión puede medirse evaluando la eficacia catalítica de una proteasa.

- 65 Como se usa en el presente documento, la actividad hacia un sustrato diana se refiere a la actividad de escisión y/o actividad funcional, u otra medida que refleje la actividad de una proteasa sobre o hacia un sustrato diana. Una actividad funcional de un sustrato diana de una proteína del complemento por una proteasa puede medirse

evaluando la C150 en un ensayo de complemento tal como lisis de eritrocitos, u otros ensayos similares conocidos por un experto en la materia o proporcionado en el presente documento para evaluar la actividad del complemento. La actividad de escisión puede medirse evaluando la eficacia catalítica de una proteasa. Para los fines del presente documento, una actividad está aumentada si una proteasa presenta mayor proteólisis o escisión de un sustrato

5 diana y/o modula (es decir, activa o inhibe) una actividad funcional de una proteína del complemento en comparación con la situación en ausencia de la proteasa.

Como se usa en el presente documento, serina proteasas o serina endopeptidasas se refiere a una clase de peptidasas que se caracterizan por la presencia de un resto serina en el centro activo de la enzima. Las serina proteasas participan en una amplia diversidad de funciones corporales incluyendo la coagulación sanguínea y la inflamación, además de funcionar como enzimas digestivas en procariotas y eucariotas. El mecanismo de escisión mediante serina proteasas se basa en el ataque nucleófilo de un enlace peptídico diana por una serina. La cisteína la treonina o las moléculas de agua asociadas con aspartato o metales también pueden desempeñar esta función. Las cadenas laterales alineadas de serina, histidina y aspartato forman una triada catalítica común en la mayoría de

10 la serina proteasas. El sitio activo de las serina proteasas se conforma como una hendidura a la que se une el sustrato polipeptídico.

Como se usa en el presente documento, una proteasa del complemento se refiere a una proteasa que está implicada en la generación y amplificación de las reacciones de la cascada del complemento en cualquiera de las rutas del complemento. Estas proteasas incluyen la serina proteasa factor I, factor D, serina proteasa asociada con MBL (MASP)-2, MASP-1, C1s, C1r, factor B, C2, y las convertasas y cualquier otra proteasa que aparezca en una ruta del complemento por la que se produzca la activación del complemento. En particular, las proteasas del complemento son cualquiera de las proteasas del complemento no modificadas, incluyendo el factor I, factor D, MASP-2, MAP-1, C1s, C1r, factor B y C2.

20

Como se usa en el presente documento, una proteasa que no es del complemento es cualquier proteasa que normalmente no forma parte de una cualquiera o más de las rutas del complemento.

25

Como se usa en el presente documento, MT-SP1 se refiere a una serina proteasa que forma parte de la familia de peptidasas S1 de las serina proteasas (que también contienen tripsina y quimotripsina) basándose en la localización de los restos de sitios activos Ser, His y Lys. La MT-SP1 se caracteriza por un dominio transmembrana, dos dominios CUB, cuatro repeticiones LDLR y un dominio serina proteasa (o dominio peptidasa S1) que está altamente conservado entre todos los miembros de la familia peptidasa S1 de las serina proteasas, tal como por ejemplo con quimotripsina. En la SEC ID N°: 2 se indica la secuencia de una MT-SP1 ejemplar. El dominio proteasa aparece entre

30 e incluye los aminoácidos 615-854.

La referencia a una proteasa MT-SP1 incluye una MT-SP1 de longitud completa o cualquier parte catalíticamente activa de la misma que incluye variantes alélicas y variantes de especie y variantes codificadas por variantes de corte y empalme. Una proteasa MT-SP1 se produce como un zimógeno monocatenario, y como un polipéptido bicatenario activado. La referencia a MT-SP1 incluye sus formas monocatenarias y bicatenarias activas. Son de particular interés las proteasas MT-SP1 procedentes de mamíferos, incluyendo las de origen humano. Una proteasa MT-SP1 también puede incluir las procedentes de rata o ratón. Los expertos en esta materia reconocen que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no modifican sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4ª Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224). En las SEC ID N°: 1, 2, 9 y 10 se exponen secuencias de moléculas de ácido nucleico codificantes y las secuencias de aminoácidos codificadas de proteasas MT-SP1 de origen humano y/o dominios catalíticamente activos de las mismas. Son ejemplos de polipéptidos MT-SP1 de origen no humano son los que tienen secuencias de aminoácidos tales como la de ratón (*Mus musculus*, SEC ID N°: 449) y rata (*Rattus norvegicus*, SEC ID N°: 450). En el presente documento, una proteasa MT-SP1 puede ser una MT-SP1

40 armazón.

Como se usa en el presente documento, la referencia a una parte "catalíticamente activa de la misma" de una proteasa MT-SP1 se refiere al dominio proteasa o a cualquier fragmento o parte del mismo que conserva la actividad proteasa. Por ejemplo, una parte catalíticamente activa de una MT-SP1 puede ser un dominio de proteasa MT-SP1 incluyendo una forma monocatenaria aislada del dominio de proteasa o una forma bicatenaria activada.

50

Como se usa en el presente documento, una proteasa MT-SP1 modificada se refiere a una proteasa que presenta actividad modificada, tal como especificidad de sustrato modificada, en comparación con la forma armazón o no modificada. Dichas proteasas incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más modificaciones (es decir, cambios en aminoácidos) en comparación con una MT-SP1 armazón de tal manera que se modifica una actividad, tal como la especificidad o selectividad hacia el sustrato, de la proteasa MT-SP1 para escindir una proteína del complemento. Una MT-SP1 modificada puede ser una MT-SP1 armazón de longitud completa, o puede ser una parte de una proteasa armazón de longitud completa, siempre que la proteasa modificada contenga modificaciones en regiones que modifiquen la actividad o especificidad del sustrato de la proteasa y la proteasa sea proteolíticamente activa. Una proteasa MT-SP1 modificada también puede incluir otras modificaciones en regiones que no influyen sobre la especificidad del sustrato de la proteasa. Por tanto, una proteína

60

65

MT-SP1 modificada típicamente tiene una identidad del 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor con respecto a una secuencia de aminoácidos correspondiente de una MT-SP1 de tipo silvestre o armazón. Una proteasa MT-SP1 de longitud completa modificada o una parte catalíticamente activa de la misma de una MT-SP1 modificada puede incluir proteasas que son proteínas de fusión siempre que la proteína de fusión posea la especificidad diana.

Como se usa en el presente documento, una proteína humana es una codificada por una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, presente en el genoma de un ser humano, incluyendo todas las variantes alélicas y variantes conservativas de las mismas. Una variante o modificación de una proteína es una proteína humana si la modificación se basa en la secuencia de tipo silvestre o prominente de una proteína humana.

Como se usa en el presente documento, los restos de  $\alpha$ -aminoácidos naturales son restos de los 20  $\alpha$ -aminoácidos encontrados en la naturaleza que se incorporan en las proteínas mediante el reconocimiento específico de una molécula de ARNt cargada con su codón de ARNm afín en seres humanos.

Como se usa en el presente documento, aminoácidos de origen no natural se refiere a aminoácidos no codificados genéticamente.

Como se usa en el presente documento, los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos, incluyendo ácidos nucleicos peptídicos (ANP) y mezclas de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Cuando se hace referencia a sondas o cebadores, que están opcionalmente marcados, tal como con un marcador de detección, tal como un marcador fluorescente o radiomarcador, se contemplan moléculas monocatenarias. Dichas moléculas tienen típicamente una longitud tal que su diana es estadísticamente única o de bajo número de copias (típicamente menor de 5, generalmente menor de 3) para sondear o cebar una genoteca. Generalmente, una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementarios a o idénticos a un gen de interés. Las sondas y cebadores pueden tener 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de longitud.

Como se usa en el presente documento, un péptido se refiere a un polipéptido que tiene de 20 a 40 aminoácidos de longitud.

Como se usa en el presente documento, los aminoácidos que aparecen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento se identifican de acuerdo con sus abreviaturas conocidas de tres letras o de una letra (Tabla 1). Los nucleótidos que aparecen en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones de una sola letra convencionales usadas habitualmente en la técnica.

Como se usa en el presente documento, un "aminoácido" es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo de ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para los fines del presente documento, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos de origen natural, aminoácidos que no son de origen natural y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en los que el carbono  $\alpha$  tiene una cadena lateral).

Como se usa en el presente documento, los "aminoácidos" que aparecen en las diversas secuencias de aminoácidos que aparecen en el presente documento se identifican de acuerdo con sus abreviaturas de tres letras o de una letra bien conocidas (véase la Tabla 1). Los nucleótidos que aparecen en los diversos fragmentos de ADN, se designan con las designaciones convencionales de una sola letra usadas habitualmente en la técnica.

Como se usa en el presente documento, "resto de aminoácido" se refiere a un aminoácido formado tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Se supone que los restos de aminoácidos descritos en el presente documento están en la forma isomérica "L". Los restos en la forma isómera "D", que también se designan así, pueden sustituirse por cualquier resto de L-aminoácido siempre que se conserve la propiedad funcional deseada en el polipéptido.  $\text{NH}_2$  se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido.  $\text{COOH}$  se refiere al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxilo de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura convencional de polipéptidos descrita en J. Biol. Chem., 243: 3552-3559 (1969), y el C.F.R. 37, §§ 1.821-1.822 adoptado, en la Tabla 1 se muestran las abreviaturas de los restos de aminoácidos:

**Tabla 1- Tabla de Correspondencia**

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
1 Letra	3 Letras	
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
1 Letra	3 Letras	
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	He	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

5 Debe tenerse en cuenta que todas las secuencias de restos de aminoácidos representadas en el presente documento mediante fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxilo. Además, la frase “resto de aminoácido” se define en sentido amplio para incluir los aminoácidos indicados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 1) y aminoácidos modificados e inusuales tales como los indicados en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822 e incorporados en el presente documento por referencia. Adicionalmente, debe indicarse que un guión al inicio o al final de una secuencia de restos de aminoácidos indica un enlace peptídico con otra secuencia de uno o más restos de aminoácidos, con un grupo amino terminal tal como NH<sub>2</sub> o con un grupo carboxilo terminal tal como COOH.

10 Como se usa en el presente documento, “aminoácidos de origen natural” se refiere a los 20 L-aminoácidos que aparecen en los polipéptidos.

15 Como se usa en el presente documento, “aminoácido que no es de origen natural” se refiere a un compuesto orgánico que tiene una estructura similar a un aminoácido natural pero que se ha modificado estructuralmente para imitar la estructura y reactividad de un aminoácido natural. Los aminoácidos que no son de origen natural por tanto incluyen, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos de origen natural e incluyen, pero sin limitación, los D-isoestereómeros de aminoácidos. En el presente documento se describen aminoácidos ejemplares que no son de origen natural y son conocidos por los expertos en la materia.

20 Como se usa en el presente documento, una mezcla isocinética es una mezcla en la que las proporciones molares de aminoácidos se han ajustado basándose en sus velocidades de reacción indicadas (véase, por ejemplo, Ostresh et al., (1994) Biopolymers 34: 1681).

25 Como se usa en el presente documento, una construcción de ADN es una molécula de ADN mono- o bicatenaria, lineal o circular que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos de una manera no encontrada en la naturaleza. Las construcciones de ADN se producen como resultado de la manipulación humana e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.



Como se usa en el presente documento, un segmento de ADN es una parte de una molécula de ADN más larga que tiene atributos especificados. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido especificado es una parte de una molécula de ADN más larga tal como un plásmido o un fragmento plasmídico que, cuando se lee en la dirección 5' a 3', codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.

5 Como se usa en el presente documento, el término ortólogo significa un polipéptido o una proteína obtenidos a partir de una especie que es el homólogo funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencias entre los ortólogos son el resultado de la especiación.

10 Como se usa en el presente documento, el término polinucleótido significa un polímero mono- o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídas en dirección 5' a 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse 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 (con la abreviatura "nt") o pares de bases (con la abreviatura "pb"). El término  
15 nucleótido se usa para moléculas mono- y bicatenarias cuando el contexto lo permite. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias, se usa para indicar la longitud completa y se entenderá que es equivalente al término pares de bases. Los expertos en la materia reconocerán que las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en longitud y que sus extremos pueden estar escalonados; por tanto, todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido bicatenaria pueden no estar emparejados. Dichos extremos no emparejados no  
20 excederán, en general, de 20 nucleótidos de longitud.

Como se usa en el presente documento, un polipéptido de proteasa es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una cualquiera de las proteasas armazón o modificadas descritas en el presente documento.

25 Como se usa en el presente documento, "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o a las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud puede basarse en el grado de identidad y/u homología de secuencias o de restos y los restos contenidos en las mismas. Los expertos en la materia conocen métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, en un método para evaluar la similitud de secuencia, dos secuencias de aminoácidos o de  
30 nucleótidos se alinean de una manera que produce un nivel máximo de identidad entre las secuencias. "Identidad" se refiere al grado en el que las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos son invariantes. El alineamiento de secuencias de aminoácidos, y en alguna medida de las secuencias de nucleótidos, también puede tener en cuenta diferencias conservativas y/o sustituciones frecuentes en los aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias  
35 conservativas son aquellas que conservan las propiedades fisicoquímicas de los restos implicados. Los alineamientos pueden ser globales (alineamiento de las secuencias comparadas sobre la longitud completa de las secuencias y que incluye todos los restos) o locales (el alineamiento de una parte de las secuencias que incluye únicamente la región o regiones más similares).

40 La "identidad" en sí misma tiene el significado reconocido en la técnica y puede calcularse usando técnicas publicadas. (Véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). Aunque existan diversos métodos para  
45 medir la identidad entre dos polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" es bien conocido por los expertos en la materia (Carrillo, H. & Lipman, D., SIAM J Applied Math 48: 1073(1988)).

50 Como se usa en el presente documento, homólogo (con respecto a secuencias de ácido nucleico y/o aminoácidos) significa una homología de secuencia mayor que o igual al 25%, típicamente una homología de secuencia mayor que o igual al 25%, 40%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95%; si fuera necesario puede especificarse el porcentaje exacto. Para los fines del presente documento, los términos "homología" e "identidad" con frecuencia se usan de manera intercambiable, salvo que se indique otra cosa. En general, para la determinación del porcentaje de homología o identidad, las secuencias se alinean para obtener de esta manera el mayor orden de coincidencia  
55 (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073).  
60 Mediante la homología de secuencia, se determina el número de aminoácidos conservados mediante programas de algoritmos de alineamiento convencionales y pueden usarse con penalizaciones por defecto de hueco establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas hibridarían típicamente a una rigurosidad moderada o a una rigurosidad elevada a lo largo de la longitud del ácido nucleico de interés. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula  
65 de ácido nucleico de hibridación.

Puede determinarse si dos moléculas cualesquiera tienen secuencias de nucleótidos o de aminoácidos que tienen al menos una "identidad" u "homología" del 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% usando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa "FASTA", usando, por ejemplo, parámetros por defecto tales como los mostrados en Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (otros programas incluyen el paquete informático GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(l): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul, S. F., et al., J Molec Biol 215: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073). Por ejemplo, para determinar la identidad puede usarse la función BLAST de la base de datos de Información del National Center for Biotechnology. Otros programas disponibles en el mercado, o disponibles al público, incluyen el programa "MegAlign" de DNASTar (Madison, WI) y el programa "Gap" del Grupo University of Wisconsin Genetics Computer (UWG) (Madison WI)). El porcentaje de homología o identidad de las proteínas y/o de las moléculas de ácido nucleico puede determinarse, por ejemplo, comparando la información de secuencia usando un programa informático GAP (por ejemplo, Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, revisado por Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482). En resumen, el programa GAP define similitudes tales como en la cantidad de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, dividido entre el número total de símbolos en la secuencia más corta de las dos. Los parámetros por defecto del programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribbskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745, como describen Schwartz y Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, páginas 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) ninguna penalización para huecos en los extremos.

Por lo tanto, como se usa en el presente documento, el término "identidad" y "homología" representa una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de ensayo y uno de referencia. Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos 90% idéntico con respecto a" se refiere a identidades en porcentaje de 90 a 99,99 con respecto a la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos del polipéptido de referencia. La identidad a un nivel del 90% o mayor indica efectivamente que, suponiendo para propósitos de ilustración que se comparan un polipéptido de ensayo y de referencia de 100 aminoácidos de longitud, no más del 10% (es decir 10 de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de ensayo difiere de los del polipéptido de referencia. Pueden realizarse comparaciones similares entre polinucleótidos de ensayo y de referencia. Dichas diferencias pueden representarse como mutaciones puntuales distribuidas al azar en toda la longitud de un polipéptido o pueden agruparse en una o más localizaciones de longitud variable hasta el máximo permisible, por ejemplo, una diferencia de 10/100 aminoácidos (aproximadamente un 90% de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácidos nucleicos o aminoácidos. A nivel de homologías o identidades por encima de aproximadamente el 85-90%, el resultado debe ser independiente del programa y de los parámetros de hueco establecidos; estos altos niveles de identidad pueden evaluarse fácilmente, a menudo mediante alineamiento manual sin basarse en un programa informático.

Como se usa en el presente documento, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similitud y/o identidad) para alinear posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Típicamente, se alinean dos o más secuencias que están relacionadas por una identidad del 50% o mayor. Un conjunto de secuencia alineadas se refiere a dos o más secuencias que están alineadas en posiciones correspondientes y puede incluir secuencias de alineamiento derivadas de ARN, tales como EST y otros ADNc, alineados con una secuencia de ADN genómico.

Como se usa en el presente documento, "cebador" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede actuar como un punto de inicio de la síntesis de ADN dirigida por molde en condiciones apropiadas (por ejemplo, en presencia de cuatro nucleósido trifosfatos y un agente de polimerización, tal como ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Se apreciará que determinadas moléculas de ácido nucleico pueden servir como una "sonda" y como un "cebador". Sin embargo, un cebador tiene un grupo 3' hidroxilo para su extensión. Un cebador puede usarse en diversos métodos incluyendo, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR transcriptasa inversa (RT), PCR con ARN, LCR, PCR múltiple, PCR angosta (*panhandle*), PCR de captura, PCR de expresión, RACE 5' y 3', PCR *in situ*, PCR mediada por ligamiento y otros protocolos de amplificación.

Como se usa en el presente documento, "par cebador" se refiere a un conjunto de cebadores que incluye un cebador 5' (cadena arriba) que hibrida con el extremo 5' de una secuencia a amplificar (por ejemplo, mediante PCR) y un cebador 3' (cadena abajo) que hibrida con el complemento del extremo 3' de la secuencia a amplificar.

Como se usa en el presente documento, "que hibrida específicamente" se refiere a la hibridación, mediante formación de pares de bases complementarias, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) con una molécula de ácido nucleico diana. Los expertos en la materia están familiarizados con parámetros *in vitro* e *in vivo* que influyen en la hibridación específica, tal como la longitud y composición de la molécula en particular. Los parámetros particularmente relevantes para la hibridación *in vitro* incluyen adicionalmente la temperatura de hibridación y de lavado, la composición del tampón y la concentración salina. Las condiciones de lavado ejemplares para retirar moléculas de ácido nucleico unidas de manera no específica a alta rigurosidad son 0,1 x SSPE, SDS al

0,1%, 65 °C, y a rigurosidad media son 0,2 x SSPE, SDS al 0,1%, 50 °C. En la técnica se conocen condiciones de rigurosidad equivalentes. Los expertos en la materia pueden ajustar fácilmente estos parámetros para conseguir hibridación específica de una molécula de ácido nucleico con una molécula de ácido nucleico diana apropiada para una aplicación particular.

5 Como se usa en el presente documento, sustancialmente idéntico a un producto significa que es suficientemente similar como para que las propiedades de interés permanezcan suficientemente intactas de modo que el producto sustancialmente idéntico pueda usarse en lugar del producto.

10 Como se usa en el presente documento, también debe entenderse que las expresiones “sustancialmente idéntico” o “similar” varían con el contexto, como saben los expertos en la materia pertinente.

15 Como se usa en el presente documento, una variante alélica o una variación alélica se refiere a cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica se produce de forma natural mediante mutación, y puede dar como resultado polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (no hay cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tengan secuencias de aminoácidos modificadas. La expresión “variante alélica” también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen. Típicamente, la forma de referencia del gen codifica una forma de tipo silvestre y/o una forma predominante de un polipéptido de una población o de un solo miembro de referencia de una especie. Típicamente, las variantes alélicas que incluyen variantes entre y en especies, tienen una identidad de aminoácidos de al menos un 80%, 90% o mayor con respecto a una forma de tipo silvestre y/o predominante de la misma especie; el grado de identidad depende del gen y de si la comparación es entre especies o dentro de una especie. Generalmente, las variantes alélicas dentro de una especie tienen al menos una identidad del 80%, 85%, 90% o 95% o mayor con respecto a una forma de tipo silvestre y/o predominante, incluyendo una identidad del 96%, 97%, 98%, 99% o mayor con respecto a una forma de tipo silvestre y/o predominante de un polipéptido.

20 Como se usa en el presente documento, “alelo”, que se usa de manera indistinta en el presente documento con “variante alélica”, se refiere a formas alternativas de un gen o partes del mismo. Los alelos ocupan el mismo locus o posición en cromosomas homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homocigoto para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterocigoto para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferenciarse entre sí en un solo nucleótido o en diversos nucleótidos, y pueden incluir sustituciones, deleciones e inserciones de nucleótidos. Un alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.

25 Como se usa en el presente documento, una variante de corte y empalme se refiere a una variante producida por procesamiento diferencial de un transcrito primario de ADN genómico que da como resultado más de un tipo de ARNm.

30 Como se usa en el presente documento, modificación hace referencia a la modificación de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico e incluye deleciones, inserciones y reemplazos de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente.

35 Para los propósitos del presente documento, pueden realizarse sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en cualquiera de las proteasas y dominios proteasa de las mismas siempre que la proteína resultante presente actividad proteasa u otra actividad (o, si se desea, tales cambios pueden realizarse para eliminar la actividad). Pueden realizarse modificaciones realizando sustituciones de aminoácidos conservativas y también sustituciones de aminoácidos no conservativas. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos que modifiquen deseablemente o ventajosamente propiedades de las proteínas. En una realización, pueden realizarse mutaciones que impidan la degradación del polipéptido. Muchas proteasas escinden después de restos básicos tales como R y K; para eliminar tal escisión, el resto básico se sustituye por un resto no básico. La interacción de la proteasa con un inhibidor pueden bloquearse al mismo tiempo que se conserva la actividad catalítica efectuando un cambio no conservativo en el sitio de interacción del inhibidor con la proteasa. También pueden modificarse otras actividades. Por ejemplo, puede modificarse la unión al receptor sin modificar la actividad catalítica.

40 Las sustituciones de aminoácido contempladas incluyen sustituciones conservativas tales como las expuestas en la Tabla 2, que no eliminan la actividad proteolítica. Como se describe en el presente documento, también se contemplan sustituciones que modifican propiedades de las proteínas, tales como la retirada de sitios de escisión y otros sitios; dichas sustituciones son generalmente sustituciones no conservativas, pero pueden efectuarse fácilmente por los expertos en la materia.

45 Las sustituciones conservativas de aminoácidos adecuadas son conocidas por los expertos en la materia y pueden realizarse generalmente sin modificar la actividad biológica, por ejemplo la actividad enzimática, de la molécula resultante. Los expertos en la materia reconocen que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no modifican sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4ª Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., página 224).

Dentro de la definición también se incluye el fragmento catalíticamente activo de una serina proteasa, particularmente una parte de la proteasa monocatenaria. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se realizan, por ejemplo, de acuerdo con las expuestas en la TABLA 2 mostrada a continuación:

5

TABLA 2

Resto original	Sustitución conservativa
Ala (A)	Gly; Ser; Abu
Arg (R)	Lys; om
Asn(N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln(Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly(G)	Ala; Pro
His(H)	Asn; Gln
He (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met(M)	Leu; Tyr; Ile
Ornitina	Lys; Arg
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	He; Leu; Met

También pueden permitirse otras sustituciones y pueden determinarse empíricamente o de acuerdo con sustituciones conservativas conocidas.

10

Como se usa en el presente documento, el término promotor significa una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que permiten la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Las secuencias promotoras normalmente, pero no siempre, se encuentran en la región 5' no codificante de los genes.

15

Como se usa en el presente documento, un polipéptido o una proteína, o una parte biológicamente activa de los mismos, aislado o purificado está sustancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes de la célula del tejido del que procede la proteína, o está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Puede determinarse que las preparaciones están sustancialmente libres si aparecen libres de cualquier impureza fácilmente detectable según se determina mediante métodos de análisis convencionales, tales como cromatografía de capa fina (TLC), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usados por los expertos en la materia para evaluar dicha pureza, o si son suficientemente puras de manera que una purificación adicional no altere detectablemente las propiedades físicas y químicas, tales como las actividades enzimáticas y biológicas de la sustancia. Los métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros se conocen por los expertos en la materia. Un compuesto sustancialmente químicamente puro, sin embargo, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En dichos casos, la purificación adicional podría aumentar la actividad específica del compuesto.

20

25

La expresión sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína está separada de componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de manera recombinante. En una realización, la expresión sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas proteasas que tienen menos de aproximadamente un 30% (en peso seco) de proteínas que no son proteasas (denominadas también en el presente documento proteínas contaminantes), generalmente menos de aproximadamente un 20% de proteínas no proteasas o un 10% de proteínas no proteasas o menos de aproximadamente un 5% de proteínas no proteasas. Cuando la proteína proteasa o una parte activa de la misma se produce de manera recombinante, está también sustancialmente libre del medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de o aproximadamente un 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína proteasa.

30

35

40

Como se usa en el presente documento, la expresión sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos incluye preparaciones de proteínas proteasas en las que la proteína está separada de precursores químicos o de otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. El término

incluye preparaciones de proteínas proteasas que tienen menos de aproximadamente un 30% (en peso seco), 20%, 10% o 5% o menos de precursores químicos o productos químicos o componentes que no son proteasa.

5 Como se usa en el presente documento, producción por medios recombinantes mediante el uso de métodos de ADN recombinante se refiere al uso de métodos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas codificadas por ADN clonado.

10 Como se usa en el presente documento, un vector (o plásmido) se refiere a elementos individuales que se usan para introducir ácido nucleico heterólogo en células para la expresión o replicación del mismo. Los vectores típicamente permanecen episomales, pero pueden diseñarse para efectuar la integración de un gen o una parte del mismo en un cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamíferos. La selección y uso de dichos vehículos se conoce bien por los expertos en la materia.

15 Como se usa en el presente documento, un vector de expresión incluye vectores que son capaces de expresar ADN que está unido operativamente con secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de efectuar la expresión de dichos fragmentos de ADN. Dichos segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores de selección, un potenciador, una señal de poliadenilación y similares. Los vectores de expresión  
20 generalmente derivan de ADN plasmídico o viral, o pueden contener elementos de ambos. Por tanto, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o de ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que, después de la introducción en una célula hospedadora apropiada, da como resultado la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen los que pueden replicarse en células eucariotas y/o células procariotas y los que  
25 permanecen episomales o los que se integran en el genoma de la célula hospedadora.

Como se usa en el presente documento, vector también incluye "vectores de virus" o "vectores virales". Los vectores virales son virus modificados genéticamente que están unidos operativamente a genes exógenos para transferir  
30 (como vehículos o lanzaderas) los genes exógenos al interior de las células.

Como se usa en el presente documento, un adenovirus se refiere a cualquiera de un grupo de virus que contienen ADN que producen conjuntivitis e infecciones en el tracto respiratorio superior en seres humanos. Como se usa en el presente documento, ADN desnudo se refiere a ADN libre de histonas que puede usarse para vacunas y terapia  
35 génica. El ADN desnudo es el material genético que se hace pasar de una célula a otra durante un proceso de transferencia génica denominado transformación. En la transformación, el ADN purificado o desnudo se capta por la célula receptora y proporcionará a la célula receptora una nueva característica o fenotipo.

Como se usa en el presente documento, operativamente u operativamente unido, cuando hace referencia a segmentos de ADN, significa que los segmentos se disponen de tal manera que funcionan de acuerdo con sus  
40 propósitos pretendidos, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y continúa a lo largo del segmento codificante hasta el terminador.

Como se usa en el presente documento, secuencia de unión a proteínas se refiere a una secuencia de proteína o peptídica que es capaz de unirse específicamente a otras secuencias de proteína o peptídicas en general, a un  
45 conjunto de secuencias de proteína o peptídicas o a una secuencia de proteína o peptídica particular.

Como se usa en el presente documento, marcador epitópico se refiere a un tramo corto de restos de aminoácidos que corresponden a un epítipo para facilitar los análisis bioquímicos e inmunológicos posteriores de la proteína o péptido marcado con epítipo. El marcaje epitópico se consigue añadiendo la secuencia del marcador epitópico a  
50 una secuencia codificante de proteína en un vector de expresión apropiado. Las proteínas marcadas con epítipo pueden purificarse por afinidad usando anticuerpos altamente específicos inducidos contra los marcadores.

Como se usa en el presente documento, secuencia de unión a metal se refiere a una secuencia de proteína o peptídica que es capaz de unirse específicamente a iones metálicos en general, a un conjunto de iones metálicos o  
55 a un ión metálico particular.

Como se usa en el presente documento, el término evaluación pretende incluir la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteasa, o un dominio de la misma, presente en la muestra, y también de obtener un índice, proporción, porcentaje, valor visual u otro valor indicativo del  
60 nivel de la actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta y, por supuesto, no es necesario que las especies químicas detectadas realmente sean el propio producto de proteólisis, sino que pueden ser, por ejemplo, un derivado del mismo o alguna sustancia adicional. Por ejemplo, la detección de un producto de escisión de una proteína del complemento, tal como por SDS-PAGE y tinción de proteínas con azul de Coomassie.

65 Como se usa en el presente documento, actividad biológica se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o las respuestas fisiológicas que tienen lugar después de la administración *in vivo* de un compuesto, composición u

otra mezcla. Actividad biológica, por tanto, incluye los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de dichos compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden observarse en sistemas *in vitro* diseñados para ensayar o usar dichas actividades. Por tanto, para los fines del presente documento, una actividad biológica de una proteasa es su actividad catalítica por la que se hidroliza un polipéptido.

5 Como se usa en el presente documento, equivalente, cuando se refiere a dos secuencias de ácidos nucleicos, significa que las dos secuencias en cuestión codifican la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Cuando se usa equivalente en relación con dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos solamente con sustituciones de aminoácidos (tal como, pero sin limitación, cambios conservativos tales como los expuestos en la Tabla 2 anterior) que no alteran sustancialmente la actividad o función de la proteína o péptido. Cuando equivalente se refiere a una propiedad, no es necesario que la propiedad esté presente en el mismo grado (por ejemplo, dos péptidos pueden presentar diferentes tasas del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades normalmente son sustancialmente iguales. Complementariedad, cuando hace referencia a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridar, típicamente con un desapareamiento menor del 25%, 15% o 5% entre nucleótidos opuestos. Si fuera necesario, se especificará el porcentaje de complementariedad. Típicamente, las dos moléculas se seleccionan de tal manera que hibriden en condiciones de alta rigurosidad.

20 Como se usa en el presente documento, un agente que modula la actividad de una proteína o la expresión de un gen o ácido nucleico disminuye o aumenta o altera de otra manera la actividad de la proteína o, de alguna manera, regula positiva o negativamente o altera de otra manera la expresión del ácido nucleico en una célula.

25 Como se usa en el presente documento, una proteasa que es una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido unido operativamente a un polipéptido diferente. Una proteína quimérica o de fusión proporcionada en el presente documento puede incluir una o más proteasas o una parte de las mismas tal como dominios proteasa monocatenarios de las mismas, y uno o más de otros péptidos para una cualquiera o más de una señal de control de la transcripción/traducción, secuencias señal, un marcador para la localización, un marcador para la purificación, parte de un dominio de una inmunoglobulina G y/o un agente de dirección. Estas proteínas quiméricas o de fusión incluyen las producidas por medios recombinantes como proteínas de fusión, las producidas por medios químicos tales como acoplamiento químico a través, por ejemplo, de acoplamiento a grupos sulfhidrilo, y las producidas mediante cualquier otro método mediante el cual al menos una proteasa, o una parte de la misma, se une, directa o indirectamente, mediante un engarce (o engarces) a otro polipéptido.

35 Como se usa en el presente documento, unido operativamente, cuando hace referencia a una proteína de fusión, se refiere a un polipéptido de proteasa y a un polipéptido que no es proteasa que están fusionados en fase entre sí. El polipéptido no proteasa puede fusionarse con el extremo N o el extremo C del polipéptido de proteasa.

40 Como se usa en el presente documento, un agente de dirección, es cualquier resto, tal como una proteína o parte eficaz de la misma, que proporciona la unión específica del conjugado a un receptor de la superficie celular, que en algunos casos puede internalizar conjugados unidos o partes de los mismos. Un agente de dirección también puede ser uno que promueve o facilita, por ejemplo, el aislamiento por afinidad o purificación del conjugado; la unión del conjugado a una superficie; o la detección de conjugado o de complejos que contienen el conjugado.

45 Como se usa en el presente documento, un conjugado de anticuerpo se refiere a un conjugado en el que el agente de dirección es un anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, derivado o análogo de una molécula se refiere a una parte derivada de o una versión modificada de la molécula.

50 Como se usa en el presente documento, "enfermedad o trastorno" se refiere a una afección patológica en un organismo resultante de una causa o condición que incluye, pero sin limitación, infecciones, afecciones adquiridas, condiciones genéticas, y caracterizada por síntomas identificables. Las enfermedades y trastornos de interés en el presente documento son los que implican la activación del complemento, incluyendo los mediados por la activación del complemento y aquellos en los que la activación del complemento desempeña una función en la etiología o patología. Las enfermedades y trastornos también incluyen los que se producen por la ausencia de una proteína tal como una deficiencia inmunitaria, y/o son de interés en el presente documento los trastornos en los que la activación del complemento no se produce debido a un déficit en una proteína del complemento.

60 Como se usa en el presente documento, un trastorno mediado por el complemento es cualquier trastorno en el que una cualquiera o más de las proteínas del complemento desempeñan una función en la enfermedad, debido a la ausencia o presencia de la proteína. Un trastorno mediado por el complemento es uno que se debe a una deficiencia en una proteína del complemento. Un trastorno mediado por el complemento también es uno que se debe a la presencia de una cualquiera o más de las proteínas del complemento y la activación continuada de la ruta del complemento.

65

5 Como se usa en el presente documento, “tratamiento” de un sujeto con una enfermedad o afección significa que los síntomas del sujeto se alivian total o parcialmente o permanecen estáticos después del tratamiento. Por tanto, el tratamiento incluye profilaxis, terapia y/o cura. Profilaxis se refiere a la prevención de una enfermedad potencial y/o una prevención del empeoramiento de los síntomas o del avance de una enfermedad. El tratamiento también incluye cualquier uso farmacéutico de un interferón modificado y de composiciones proporcionadas en el presente documento.

10 Como se usa en el presente documento, un agente terapéutico, régimen terapéutico, radioprotector o quimioterapéutico significa fármacos y terapias farmacológicas convencionales, incluyendo vacunas, conocidas por los expertos en la materia. Los agentes radioterapéuticos son bien conocidos en la técnica.

15 Como se usa en el presente documento, tratamiento significa cualquier manera en la que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad se mejoran o se modifican beneficiosamente de otra manera. El tratamiento también incluye cualquier uso farmacéutico de las composiciones del presente documento.

20 Como se usa en el presente documento, mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno particular mediante un tratamiento, tal como la administración de una composición farmacéutica y otro producto terapéutico, se refiere a cualquier disminución, permanente o temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que puede atribuirse a o asociarse con la administración de la composición o agente terapéutico.

25 Como se usa en el presente documento, prevención o profilaxis se refiere a métodos en los que se reduce el riesgo de desarrollar la enfermedad o afección.

30 Como se usa en el presente documento, una cantidad eficaz de un compuesto o composición para el tratamiento de una enfermedad particular es una cantidad que es suficiente para mejorar o reducir de alguna manera los síntomas asociados con la enfermedad. Tal cantidad puede administrarse como una sola dosificación o puede administrarse de acuerdo con un régimen con el cual sea eficaz. La cantidad puede curar la enfermedad pero, típicamente, se administra para mejorar los síntomas de la enfermedad. Típicamente, se requiere una administración repetida para conseguir una mejora deseada de los síntomas.

35 Como se usa en el presente documento, “cantidad terapéuticamente eficaz” o “dosis terapéuticamente eficaz”, se refiere a un agente, compuesto, material o composición que contiene un compuesto que es al menos suficiente para producir un efecto terapéutico. Una cantidad eficaz es la cantidad de un agente terapéutico necesaria para prevenir, curar, mejorar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

40 Como se usa en el presente documento, la administración de una proteasa no perteneciente al complemento, tal como una proteasa modificada no perteneciente al complemento, se refiere a cualquier método en el cual la proteasa no perteneciente al complemento se pone en contacto con su sustrato. La administración puede efectuarse *in vivo* o *ex vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, para la administración *ex vivo*, se extrae un fluido corporal, tal como sangre, de un sujeto y se pone en contacto fuera del cuerpo con la proteasa no perteneciente al complemento modificada. Para la administración *in vivo*, la proteasa no perteneciente al complemento modificada puede introducirse en el cuerpo, tal como mediante introducción local, tópica, sistémica y/u otra vía de introducción. La administración *in vitro* incluye métodos tales como métodos de cultivo celular.

45 Como se usa en el presente documento, un anticoagulante es un fármaco que ayuda a prevenir la coagulación de la sangre. Estos fármacos tienden a prevenir la formación de nuevos coágulos o que aumente un coágulo existente.

50 Como se usa en el presente documento, forma de dosificación unitaria se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas para los sujetos humanos y animales y envasadas individualmente como se conoce en la técnica.

55 Como se usa en el presente documento, “paciente” o “sujeto” a tratar incluye seres humanos o animales no humanos. Los mamíferos incluyen: primates tales como seres humanos, chimpancés, gorilas y monos; animales domésticos tales como perros, caballos, gatos, cerdos, cabras, vacas; y roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y jerbos.

60 Como se usa en el presente documento, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o entre más elementos. La asociación puede ser espacial o referirse al uso de los dos o más elementos para un propósito común.

65 Como se usa en el presente documento, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos o compuestos (por ejemplo, agentes, moduladores, reguladores, etc.). Puede ser una solución, una suspensión, un líquido, un polvo, una pasta, una formulación acuosa o no acuosa o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa en el presente documento, un “artículo de fabricación” es un producto que se fabrica y se comercializa. Como se usa a lo largo de esta solicitud, el término pretende incluir polipéptidos de proteasa modificados y ácidos nucleicos contenidos en los artículos de envasado.

Como se usa en el presente documento, fluido se refiere a cualquier composición que puede fluir. Los fluidos, por tanto, incluyen composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones de este tipo.

- 5 Como se usa en el presente documento, un "kit" se refiere a una combinación envasada que opcionalmente incluye reactivos y otros productos y/o componentes para llevar a la práctica los métodos usando los elementos de la combinación. Por ejemplo, se proporcionan kits que contienen un polipéptido de proteasa modificado o una molécula de ácido nucleico proporcionada en el presente documento y otro elemento para un fin incluyendo, pero sin limitación, la administración, diagnóstico y evaluación de una actividad biológica o propiedad. Opcionalmente, los kits incluyen instrucciones para su uso.

Como se usa en el presente documento, un extracto celular se refiere a una preparación o fracción que se prepara a partir de una célula lisada o alterada.

- 15 Como se usa en el presente documento, se dice que un agente se selecciona al azar cuando el agente se selecciona aleatoriamente sin considerar las secuencias específicas implicadas en la asociación de una proteína sola o con sus sustratos, compañeros de unión y/u otros componentes asociados. Un ejemplo de agente seleccionado al azar es el uso de una biblioteca química o una biblioteca combinatoria de péptidos, o un caldo de cultivo de un organismo o medio acondicionado.

- 20 Como se usa en el presente documento, un profármaco es un compuesto que, tras la administración *in vivo*, se metaboliza o se convierte de otra manera en la forma biológica, farmacéutica o terapéuticamente activa del compuesto. Para producir un profármaco, el compuesto farmacéuticamente activo se modifica de tal manera que el compuesto activo se regenera mediante procesos metabólicos. El profármaco puede diseñarse para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de un fármaco, para enmascarar efectos secundarios o la toxicidad, para mejorar el sabor de un fármaco o para modificar otras características o propiedades de un fármaco. Debido al conocimiento de los procesos farmacodinámicos y del metabolismo de fármacos *in vivo*, los expertos en esta materia, una vez que se conoce el compuesto farmacéuticamente activo, pueden diseñar profármacos del compuesto (véase, por ejemplo, Nogarty (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, Nueva York, páginas 388-392).

- 35 Como se usa en el presente documento, un peptidomimético es un compuesto que imita la conformación y ciertas características estereoquímicas de una forma biológicamente activa de un péptido particular. En general, los peptidomiméticos se diseñan para imitar determinadas propiedades deseables de un compuesto, pero no las propiedades no deseadas tales como la flexibilidad, que conduce a una pérdida de la conformación biológicamente activa y la ruptura del enlace. Los peptidomiméticos pueden prepararse a partir de compuestos biológicamente activos sustituyendo determinados grupos o enlaces que contribuyen a las propiedades no deseadas con bioisómeros. Los expertos en la materia conocen bioisómeros adecuados. Por ejemplo, el bioisómero de metileno CH<sub>2</sub>S se ha usado como un reemplazo de amida en análogos de encefalina (véase, por ejemplo, Spatola (1983) páginas 267-357 en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Weinstein, Ed. Volumen 7, Marcel Dekker, Nueva York). La morfina, que puede administrarse por vía oral, es un compuesto que es un peptidomimético del péptido endorfina. Para los fines del presente documento, los polipéptidos en los que uno o más enlaces peptídicos que forman la estructura de un polipéptido se sustituyen con bioisómeros son peptidomiméticos.

- 45 Como se usa en el presente documento, anticuerpo incluye fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab, que se componen de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada.

- 50 Como se usa en el presente documento, un receptor se refiere a una molécula que tiene afinidad por un ligando en particular. Los receptores pueden ser moléculas de origen natural o sintético. Los receptores también pueden denominarse en la técnica antiligandos.

- 55 Como se usa en el presente documento, cebador se refiere a un oligonucleótido que contiene dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, típicamente más de tres, a partir del cual puede iniciarse la síntesis de un producto de extensión de cebador. Las condiciones experimentales que conducen a la síntesis incluyen la presencia de nucleósido trifosfatos y un agente para la polimerización y extensión, tal como ADN polimerasa, y un tampón, temperatura y pH adecuados.

- 60 Como se usa en el presente documento, animal incluye cualquier animal tal como, pero sin limitación; primates incluyendo seres humanos, gorilas y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves de corral tales como pollos; rumiantes, tales como cabras, vacas, ciervos, ovejas; animales ovinos tales como cerdos y otros animales. Los animales no humanos excluyen seres humanos como el animal contemplado. Las proteasas proporcionadas en el presente documento proceden de cualquier fuente animal, vegetal, procariota y fúngica. La mayoría de las proteasas son de origen animal, incluyendo origen de mamífero.

- 65 Como se usa en el presente documento, terapia genética o terapia génica implica la transferencia de un ácido nucleico heterólogo tal como ADN, en determinadas células, las células diana, de un mamífero, particularmente un



ser humano, con un trastorno o afección para la que se desea tal terapia. El ácido nucleico, tal como ADN, se introduce en las células diana seleccionadas, tal como directamente o en un vector o en otro vehículo de liberación de tal manera que el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, se expresa y, por lo tanto, se produce un producto terapéutico codificado. Como alternativa, el ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, puede mediar la expresión de alguna manera de ADN que codifica el producto terapéutico, o puede codificar un producto, tal como un péptido o ARN que de alguna manera media, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. La terapia genética también puede usarse para administrar ácidos nucleicos que codifican un producto génico que sustituye un gen defectuoso o suplementa un producto génico producido por el mamífero o la célula en la que se introduce. El ácido nucleico introducido puede codificar un compuesto terapéutico, tal como una proteasa o una proteasa modificada, que normalmente no se produce en el huésped mamífero o que no se produce en cantidades terapéuticamente eficaces o en un tiempo terapéuticamente útil. Los ácidos nucleicos heterólogos, tales como ADN, que codifican el producto terapéutico pueden modificarse antes de la introducción en las células del hospedador afectado para potenciar o modificar de otra manera el producto o expresión del mismo. La terapia genética también puede implicar la administración de un inhibidor o represor u otro modulador de la expresión génica.

Como se usa en el presente documento, ácido nucleico heterólogo es un ácido nucleico que normalmente no se produce *in vivo* por la célula en la que se expresa o que se produce por la célula pero en un locus diferente o se expresa de manera diferente o media o codifica mediadores que modifican la expresión del ácido nucleico endógeno, tal como ADN, influyendo en la transcripción, traducción u otros procesos bioquímicos regulables. El ácido nucleico heterólogo generalmente no es endógeno para la célula en la que se introduce, pero se ha obtenido de otra célula o se ha preparado sintéticamente. El ácido nucleico heterólogo puede ser endógeno, pero es un ácido nucleico que se expresa en un locus diferente o modificado en su expresión. Generalmente, aunque no necesariamente, dicho ácido nucleico codifica ARN y proteínas que normalmente no se producen por la célula o de la misma manera en la célula en la cual se expresa. Ácido nucleico heterólogo, tal como ADN, también puede referirse a un ácido nucleico extraño, tal como ADN. Por tanto, el ácido nucleico heterólogo o ácido nucleico extraño incluye una molécula de ácido nucleico no presente en la misma orientación o posición exacta que la molécula de ácido nucleico homóloga, tal como ADN, encontrada en un genoma. También puede referirse a una molécula de ácido nucleico de otro organismo o especie (es decir, exógeno).

Cualquier ácido nucleico, tal como ADN, que un experto en la materia reconocería o consideraría heterólogo o extraño para la célula en la que se expresa el ácido nucleico se incluye en el presente documento en la expresión ácido nucleico heterólogo; el ácido nucleico heterólogo incluye el ácido nucleico añadido exógenamente que también se expresa endógenamente. Los ejemplos de ácido nucleico heterólogo incluyen, pero sin limitación, ácido nucleico que codifica proteínas marcadoras rastreables tales como una proteína que confiere resistencia a fármacos, ácido nucleico que codifica sustancias terapéuticamente eficaces, tales como agentes anticancerosos, enzimas y hormonas, y ácido nucleico, tal como ADN, que codifica otros tipos de proteínas tales como anticuerpos. Los anticuerpos que se codifican por ácido nucleico heterólogo pueden secretarse o expresarse sobre la superficie de la célula en la que se ha introducido el ácido nucleico heterólogo.

Como se usa en el presente documento, un producto terapéuticamente eficaz para terapia génica es un producto que se codifica por un ácido nucleico heterólogo, típicamente ADN, de tal manera que, después de la introducción del ácido nucleico en un hospedador, se expresa un producto que mejora o elimina los síntomas o las manifestaciones de una enfermedad hereditaria o adquirida o que cura la enfermedad. También se incluyen moléculas de ácido nucleico biológicamente activas tales como ARNi y antisentido.

Como se usa en el presente documento, un control se refiere a una muestra que es sustancialmente idéntica a la muestra de ensayo, con la excepción de que no se trata con un parámetro de ensayo o, si es una muestra de plasma, puede provenir de un voluntario normal que no padece la afección de interés. Un control también puede ser un control interno.

Como se usa en el presente documento, cuando se dice que un polipéptido consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos mencionada significa que solamente está presente la parte mencionada, o un fragmento de la misma, del polipéptido de longitud completa. Opcionalmente, el polipéptido puede, y generalmente incluirá aminoácidos adicionales de otra fuente o puede insertarse en otro polipéptido. Por ejemplo, para los fines del presente documento, cuando se dice que un polipéptido consiste esencialmente en un dominio proteasa significa que solo la parte del polipéptido es un dominio proteasa o una parte catalíticamente activa del mismo. El polipéptido puede incluir opcionalmente, y generalmente incluirá, secuencias de aminoácidos adicionales no derivadas de proteasa.

Como se usa en el presente documento, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácidos y otros compuestos son, salvo que se indique otra cosa, abreviaturas reconocidas, de acuerdo con su uso común, o la Comisión IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica (véase, (1972) Biochem. 11: 1726).

## B. Diana: Complemento

El sistema del complemento y sus componentes son los sustratos diana para las proteasas modificadas que se

proporcionan en el presente documento. Las proteasas se modifican o se seleccionan o se identifican para escindir uno o más componentes del sistema y, por lo tanto, para proporcionar una forma para modular la actividad del sistema. Dichas proteasas pueden servir como agentes terapéuticos o como agentes terapéuticos candidatos para modular la actividad del sistema del complemento.

5 El sistema del complemento forma parte del sistema inmunitario y desempeña una función en la eliminación de organismos extraños invasores e inicia respuestas inflamatorias. Existen más de 30 proteínas solubles y de la membrana celular que forman parte del sistema del complemento. Estas proteínas actúan no solamente en la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos, sino también en la respuesta inmunitaria innata para reconocer y  
10 destruir patógenos tales como bacterias, células infectadas por virus y parásitos. Las proteínas del complemento se producen constitutivamente por macrófagos y hepatocitos, y están presentes en la circulación o como moléculas inactivas. Diversas proteínas del complemento son proteasas proenzimáticas (denominadas zimógenos) que se activan por sí mismas mediante escisión proteolítica para convertirse en proteasas efectoras que cortan enlaces peptídicos en otras proteínas del complemento para activarlas a su vez. Dado que cada proteasa activada puede  
15 activar muchas moléculas de sustrato, la activación inicial se amplifica rápidamente para producir millones de moléculas efectoras (una cascada). El sistema del complemento constituye una cascada irreversible de sucesos proteolíticos cuya terminación da como resultado la formación de moléculas efectoras múltiples que estimulan la inflamación, facilitan la fagocitosis de antígenos y producen la lisis de algunas células directamente y, por tanto, pueden servir como un punto de intervención terapéutica para el tratamiento de diversos trastornos que comparten  
20 una patología común o que incluyen este sistema en la etiología o patología.

Existen tres rutas distintas a través de las cuales el complemento puede activarse sobre la superficie del patógeno: la ruta clásica, la ruta alternativa y la ruta de la lectina. Estas rutas son distintas ya que los componentes necesarios para su inicio son diferentes, pero las rutas finalmente generan el mismo conjunto de moléculas efectoras (véase, por ejemplo, la Figura 1). Del mismo modo, los sucesos tempranos de cada ruta están gobernados por un mecanismo similar de cascadas enzimáticas desencadenadas en las que se escinden zimógenos del complemento inactivos para producir dos fragmentos, de los que el mayor es una serina proteasa activa. La proteasa activa queda retenida en la superficie del patógeno de manera que el zimógeno del complemento posterior se escinde y se activa para continuar la cascada proteolítica de la activación del complemento. El segundo fragmento generado después  
25 de la escisión del zimógeno es un fragmento peptídico más pequeño que puede actuar como mediador soluble del complemento funcionando como una opsonina o un mediador proinflamatorio.

### 1. Nomenclatura

35 La ruta del complemento contiene más de 30 mediadores solubles (véase la Tabla 3), de los que algunos se generan a partir de la escisión de zimógenos de proteína inactivos para producir dos segmentos. La Tabla 3 representa proteínas del complemento nativas ejemplares y proporciona una descripción de su secuencia polipeptídica, incluyendo la localización en el polipéptido de los fragmentos del complemento codificados de las mismas. Por ejemplo, la SEC ID N°: 315 codifica una proteína del complemento C5 y también codifica un fragmento  
40 C5a de una proteína del complemento, codificado por los restos 678-751 de C5, que presenta actividad del complemento tras su generación después de la escisión de C5 mediante una convertasa C5. Los componentes nativos del complemento se denominan por una C seguida por un número tal como C1, C2, etc. La numeración de los componentes del complemento se basa en el orden de su descubrimiento en lugar del orden de la secuencia de reacciones dentro de la cascada del complemento. Como resultado, la secuencia de reacciones de las cascadas del  
45 complemento es C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 y C9. Después de la activación, los productos de las reacciones de escisión se designan añadiendo letras minúsculas, denominándose generalmente el fragmento más largo "b" y el fragmento más pequeño "a" (es decir, C4 se escinde para generar C4b y C4a). En algunos casos, C2a se designa como el producto de escisión más grande, aunque más generalmente C2b se considera el producto de escisión más grande. Por consiguiente, la convertasa C3b2b se denomina algunas veces C3b2a. Los productos de escisión del  
50 complemento inactivos se designan con una "i" (es decir iC3b). Los componentes del zimógeno de proteína específicos para la ruta alternativa del complemento no se designan mediante una C, sino que se designan mediante letras mayúsculas diferentes tal como Factor B, que después de la escisión se transforma en Bb o Ba. Los dos zimógenos de proteasa iniciadores de la ruta de la lectina se denominan MASP-1 y MASP-2.

55

**Tabla 3: Proteínas del complemento**

Nombre de Entrada	Nº AC	Nombre del Gen	Longitud de aminoácidos	Descripción	SEC ID N°
C1QA_HUMAN	P02745	C1QA	245	Subcomponente C1q del complemento, precursor de cadena A	298
C1QB_HUMAN	P02746	C1QB	251	Subcomponente C1q del complemento, precursor de cadena B	299
C1QC_HUMAN	P02747	C1QG.C1QC	245	Subcomponente C1q del complemento, precursor de cadena C	300

ES 2 400 306 T3

Nombre de Entrada	Nº AC	Nombre del Gen	Longitud de aminoácidos	Descripción	SEC ID Nº
C1R_HUMAN	P00736	C1R	705	Precursor del subcomponente C1r del complemento (Componente 1 del complemento, subcomponente r) [Contiene: cadena pesada de subcomponente C1r del complemento (aa: 18-463); cadena ligera de subcomponente C1r del complemento (aa:464-705)]	301; 302
C1S_HUMAN	P09871	C1S	688	Precursor del subcomponente C1s del complemento (esterasa C1) [Contiene: cadena pesada de subcomponente C1s del complemento (aa: 16-437); cadena ligera de subcomponente C1s del complemento (aa:438-688)]	303, 304
C4BB HUMAN	P20851	C4BPB	252	Precursor de cadena beta de la proteína de unión a C4b	305
C4BP_HUMAN	P04003	C4BPA C4BP	597	Precursor de cadena alfa de la proteína de unión a C4b (C4bp) (Proteína rica en prolina) (PRP)	306
CFAI_HUMAN	P05156	IF	583	Precursor del factor de complemento (EC 3.4.21.45) (inactivador de C3B/C4B) [Contiene: cadena pesada de Factor I del complemento (a: 19-335); cadena ligera de Factor I del complemento (340-583)]	307, 308
CLUS_HUMAN	P10909	CLU	449	Precursor de clusterina (proteína SP-40,40 asociada al complemento) (Inhibidor de la citólisis del complemento) (CLI) (NA1/NA2) (Apolipoproteína J) (Apo-J) (Mensajero 2 de próstata reprimido por testosterona) (TRPM-2) [Contiene: Cadena beta de la clusterina (ApoJalpha) (cadena a de inhibidor de la citólisis del complemento) (aa: 23-227); Cadena alfa de la clusterina (ApoJbeta) (Cadena b de inhibidor de la citólisis del complemento) (aa: 228-449)]	309
CO2_HUMAN	P06681	C2	752	Precursor de C2 del complemento (EC 3.4.21.43) (C3/C5 convertasa)	310, 311
CO3_HUMAN	P01024	C3	1663	Precursor de C3 del complemento [Contiene: Cadena beta de C3 del complemento (aa:23-667); Cadena alfa de C3 del complemento (aa:672-1663); anafilatoxina C3a (aa: 672-748); Cadena alfa' de C3b del complemento (aa: 749-1663); Fragmento C3c del complemento (aa: 749-954); Fragmento C3dg del complemento (aa: 955-1303); Fragmento C3g del complemento (aa: 955-1001); Fragmento C3d del complemento (aa: 1002-1303); fragmento C3f (aa:1304-1320)]	312
CO4_HUMAN	P01028	C4A y C4B	1744	Precursor de C4 del complemento [Contiene: Cadena beta de C4 del complemento (aa:20-675); Cadena alfa de C4 del complemento (aa:680-1446); anafilatoxina C4a (680-756); C4b (aa:757-1446); Cadena gamma de C4 del complemento (aa: 154-1744)1	313
CO5_HUMAN	P01031	C5	1676	Precursor de C5 del complemento [Contiene: cadena beta de C5 del complemento (aa: 19-673); Cadena alfa de C5 del complemento (aa:678-1676); anafilatoxina C5a (aa: 678-751); cadena alfa' de C5 del complemento (aa: 752-1676)]	314
CO6 HUMAN	P13671	C6	934	Precursor del componente del complemento C6	315
CO7 HUMAN	P10643	C7	843	Precursor del componente del complemento C7	316
CO8A_HUMAN	P07357	C8A	584	Precursor de cadena alfa del componente del complemento C8 (Subunidad alfa del componente del complemento 8)	317
CO8B_HUMAN	P07358	C8B	591	Precursor de cadena beta del componente del complemento C8 (Subunidad beta del componente del complemento 8)	318

ES 2 400 306 T3

Nombre de Entrada	Nº AC	Nombre del Gen	Longitud de aminoácidos	Descripción	SEC ID Nº
CO8G_HUMAN	P07360	C8G	202	Precursor de cadena gamma del componente del complemento C8	319
CO9_HUMAN	P02748	C9	559	Precursor del componente del complemento C9 [Contiene: Componente C9a del complemento (aa:22-265); Componente C9b del complemento (aa:266-559)]	320
CR1_HUMAN	P17927	CR1.C3BR	2039	Precursor de tipo 1 del receptor del complemento (receptor C3b/C4b) (antígeno CD35)	321
CR2_HUMAN	P20023	CR2, C3DR	1033	Precursor de tipo 2 del receptor de complemento (Cr2) (Receptor de C3d del complemento) (Receptor del virus de Epstein-Barr) (receptor de EBV) (antígeno CD21)	322
DAF_HUMAN	P08174	DAF, CD55, CR	381	Precursor del factor de aceleración de la degradación del complemento (antígeno CD55)	323
IC1_HUMAN	P05155	SERPING C1NH	500	Precursor del inhibidor de proteasa C1 plasmática (C1 Inh) (C1Inh)	324
MASP1_HUMAN	P48740	MASP1, CRARF, CRARF1, PRSS5	699	Componente de activación del complemento del precursor del factor reactivo con Ra (EC 3.4.21.-) (serina proteasa p100 del factor reactivo con Ra)(RaRF) (Lectina serina proteasa 1 de unión a manano) (serina proteasa asociada con proteína de unión a manosa) (MASP-1) [Contiene: Componente de activación del complemento de cadena pesada de factor reactivo con Ra (aa:20-448); Componente de activación del complemento de cadena ligera de factor reactivo con Ra (aa: 449-699)]	325,326 (V1); 327,328 (V2); 329,330 (V3)
MASP2_HUMAN	000187	MASP2	686	Precursor de serina proteasa 2 de lectina de unión a manano (EC 3.4.21.-) (serina proteasa 2 asociada a proteína de unión a manosa) (MASP-2) (MBL-serina proteasa 2 asociada) [Contiene: cadena A de serina proteasa 2 de lectina de unión a manano (aa:16-444); Cadena 2B de serina proteasa 2 de lectina de unión a manano (aa: 445-686)]	331,332 (V1); 333,334 (V2)
MBL2_HUMAN	P11226	MBL2, MBL	248	Precursor C de proteína de unión a Manosa (MBP-C) (MBP1) (Proteína de unión a manano) (Lectina de unión a manosa)	335
MCP_HUMAN	P15529	MCP	392	Precursor de proteína de cofactor de membrana (antígeno CD46) (Antígeno común de leucocitos de trofoblasto) (TLX)	336
CFAB_HUMAN	P00751	BF	764	Precursor de factor B del complemento (C3/C5 convertasa) (Factor B de properdina) (beta glicoproteína rica en glicina) (GBG) (PBF2) [Contiene: Fragmento Ba del factor B del complemento (aa:26-259); Fragmento Bb del factor B del complemento (aa:260-764)]	337,338
CFAD_HUMAN	P00746	DF	253	Precursor del factor D del complemento (activador de C3 convertasa) (Factor D de properdina) (Adipsina)	339,340
CFAH_HUMAN	P08603	CFH, HF, HF1	1231	Precursor del factor H del complemento (factor 1H)	341,342
PROP_HUMAN	P27918	PFC	469	Precursor de properdina (Factor P)	343,344
FCN2_HUMAN	Q15485	FCN2	313	Ficolina-2 (proteína 2 que contiene domino de colágeno/fibrinógeno; B; lectina p35 de suero; L-Ficolina)	660
FCN1_HUMAN	000602	FCN1 Ficolina	326	Ficolina-1 (proteína 1 que contiene domino de fibrinógeno/colágeno; Ficolina A; M-Ficolina)	661
FCN3_HUMAN	075636	FCN3	299	Ficolina-3 (proteína 3 que contiene dominio de fibrinógeno/colágeno; lecitina 3 p35 que contiene dominio de fibrinógeno/colágeno; antígeno Hakata; Factor-H)	662

## 2. Rutas de inicio del complemento

Las rutas del complemento son distintas ya que se basan en diferentes moléculas y mecanismos para su inicio, pero las rutas son similares ya que convergen para generar el mismo conjunto de moléculas efectoras. El punto de convergencia de las rutas C es la escisión de C3 por la C3 convertasa (una enzima activadora de C3). La convertasa es un nombre generalmente usado para una enzima del complemento que convierte una proteína del complemento inactiva en una que es activa. Por ejemplo, la C3 convertasa convierte la C3 inactiva en C3a activa y C3b. Diferentes complejos enzimáticos tienen actividad C3 convertasa. Por ejemplo, en la ruta clásica, C4b2b actúa como una C3 convertasa, mientras que en la ruta alternativa, C3bBb es una C3 convertasa (véase la Tabla 4). La escisión de C3 genera C3b, que actúa como una opsonina y como la principal molécula efectora del sistema del complemento para reacciones del complemento posteriores, y C3a, que es un péptido mediador de la inflamación. La adición de C3b a cada C3 convertasa forma una C5 convertasa para generar C5a y C5b. C5a, al igual que C3a, es un péptido mediador de inflamación. C5b media los sucesos "tardíos" de la activación del complemento iniciando la secuencia de reacciones que culmina en la generación del complejo de ataque a la membrana (CAM). Aunque las tres rutas producen diferentes C3 y C5 convertasas, todas las rutas producen los productos de corte de C3 y C5 y forman el CAM.

Tabla 4:

Cascadas del Complemento			
	Ruta Alternativa	Ruta Clásica	Ruta de la Lectina
<b>Activadores</b>	Moléculas en la superficie del patógeno LPS, ácido teicoico, zimosán	IgM e IgG unidas a antígeno; moléculas no inmunitarias	Patógenos mediante el reconocimiento de carbohidratos en la superficie
<b>C3 convertasa</b>	C3bBb	C4b2b	C4b2b
<b>C5 convertasa</b>	C3bBb3b	C4b2b3b	C4b2b3b
<b>CAM</b>	C5678poly9	C5678poly9	C5678poly9
<b>anafilatoxinas</b>	C3a, C5a	C3a, C4a, C5a	C3a, C4a, C5a

20

### a. Ruta clásica

C1q es el primer componente de la ruta clásica del complemento. C1q es una proteína de unión dependiente de calcio asociada con la familia de proteínas denominadas colectinas debido a una homología estructural compartida general (Malhotra R et al., Clin Exp Immunol. 1994, 97(2): 4-9; Holmskovet al. Immunol Today. 1994, 15(2): 67-74). La lectina de unión a manosa (MBL, *mannose binding lectin*), el primer componente de la ruta de la lectina, también es un miembro de la familia de las colectinas. Las colectinas se denominan así porque contienen un dominio similar al colágeno y un dominio de lectina. La región amino-terminal similar al colágeno de la estructura de la colectina interacciona con receptores de la superficie celular y confiere a la proteína estabilidad estructural. Las regiones carboxi-terminales de la estructura de las colectinas tienen una actividad lectina dependiente de calcio. El dominio de lectina media la interacción de las colectinas con una amplia diversidad de patógenos debido al reconocimiento de restos de carbohidrato sobre la superficie de los patógenos. Las colectinas, frecuentemente denominadas moléculas de reconocimiento patrón, generalmente actúan como opsoninas para dirigir a los patógenos a las células inmunitarias para la fagocitosis. A diferencia de las colectinas convencionales, tales como la MBL, el dominio de reconocimiento globular carboxi-terminal de C1q no tiene actividad lectina pero puede servir como una molécula de reconocimiento patrón "cargada" debido a diferencias características en el potencial electrostático de la superficie de sus dominios globulares. (Gaboriaud et al. J. Biol. Chem., 2003, 278(47): 46974-46982).

C1q inicia la ruta clásica del complemento de dos modos diferentes. En primer lugar, la ruta clásica se activa por la interacción de C1q con complejos inmunitarios (*es decir* complejos antígeno-anticuerpo o anticuerpos IgG o IgM agregados) relacionando de esta manera la respuesta inmunitaria humoral mediada por anticuerpos con la activación del complemento. Cuando la parte Fab (la región variable) de la IgM o de la IgG se une al antígeno, la conformación de la región Fc (constante) se modifica, permitiendo que C1q se una. C1q debe unirse al menos con 2 regiones Fc para activarse, de esta manera para activar C1q se necesitan dos moléculas de IgG. La IgM en suero es un pentámero de cinco moléculas de IgM con cinco regiones Fc, de esta manera la IgM activa el complemento de un modo más eficaz. Las IgA, IgE e IgD no se unen a C1q y no pueden activar el complemento. Sin embargo, C1q también puede activar el complemento en ausencia de anticuerpos actuando de esta manera en la respuesta inmunitaria innata o inmediata contra la infección. Además de mediante anticuerpos, la activación del complemento también se consigue mediante la interacción de C1q con moléculas no inmunitarias tales como polianiones (liposacáridos bacterianos, ADN y ARN), determinados polisacáridos pequeños, membranas virales, proteína C reactiva (CRP), componente amiloide P sérico (SAP) y componentes de membrana de bacterias, hongos y virus.

C1q es parte del complejo C1 que contiene una sola molécula C1q unida a cada una de las dos moléculas de los zimógenos C1r y C1s. La unión de más de uno de los dominios globulares de C1q a una superficie diana (tal como un anticuerpo agregado o un patógeno), produce un cambio conformacional en el complejo (C1r:C1s)<sub>2</sub> que da como

resultado la activación de la proteasa C1r para escindir C1s para generar una serina proteasa activa. El C1s activo escinde posteriormente los componentes del complemento C4 y C2 para generar C4b y C2b, que juntos forman la C3 convertasa de la ruta clásica. La C3 convertasa escinde C3 en C3b, que se une covalentemente a la superficie del patógeno y actúa como una opsonina y C3a, que estimula la inflamación. Algunas moléculas C3b asociadas con complejos C4b2b producen C4b2b3b que es la cascada clásica de la C5 convertasa. La Tabla 5 resume las proteínas implicadas en la ruta clásica del complemento.

Tabla 5:

Proteínas de la Ruta Clásica		
Componente Nativo	Forma Activa	Función de la Forma Activa
C1(C1q:(C1r:C1s) <sub>2</sub> )	C1q	Se une directamente a las superficies de patógenos e indirectamente a anticuerpos unidos a patógenos
	C1r	Escinde C1s en una proteasa activa
	C1s	Escinde C4 y C2
C4	C4b	Se une a patógenos y actúa como una opsonina; se une a C2 para escindir mediante C1s
	C4a	Mediador peptídico de inflamación
C2	C2b	Enzima activa de la ruta clásica C3/C5 convertasa; escinde C3 y C5
	C2a	Precursor de C2 quinina vasoactiva
C3	C3b	Se une a las superficies de patógenos y actúa como una opsonina; inicia la amplificación mediante la ruta alternativa; se une a C5 para escindir mediante C2b
	C3a	Mediador peptídico de inflamación

**b. Ruta alternativa**

La ruta alternativa se inicia por patógenos extraños en ausencia de anticuerpos. En su lugar, la iniciación del complemento mediante la ruta alternativa se produce a través de la hidrólisis espontánea de C3 en C3b. Una pequeña cantidad de C3b siempre esta presente en los fluidos corporales, debido a la actividad proteasa en el suero y en los tejidos. Las propias células hospedadoras normalmente contienen altos niveles de ácido silícico en las membranas que si se unen inactivan C3b, pero las bacterias contienen bajos niveles de ácido silícico externo y por lo tanto se unen a C3b sin inactivarlo. En la superficie de los patógenos, el zimógeno de proteasa, el Factor B, reconoce a C3b. El Factor D se escinde al Factor B. El Factor D es la única proteasa de activación del sistema C que circula como una enzima activa en lugar de como un zimógeno, pero dado que el Factor B es el único sustrato para el Factor D en presencia de bajos niveles de una proteasa activa en suero normal, es generalmente inocuo para el hospedador. La escisión del Factor B por el Factor D produce el producto activo Bb que puede asociarse con C3b para formar C3bBb, la C3 convertasa de la ruta alternativa. De manera similar a la ruta clásica, la C3 convertasa produce más C3b y C3a a partir de C3. C3b se une covalentemente a la superficie del patógeno y actúa como una opsonina, mientras que C3a estimula la inflamación. Algún C3b se une al complejo para formar C3bBb3b, la ruta alternativa C5 convertasa. C3bBb3b se estabiliza por la proteína plasmática properdina o el Factor P que se une a las superficies microbianas y estabiliza la convertasa. La Tabla 6 resume las proteínas implicadas en la ruta alternativa del complemento.

Tabla 6:

Proteínas de la Ruta Alternativa		
Componente Nativo	Forma Activa	Función de la Forma Activa
C3	C3b	Se une a la superficie de patógenos, se une el Factor B para escindirse por el Factor D
Factor B	Ba	Pequeño fragmento del Factor B, función desconocida
	Bb	Enzima activa de la C3 convertasa y C5 convertasa
Factor D	D	Serina proteasa plasmática, escinde el Factor B cuando está unido a C3b a Ba y a Bb
Factor P (properdina)	P	Proteínas plasmáticas con afinidad por C3bBb convertasa en células bacterianas; estabiliza la convertasa

**c. Lectina**

La ruta de la lectina (denominada también ruta de la MBL) comienza después del reconocimiento y unión de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP; es decir restos de carbohidratos) por proteínas de lectina. Los ejemplos de proteínas de lectina que activan la ruta de la lectina del complemento incluyen la lectina de unión a manosa (MBL, *Mannose Binding Lectin*) y ficolinas (es decir, L-ficolina, M-ficolina y H-ficolina). Como se ha mencionado anteriormente, la MBL es un miembro de la familia de proteínas de las colectinas y por lo tanto existe como un oligómero de subunidades compuesto de cadenas polipeptídicas idénticas conteniendo cada una de ellas un dominio rico en cisteína, similar a colágeno, un cuello y un dominio de lectina o reconocimiento de carbohidratos. La MBL actúa como una molécula de reconocimiento patrón que reconoce restos de carbohidrato, particularmente azúcares neutros, tales como manosa o N-acetilglucosamina (GlcNAc), en la superficie de patógenos mediante su dominio de lectina globular de una manera dependiente de calcio. Además de un papel en el sistema del complemento, la MBL también actúa como una opsonina para facilitar la fagocitosis de patógenos bacterianos, virales y fúngicos mediante células fagocíticas. Además, otros iniciadores de la ruta de la lectina incluyen las ficolinas, incluyendo la L-ficolina, M-ficolina y H-ficolina (véase, por ejemplo, Liu et al. (2005) *J Immunol.*, 175: 3150-6). De manera similar a la MBL, las ficolinas reconocen restos de carbohidrato tales como, por ejemplo, N-acetilglucosamina y estructuras de manosa.

La activación de la ruta alternativa mediante la MBL o las ficolinas es análoga a la activación de la ruta clásica mediante C1q por la cual una sola molécula de lectina interacciona con dos zimógenos de proteasa. En el caso de las proteínas de lectina, los zimógenos son serina proteasas asociadas a MBL, MASP-1 y MASP-2, que son estrechamente homólogos a los zimógenos C1r y C1s de la ruta clásica. Después de que una proteína de lectina reconozca a un PAMP, tal como, por ejemplo, mediante la unión a la superficie del patógeno, MASP-1 y MASP-2 se activan para escindir C4 y C2 para formar la C3 convertasa de la cascada de la MBL. Después, C3b se une al complejo para formar la C5 convertasa de la cascada de la MBL. La activación MASP está implicada no solo en respuestas contra microorganismos, sino en cualquier respuesta que implique la exposición de azúcares neutros, incluyendo, pero sin limitación, daño tisular, tal como el observado en trasplantes de órganos. Del mismo modo que la cascada alterativa, la cascada de la MBL se activa de manera independiente de anticuerpos; del mismo modo que la cascada clásica, la cascada de la MBL utiliza C4 y C2 para formar la C3 convertasa. La Tabla 7 resume las proteínas implicadas en la ruta del complemento de la lectina.

**Tabla 7:**

Proteína de la Ruta de la Lectina		
Componente Nativo	Forma Activa	Función de la Forma Activa
MBL	MBL	Reconoce los PAMP, tal como en la superficie de patógenos (por ejemplo mediante reconocimiento de carbohidratos)
Ficolinas	L-Ficolina; M-Ficolina o H-Ficolina	Reconoce los PAMP, tal como en la superficie de patógenos (por ejemplo mediante reconocimiento de carbohidratos)
MASP-1	MASP-1	Escinde C4 y C2
MASP-2	MASP-2	Escinde C4 y C2

**3. Funciones efectoras mediadas por el complemento**

Independientemente de la ruta de inicio que se utilice, el resultado final es la formación de fragmentos activados de las proteínas del complemento (por ejemplo, las anafilatoxinas C3a, C4a y C5a y los complejos de ataque a membrana C5b-9). Estos fragmentos median diversas funciones, incluyendo la quimiotaxis leucocitaria, la activación de macrófagos, la permeabilidad vascular y la lisis celular (Frank, M. y Fries, L Complement. In Paul, W. (ed.) *Fundamental Immunology*, Raven Press, 1989). En la Tabla 8 se indica un resumen de algunas funciones efectoras de los productos del complemento.

**Tabla 8: Moléculas Efectoras del Complemento y Funciones**

Producto	Actividad
C2b (proquinina)	acumulación de fluido corporal
C3a (anafilatoxina)	desgranulación de basófilos y mastocitos; aumento de permeabilidad vascular; contracción de la musculatura lisa; inducción de células T supresoras

Producto	Actividad
C3b y sus productos	opsonización; Activación de fagocitos
C4a (anafilatoxina)	activación de basófilos y mastocitos; contracción de la musculatura lisa; aumento de permeabilidad vascular
C4b	opsonización
C5a (anafilatoxina; factor quimiotáctico)	activación de basófilos y mastocitos; aumento de permeabilidad vascular; contracción de la musculatura lisa; quimiotaxis; agregación de neutrófilos; estimulación del metabolismo oxidativo; estimulación de la liberación de leucotrienos; inducción de células T auxiliares
C5b67	quimiotaxis; adhesión a otras membranas celulares y lisis de las células testigo ( <i>bystander</i> )
C5b6789 (C5b-9)	lisis de células diana

**a. Lisis mediada por el complemento: Complejo de Ataque a la Membrana**

5 La etapa final de la cascada del complemento de las tres rutas es la formación del complejo de ataque a la membrana (CAM) (Figura 1). C5 puede escindirse por cualquier C5 convertasa en C5a y C5b. C5b se combina con C6 y C7 en solución, y el complejo C5b67 se asocia con la membrana lipídica del patógeno mediante sitios hidrófobos en C7. C8 y diversas moléculas de C9, que también tienen sitios hidrófobos, se unen para formar el complejo de ataque a la membrana, denominado también C5b6789 o C5b-9. C5b-9 forma un poro en la membrana a través del cual pueden pasar agua y solutos, dando como resultado la lisis osmótica y la muerte celular. Si el complemento se activa sobre un antígeno sin una membrana lipídica a la cual C5b67 puede atacar, el complejo C5b67 puede unirse a células vecinas e iniciar la lisis de las células testigo (*bystander*). Un solo CAM puede producir la lisis de un eritrocito, aunque a menos que haya CAM múltiples las células nucleadas pueden endocitosar al CAM y reparar los daños. Las bacterias Gram negativas, con su membrana externa expuesta y los virus con envoltura, son generalmente susceptibles a la lisis mediada por el complemento. Menos susceptibles son las bacterias Gram positivas, cuya membrana plasmática está protegida por su espesa capa de péptidoglucano, las bacterias con una capsula o una capa gelatinosa alrededor de su pared celular, o virus que no tienen envoltura lipídica. Del mismo modo, antes de la inserción en la membrana, el CAM puede alterarse por proteínas que se unen al complemento, tales como el inhibidor estreptocócico del complemento (SIC) y la clusterina. Típicamente, el CAM ayuda a destruir bacterias Gram negativas así como antígenos extraños presentadores de células humanas (células infectadas por virus, células tumorales, etc.) produciendo su lisis y también dañando la envoltura de los virus con envoltura.

**b. Inflamación**

25 La inflamación es un proceso en el que los vasos sanguíneos se dilatan y se hacen más permeables, posibilitando así que las células defensoras y los productos químicos defensores del organismo abandonen la sangre y entren en los tejidos. La activación del complemento da como resultado la formación de diversos mediadores proinflamatorios tales como C3a, C4a y C5a. Las anafilatoxinas intactas en suero o en plasma se convierten rápidamente en las formas C3a-desArg, C4a-desArg o C5a-desArg más estables, menos activas, mediante la carboxipeptidasa N. C3a, C4a y C5a, y en menor grado sus derivados desArg, son fuertes polipéptidos bioactivos, denominados anafilatoxinas debido a su actividad inflamatoria. Las anafilatoxinas se unen a receptores en diversos tipos de células para estimular la contracción de la musculatura lisa, aumentar la permeabilidad vascular y activar a los mastocitos para liberar mediadores inflamatorios. Entre las tres anafilatoxinas, la más fuerte es la C5a. La C5a actúa principalmente sobre los leucocitos y en particular sobre neutrófilos. La C5a estimula la adherencia de leucocitos a las paredes de los vasos sanguíneos en el sitio de infección estimulando el aumento de la expresión de moléculas de adhesión, de tal manera que los leucocitos puedan salir de los vasos sanguíneos e introducirse en los tejidos, un proceso denominado diapédesis. La C5a también estimula a los neutrófilos para producir especies reactivas de oxígeno para la destrucción celular, enzimas proteolíticas y leucotrienos. Además, la C5a también puede amplificar indirectamente los procesos inflamatorios, induciendo la producción de quimiocinas, citocinas y otros mediadores proinflamatorios. La C5a también interacciona con mastocitos para liberar vasodilatadores tales como histamina de tal manera que los vasos sanguíneos se hacen más permeables. La C3a también interacciona con leucocitos, con efectos principales en eosinófilos sugiriendo una función de la C3a en la inflamación alérgica. La C3a induce la contracción de la musculatura lisa, potencia la permeabilidad vascular y produce la desgranulación de basófilos y liberación de histamina y otras sustancias vasoactivas. La C2a puede convertirse a C2 quinina, que regula la presión sanguínea haciendo que los vasos sanguíneos se dilaten.

45 Aunque técnicamente no se considera como una anafilatoxina, el iC3b, un derivado inactivo de C3b, actúa induciendo la adhesión de leucocitos en el endotelio vascular e induce la producción de la citocina proinflamatoria IL-1 mediante la unión a sus receptores de integrina en la superficie celular. C5b-9 también estimula indirectamente la



adhesión, activación y quimiotaxis de leucocitos induciendo la expresión de moléculas de adhesión celular tales como E-selectina, e induciendo la secreción de la interleucina-8 (Bhole et al. (2003) Crit Care Med 31(1): 97-104). C5b-9 también estimula la liberación de mediadores secundarios que contribuyen a la inflamación, tales como, por ejemplo, prostaglandina E<sub>2</sub>, leucotrieno B<sub>4</sub> y tromboxano.

5 La conversión de los componentes del complemento humano C3 y C5 para producir sus respectivos productos de anafilatoxinas se ha implicado en determinados estados patológicos de origen natural que incluyen: enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, tumores malignos, infarto de miocardio, retinopatía de Purtscher, septicemia y síndrome de distrés respiratorio en adultos. Además, se han detectado niveles  
10 aumentados de C3a y C5a en la circulación en determinadas afecciones asociadas con la activación del complemento iatrogénica tales como: cirugía de derivación (*bypass*) cardiopulmonar, diálisis renal y leucoforesis en fibra de nylon. Los niveles elevados de anafilatoxina C4a se asocian con los trastornos autoinmunitarios mencionados anteriormente.

#### 15 c. Quimiotaxis

La quimiotaxis es un proceso mediante el cual las células se dirigen para migrar en respuesta a productos químicos en su entorno. En la respuesta inmunitaria, diversas quimiocinas dirigen el movimiento de las células, tales como células fagocíticas, a sitios de infección. Por ejemplo, C5a es el principal factor quimiotáctico para neutrófilos en  
20 circulación, pero también puede inducir la quimiotaxis de monocitos. Los fagocitos se moverán hacia mayores concentraciones de C5a y posteriormente se unirán, mediante sus receptores CR1, a las moléculas C3b unidas al antígeno. El efecto quimiotáctico de C5a, observado con basófilos, eosinófilos, neutrófilos y fagocitos mononucleares, es activo a concentraciones tan bajas como 10<sup>-10</sup>M.

#### 25 d. Oponización

Una importante acción del complemento es facilitar la captación y destrucción de patógenos mediante células fagocíticas. Esto se produce mediante un proceso denominado opsonización mediante el cual los componentes del complemento se unen a bacterias diana que interactúan con receptores del complemento sobre la superficie de  
30 células fagocíticas tales como neutrófilos o macrófagos. En este caso, las moléculas efectoras del complemento se denominan opsoninas. La opsonización de patógenos es una función principal de C3b y C4b. iC3b también actúa como una opsonina. C3a y C5a aumentan la expresión de los receptores de C3b sobre los fagocitos y aumentan su actividad metabólica.

35 C3b y, en menor medida, C4b ayudan a eliminar del organismo los complejos inmunitarios dañinos. C3b y C4b se unen a los complejos inmunitarios en receptores CR1 sobre eritrocitos. Después, los eritrocitos liberan los complejos para fijarse a macrófagos para la destrucción dentro del bazo e hígado. Los complejos inmunitarios pueden conducir a una hipersensibilidad perjudicial de Tipo III.

#### 40 e. Activación de la respuesta inmunitaria humoral

La activación de las células B requiere el ligamiento del receptor de células B (BCR) por antígeno. Sin embargo, se ha observado que el complemento desempeña una función disminuyendo hasta 1000 veces el umbral de las  
45 respuestas de las células B frente al antígeno. Esto ocurre por la unión de C3d o C3dg, productos del complemento generados a partir de los fragmentos de degradación de C3, a receptores CR2 en linfocitos B que pueden co-ligarse con el BCR. El co-ligamiento se produce cuando partículas antigénicas, tales como, por ejemplo, complejos inmunitarios, opsonizados con C3d se unen al receptor CR2 mediante C3d así como al antígeno a través del BCR. El co-ligamiento de complejos antigénicos también puede producirse cuando C3b se une a antígenos que potencian su captación mediante células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, que después pueden  
50 presentar el antígeno a células B para potenciar la respuesta a anticuerpos. Ratones deficientes de CR2 presentan defectos en la función de las células B que producen niveles reducidos de anticuerpos naturales y respuestas inmunitarias humorales alteradas.

#### 55 4. Receptores del complemento

El reconocimiento de moléculas efectoras del complemento por células para la iniciación de funciones efectoras tales como quimiotaxis y opsonización está mediado por un diverso grupo de receptores del complemento. Los  
60 receptores del complemento se distribuyen sobre una amplia diversidad de tipos de células incluyendo eritrocitos, macrófagos, células B, neutrófilos y mastocitos. Tras la unión al receptor de un componente del complemento, los receptores inician una cascada de señalización intracelular produciendo respuestas celulares tales como estimulación de fagocitosis de bacterias y secreción de moléculas inflamatorias de la célula. Por ejemplo, los receptores del complemento CR1 y CR2 que reconocen C3b, C4b, y sus productos son importantes para estimular la quimiotaxis. CR3 (CD11 b/CD18) y CR4 (CD11c/CD18) son integrinas que son importantes también en las respuestas fagocíticas pero también desempeñan una función en la adhesión y migración de leucocitos en respuesta  
65 a iC3b. Los receptores de C5a y C3a son receptores acoplados a proteína G que desempeñan una función en muchas de las funciones mediadas por efectos pro-inflamatorios de las anafilatoxinas C5a y C3a. Por ejemplo, los

receptores de C3a, C3aR, existen solo en mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos y monocitos y están directamente implicados en los efectos proinflamatorios de C3a.

## 5. Regulación del complemento

5 Aunque el sistema del complemento es beneficioso para el hospedador protegiéndole contra patógenos extraños, la producción de mediadores inflamatorios puede ser tóxica y nociva dando lugar a una amplia diversidad de patologías inflamatorias como se indica más adelante. Del mismo modo, aunque la mayoría de las proteasas activas del sistema del complemento son zimógenos que solo se activan localmente tras la escisión, casi todos los componentes del complemento se activan espontáneamente a bajas tasas en suero y por tanto es preciso minimizar su actividad. Por consiguiente, se han identificado proteínas reguladoras del sistema del complemento. Sus funciones principales son regular la actividad de las moléculas activadoras del complemento para prevenir una excesiva activación del complemento y la destrucción autolítica de los tejidos del hospedador. Estos reguladores del complemento son proteínas solubles en plasma o proteínas integrales de membrana expresadas en diversos tipos de células. Esto último incluye la proteína de unión a C4b (C4bp, *binding protein C4*) y el Factor H. Esto último incluye el receptor C3b/C4b (Receptor 1 del complemento, CR1, CD35), la proteína cofactor de membrana (MCP, *Membrane Cofactor Protein*, CD46), y el factor acelerador de la descomposición (DAF, *Decay Accelerating Factor*, CD55). Estas proteínas poseen muchas similitudes estructurales. Cada una de ellas está compuesta por múltiples repeticiones consenso cortas (SCR, *Short Consensus Repeats*) de aproximadamente 60 aminoácidos de longitud con restos de cisteína, glicina y prolina conservados. Los genes que codifican estas proteínas se han localizado en el cromosoma 1 y se conocen globalmente como reguladores del grupo de los genes de la activación del complemento (RCA, *Regulators for Complement Activation*) (Hourcade et al. (1989) Adv. Immunol. 45: 381).

25 El inhibidor de C1 (C1INH) es un inhibidor de serina proteinasa o serpina que disocia C1r y C1s activados de C1q, limitando el tiempo de actividad del complejo. C1INH también bloquea la activación espontánea de C1 por proteasas plasmáticas. Un déficit de C1INH se asocia con edema espontáneo grave (inflamación) denominado Edema Angioneurótico. Diversas proteínas inhibidoras disocian las C3 y C5 convertasas y promueven la degradación de C4b y C3b por el Factor I, una proteasa plasmática. El Factor I circula en una forma activa pero solo puede escindir C3b y C4b cuando están unidos a una proteína cofactora. El Factor I escinde C3b dando lugar a la producción de iC3b, C3c, C3d, C3f y C3dg inactivando así permanentemente C3b, aunque los productos de degradación pueden actuar como moléculas efectoras, ya que, por ejemplo, iC3b actúa como una opsonina. C4b se inactiva después de la escisión en C4c y C4d. Las proteínas inhibidoras que actúan como cofactores para el Factor I incluyen las proteínas plasmáticas de la proteína de unión a C4 que disocian la C3 convertasa clásica y el Factor H que disocia la C3 convertasa alternativa y proteínas de membrana del Receptor 1 del Complemento (CR1), el Factor Acelerador de la Descomposición (DAF) y Proteína Cofactora de Membrana (MCP) que inhiben la actividad de ambas rutas. Los Cofactores para el Factor I regulan su actividad. Por ejemplo, las células humanas producen el Factor H que se une a C3b y permiten que el Factor I inactiva a C3b. Por otro lado, sustancias tales como LPS en células bacterianas, que de otra manera no expresan cofactores de Factor I, facilitan la unión del Factor B a C3b y esto protege a C3b de la inactivación por el Factor I.

40 Otras proteínas de membrana y plasmáticas bloquean la formación del CAM en células hospedadoras impidiendo la inserción inapropiada del CAM en las membranas. Diversas proteínas plasmáticas, tales como la proteína soluble C8 $\beta$ , se une al complejo C5b67 e inhibe su inserción en la membrana celular. Las membranas de las células hospedadoras también contienen una proteína unida a la membrana denominada HRF (CD59, protectina) que inhibe la unión de C9 a C5b678 para impedir la formación del complejo de ataque a la membrana en células autólogas o alogénicas.

### Factor I

50 El Factor I (fI) es una de las diversas serina proteasas (incluyendo también el factor D, la serina proteasa-2 asociada a la MBL (MASP), C1s, C1r, factor B y C2) del sistema del complemento que desempeña una función en la generación y amplificación de las reacciones de la cascada del complemento. Todas las serina proteasas del complemento comparten homología de dominio con la familia de las tripsinas y comparten algunos de los atributos estructurales que determinan la especificidad por el sustrato. El extremo C del Factor I está constituido por una cadena ligera de serina proteasa de tipo tripsina que, basándose en la homología con otras serina proteasas, contiene los restos que forman la triada catalítica His-Asp-Ser. Adicionalmente, están presentes restos que definen el bolsillo de especificidad (D<sup>501</sup>) y el sitio de unión a sustrato prolongado S<sup>527</sup>, W<sup>528</sup> y G<sup>529</sup> (basándose en la numeración de la proteína madura en ausencia del péptido de señal, véase por ejemplo Tsiftoglou et al., (2005) Biochemistry 44: 6239).

60 El Factor I desempeña una función en la modulación de la activación del complemento escindiendo C3b y C4b, componentes de la C3 convertasa en las rutas clásica, alternativa y de la lectina inactivando así las rutas. La escisión de los sustratos de fI, C3b y C4b, requiere un cambio conformacional en los sustratos producido por la formación de un enlace tioéster. Por ejemplo, la activación proteolítica de C3 a C3b por convertasa da como resultado un cambio conformacional de la forma latente a la forma C3b que conduce a la reacción de un tioéster intramolecular con nucleófilos, tales como agua, dando lugar de esta manera a C3b susceptible de escisión por fI

(Ogata et al., (1998) J Immunol 161: 4785). La reacción del tioéster con agua puede producirse en ausencia de escisión convertasa, dando una forma inactiva hidrolizada de C3 y C4 denominada iC3 e iC4. Por ejemplo, la especie iC3 es un mimético de C3b; iC3 es sensible a escisión por fl y puede sustituirse por C3b en las C3 y C5 convertasas. Generalmente, la escisión de los sustratos C3b y C4b por el Factor I requiere la formación de un complejo ternario con una proteína cofactor, tal como factor H o proteína de unión a C4 y MCP. Sin embargo, la escisión de sustratos sintéticos por el Factor I, no requiere la presencia de cofactores (Tsiftoglou et al., (2004) J Immunol 173: 367-375). La escisión por fl está limitada a la escisión de enlaces arginilo en el sustrato. Los sitios de escisión de fl en C3 son LPSR (SEC ID N°: 388) y SLLR (SEC ID N°: 389) y un sitio de escisión en C4 es HRGR (SEC ID N°: 390).

## 6. Enfermedades y trastornos mediados por el complemento

Debido a la función principal del sistema del complemento en la etiología de las enfermedades y trastornos, el sistema puede servir como un punto de intervención terapéutica en dichas enfermedades y trastornos. Las proteasas proporcionadas en el presente documento dirigen este sistema y permiten su modulación.

El experto en la materia entiende la función del sistema del complemento en los procesos de enfermedades y es consciente de la existencia de una variedad de dichas enfermedades. Lo que se indica a continuación es una descripción de enfermedades ejemplares y la función del sistema del complemento en su etiología y patología. La modulación del sistema del complemento mediante las proteasas proporcionadas en el presente documento pueden servir para tratar dichas enfermedades. Las enfermedades pueden implicar la activación o la inhibición del complemento.

### a. Enfermedades mediadas por la activación del complemento

La cascada del complemento es una espada de doble filo, ya que protege contra la invasión bacteriana y viral promoviendo la fagocitosis y la inflamación. Por el contrario, incluso cuando el complemento funciona normalmente, este puede contribuir al desarrollo de enfermedades promoviendo inflamación local y daños a tejidos. Por tanto, los efectos patológicos están mediados por los mismos mediadores que son responsables de las funciones protectoras del complemento. Por ejemplo, el péptido anafiláctico y quimiotáctico C5a incita la inflamación reclutando y activando neutrófilos, C3a puede producir activación patológica de otros fagocitos y el complejo de ataque a la membrana puede destruir o dañar a las células. En un ejemplo, tal como en muchas enfermedades autoinmunitarias, el complemento produce daños en tejidos debido a que está activado en circunstancias inapropiadas tal como mediante anticuerpos contra tejidos del hospedador. En otras situaciones, el complemento puede activarse normalmente, tal como por septicemia, pero aún contribuye al avance de la enfermedad, tal como en el síndrome de distrés respiratorio. Patológicamente, si no se controla adecuadamente, el complemento puede producir daños sustanciales en vasos sanguíneos (vasculitis), en la membrana basal renal y en células endoteliales y epiteliales unidas (nefritis), en la membrana sinovial articular (artritis) y en eritrocitos (hemolisis).

El complemento tiene una función en la inmunopatogénesis de diversos trastornos incluyendo enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide (véase, *por ejemplo* Wang et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 8955-8959; Moxley et al. (1987) Arthritis & Rheumatism 30: 1097-1104), lupus eritematoso (Wang et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 8563-8568; y Buyon et al. (1992) Arthritis Rheum. 35: 1028-1037) y glomerulonefritis aguda (Couser et al. (1995) JAm Soc Nephrol. 5: 1888-1894). Otras patologías que implican la activación del sistema del complemento incluyen septicemia (véase, *por ejemplo*, Stoveetal. (1996) Clin Diag Lab Immunol 3: 175-183; Hack et al.(1989) Am. J. Med. 86: 20-26), síndrome de distrés respiratorio (véase, *por ejemplo*, Zilow et al. (1990) Clin. Exp. Immunol. 79: 151-157; y Stevens et al. (1986) J. Clin. Invest. 77: 1812-1816), disfunción multiorgánica (véase, *por ejemplo*, Hecke et al. (1997) Shock 7: 74; y Heideman et al. (1984) J. Trauma 24: 25 1038-1043) y lesión de isquemia-reperusión tal como ocurre en las enfermedades cardiovasculares tales como ictus o infarto de miocardio (Austen WG et al. (2003) Int J Immunopathol Pharm 16(1): 1-8). Más adelante se describen algunos ejemplos ilustrativos de enfermedades mediadas por el complemento.

#### i. Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una dolencia inflamatoria crónica. Es una enfermedad autoinmunitaria en la cual el sistema inmunitario ataca a los componentes tisulares normales como si fuesen patógenos invasores. La inflamación asociada con la artritis reumatoide ataca principalmente a los revestimientos de las articulaciones. Las membranas que revisten los vasos sanguíneos, corazón y pulmones también pueden inflamarse. La AR se caracteriza por células B y activadas y células en plasma que están presentes en la membrana sinovial inflamada, y en folículos linfoides y centros germinales de enfermedades establecidas. Esto da como resultado altos niveles de producción de inmunoglobulina local y la deposición de complejos inmunitarios que pueden incluir factores reumatoides de IgG e IgM, en la membrana sinovial y en asociación con cartílago articular que pueden servir como iniciadores de la cascada del complemento. Se han encontrado niveles elevados de componentes del complemento, tales como C3a, C5a y C5b-9 dentro de las articulaciones reumatoides inflamadas. Estos componentes del complemento pueden agravar la inflamación asociada con la AR induciendo diversas actividades proinflamatorias tales como, *por ejemplo*, alteraciones en la permeabilidad vascular, quimiotaxis leucocitaria y la activación y lisis de tipos de células múltiples.

ii. Septicemia

La septicemia es una enfermedad producida por una infección grave, tal como una infección bacteriana, que conduce a una respuesta inflamatoria sistémica. Normalmente, al componente de la pared celular bacteriana, el lipopolisacárido, se le asocia con la septicemia, aunque otras infecciones bacterianas, virales y fúngicas pueden estimular síntomas septicémicos. El choque séptico se produce con frecuencia si el sistema inmunitario natural del organismo no es capaz de defenderse contra un microorganismo invasor tal como, por ejemplo, si las consecuencias proinflamatorias de la respuesta inmunitaria están dañando a los tejidos del hospedador. Las etapas tempranas de la septicemia se caracterizan por una excesiva activación del complemento dando como resultado una producción aumentada de anafilotoxinas del complemento, tales como C3a, C4a y C5a que actúan aumentando la permeabilidad vascular, estimulando la producción de superóxidos a partir de neutrófilos y estimulando la liberación de histamina. Las acciones de C5a pueden contribuir a una respuesta inmunitaria productiva frente a una infección bacteriana, pero sino se regula, C5a también puede dañar gravemente. En un modelo de inflamación inducido en *E. coli*, el bloqueo de C5a mejoró el resultado de animales septicémicos limitando la activación de neutrófilos mediada por C5a que puede conducir a una lesión tisular mediada por neutrófilos.

La disfunción continuada de la respuesta inmunitaria innata contra una infección bacteriana a menudo conduce a septicemia crónica o choque séptico que puede ser letal para la vida. En la etapa tardía de la septicemia, es la actividad "latente" de los neutrófilos, en oposición a la hiperactividad que se produce en las fases tempranas, lo que contribuye a la enfermedad permanente. En la fase tardía, se reducen las funciones principales de los neutrófilos, incluyendo la quimiotaxis, la actividad de la explosión respiratoria y la capacidad para destruir bacterianas.

El complemento, y en particular C5a, también desempeña una función en las fases tardías de la septicemia. La producción excesiva de C5a durante la septicemia se asocia con la "desactivación" de neutrófilos en sangre, un proceso que se ha relacionado con una regulación por disminución inducida por C5a de su propio receptor, C5aR, en neutrófilos (Guo et al. (2003) FASEB J 13: 1889). Los niveles reducidos de C5aR en neutrófilos se correlacionan con una capacidad disminuida de los neutrófilos en sangre de unirse a C5a, respuestas quimiotácticas alteradas, una pérdida de producciones de superóxido y una actividad bactericida alterada. Sin embargo, en las etapas tardías de la septicemia los niveles de C5aR pueden comenzar a "recuperarse" y se correlacionan con ejemplos de resultados de enfermedades beneficiosos.

iii. Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) y su modelo animal, la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), son enfermedades desmielinizantes inflamatorias del sistema nervioso central (SNC). En la EM, la inflamación del tejido nervioso produce la pérdida de mielina, un material graso que actúa como un tipo de aislamiento protector para las fibras nerviosas en el cerebro y en la médula espinal. Esta desmielinización deja múltiples áreas del tejido cicatricial (esclerosis) a lo largo del revestimiento de las células nerviosas, que altera la capacidad de los nervios para conducir impulsos eléctricos a y desde el cerebro, produciendo los diversos síntomas de la EM. La EM está mediada por la activación de linfocitos, macrófagos/microglia y sistema del complemento. La activación del complemento puede contribuir a la patogénesis de estas enfermedades a través de su doble función: la capacidad de complejos terminales activados C5b-9 para promover la desmielinización y la capacidad subléctica de C5b-9 para proteger a los oligodendrocitos (OLG) de la apoptosis.

iv. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por ovillos (filamentos helicoidales emparejados anómalos de la proteína tau, que normalmente se unen a microtúbulos) y placas (depósitos extracelulares compuestos principalmente por la proteína beta-amiloidea) dentro del cerebro. No obstante, no está del todo claro cual es la causa exacta de la EA, la neuroinflamación crónica en las regiones afectadas de cerebros con EA sugieren que mediadores proinflamatorios pueden desempeñar una función. Los ovillos y placas dentro de un cerebro con EA se depositan con fragmentos del complemento activados tales como, por ejemplo, C4d y C3d. Del mismo modo, neuritis distróficas en el cerebro con EA pueden inmunotefirse para detectar el CAM, indicando ataque autocatalítico de estas neuritis y pérdida neurítica simultánea en EA. La activación del complemento en la EA se produce por un mecanismo independiente de anticuerpos inducido por la proteína beta-amiloidea agregada. Adicionalmente, la cascada del complemento puede activarse por pentraxinas, proteína C reactiva (CRP) y amiloide P (AP) todos regulados por aumento en la EA (McGeer et al., (2002) Trends Mol Med 8: 519). La activación del complemento en la EA, caracterizada por un aumento en mediadores del complemento, no se controla adecuadamente mediante una regulación por aumento compensatoria de proteínas reguladoras del complemento, tal como, por ejemplo, CD59. Por lo tanto, las consecuencias proinflamatorias de la activación de complemento agrava el avance de la EA y posiblemente contribuye a la destrucción de neuritas.

v. Lesión de isquemia-reperfusión

La lesión de isquemia-reperfusión es la lesión prolongada después de un suceso isquémico y posterior restablecimiento del flujo sanguíneo y se produce debido a la respuesta inflamatoria frente a una agresión hipóxica.

- La lesión de isquemia-reperfusión puede ser aguda como ocurre durante los procedimientos de cirugía cardíaca, tales como, por ejemplo, después de una cirugía de corazón o angioplastia, o insuficiencia cardíaca congestiva o crónica o enfermedad cardiovascular oclusiva. Los ejemplos de lesiones que pueden producir lesión de isquemia-reperfusión incluyen infarto de miocardio (IM) e ictus. Posiblemente el inicio de una respuesta inflamatoria está producido por el aumento en los niveles de oxígeno en los tejidos que se producen con la reperfusión y la acumulación simultánea de metabolitos que puede generar radicales libres de oxígeno que son inmuoestimuladores. Esto está asociado con diversos sucesos que incluyen gravedad del infarto de miocardio, sucesos isquémicos cerebrales, isquemia intestinal y muchos aspectos de cirugía vascular, cirugía cardíaca, traumatismo y trasplante. La lesión se manifiesta por sucesos inflamatorios del sistema inmunitario innato, particularmente activación del sistema del complemento, en respuesta a tejido nuevamente alterado como no propio. Como tal la lesión de isquemia-reperfusión se caracteriza por edema tisular ocasionado por una permeabilidad vascular aumentada y un infiltrado celular inflamatorio agudo producido por una afluencia de leucocitos polimorfonucleares.
- La activación del sistema del complemento desempeña una función en los sucesos inflamatorios de lesión de isquemia-reperfusión. La lesión de isquemia da como resultado alteraciones de la membrana celular, que afecta a lípidos, carbohidratos o proteínas de la superficie externa de tal manera que estos epítomos expuestos se modifican y pueden actuar como neoantígenos (autoantígenos modificados). La IgM circulante reconoce y se une a los neoantígenos para formar complejos inmunitarios sobre la superficie celular dañada. Los complejos antígeno-anticuerpo formados son activadores clásicos de la ruta clásica del complemento, aunque todas las rutas están posiblemente implicadas de alguna manera agravando los efectos de la lesión. La implicación de la ruta clásica del complemento en la lesión de isquemia-reperfusión se pone de manifiesto con ratones genéticamente deficientes tanto de C3 como de C4 que presentan la misma protección de lesión local en un modelo de lesión animal y de extremidades posteriores (Austen et al. (2003) *Int J Immunopath Pharm* 16: 1). Por otro lado, en un modelo renal de lesión de isquemia, ratones deficientes en C3, C5 y C6 se protegieron mientras que ratones deficientes en C4 no, sugiriendo la importancia de la ruta alternativa del complemento (Guo et al. (2005) *Ann Rev Immunol* 23: 821). Los mediadores inducidos después de la activación del complemento inician una respuesta inflamatoria dirigida a la membrana celular en el sitio de lesión local.
- Un mecanismo efector principal del complemento en la lesión de isquemia-reperfusión es la afluencia y la activación de neutrófilos al tejido inflamado por los componentes del complemento, tal como por ejemplo C5a. La activación de neutrófilos da como resultado la producción aumentada de especies reactivas de oxígeno y la liberación de enzimas lisosomales en órganos con lesión local que finalmente da como resultado la apoptosis, necrosis y una pérdida de función orgánica. La generación del CAM terminal, C5b-9, también contribuye a lesión tisular local en la lesión de isquemia-reperfusión.

#### **b. Enfermedades mediadas por deficiencias del complemento**

- El desarrollo de enfermedades también puede producirse debido a la ausencia de componentes del complemento que son importantes para controlar la infección. Las deficiencias del complemento están relacionadas con infecciones frecuentes y enfermedades del complejo inmunitario. Las deficiencias se han identificado en todos los factores del complemento excepto el C9, incluyendo el Factor D y la properdina. Las deficiencias también se han identificado en las proteínas reguladoras del complemento C1INH, Factor I, Factor H, DAF y HRF.
- En general, las deficiencias en los componentes del complemento da como resultado el aumento de infecciones bacterianas debido a opsonización y fagocitosis reducidas. Típicamente, las deficiencias en los componentes del complemento que actúan como opsoninas, tal como, por ejemplo C3b, dan como resultado una susceptibilidad aumentada contra la infección. Por ejemplo, mientras que individuos deficientes en cualquiera de los componentes del complemento anteriores no resultan relativamente afectados, individuos que carecen de C3, o de cualquiera de las moléculas que catalizan la deposición de C3b, muestran susceptibilidad aumentada contra la infección mediante una amplia diversidad de bacterias extracelulares. Del mismo modo, las personas deficientes en MBL, que normalmente actúa como una opsonina tradicional y como el iniciador de la ruta de la lectina del complemento después del reconocimiento de patógenos extraños, tienen una susceptibilidad aumentada contra la infección, particularmente durante la infancia. La función de deficiencias en los componentes tardíos del complemento, incluyendo C5-C9 que están implicados en la formación del complejo de ataque a la membrana, frente a la infección bacteriana es más limitada. Solo se ha observado que las deficiencias en C5-C9 están asociadas con susceptibilidad contra infección por especies de *Neisseria*, la bacteria que produce gonorrea y meningitis bacteriana.
- Otra consecuencia de la deficiencia del complemento es una enfermedad del complejo inmunitario. Las enfermedades del complejo inmunitario están producidas por una inflamación mediada por el complemento en respuesta a complejos antígeno anticuerpo persistentes en la circulación y en los tejidos. Dado que los componentes tempranos de la ruta clásica del complemento inician el complemento en respuesta al reconocimiento de complejos antígeno-anticuerpo, las deficiencias de estos componentes tempranos, tales como, por ejemplo C1q, pueden producir una patología significativa en enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso sistémico.

Las deficiencias en las proteínas reguladoras del complemento, tales como Factor H, DAF y HRF también pueden dar como resultado enfermedades mediadas por el complemento. Por ejemplo, la activación descontrolada del complemento puede dar como resultado el agotamiento de proteínas del complemento dando como resultado una infección aumentada por bacterias, particularmente bacterias piogénicas ubicuas. Este es el caso de la deficiencia del factor I genético en la que el factor I no está presente y no puede inhibir la activación de la C3 convertasa. Otros ejemplos incluyen las proteínas reguladoras del complemento DAF o HRF, que normalmente actúan para proteger las superficies celulares del mismo individuo de la activación del complemento, pero cuando la deficiencia da como resultado la destrucción de eritrocitos del hospedador se produce la enfermedad de hemoglobinuria paroxística nocturna. Deficiencias en el inhibidor de C1 ocasiona la enfermedad de angioedema hereditario que es un resultado de la actividad no regulada de las enzimas serina proteasas incluyendo los componentes del complemento C1r y C1s, así como otras serina proteinasas tales como el factor XIIa y la calicreína. El resultado de la actividad no regulada de estas serina proteinasas es la producción de una diversidad de mediadores vasoactivos, tales como C2 quinina que se produce por la actividad de C1s y C2a, dando como resultado la acumulación de fluido en los tejidos y la inflamación de la epiglotis que puede conducir a asfixia.

### C. Proteasas

En el presente documento se describen proteasas y métodos de uso de las proteasas para escindir (por lo tanto inactivar) proteínas implicadas en procesos de enfermedad. Típicamente, una proteasa proporcionada en el presente documento es una proteasa que no pertenece al complemento que normalmente no participa en las rutas del complemento. Las proteasas ejemplares descritas en el presente documento escinden una o más proteínas o componentes de la ruta del complemento y sus variantes alélicas. La escisión de una proteína del complemento puede ser una escisión activadora por lo que la actividad de la ruta del complemento se potencia, tal como escindiendo un zimógeno a una forma activada de una proteasa o escindiendo una proteína del complemento en sus moléculas de escisión efectoras. La escisión de una proteína del complemento también puede ser una escisión inhibidora en la que la actividad de la proteína del complemento disminuye. En el presente documento se describen proteasas que escinden una proteína del complemento de una manera inhibidora, inhibiendo de esta manera la activación del complemento de una cualquiera o más de las rutas del complemento. Las proteasas descritas en el presente documento pueden usarse para modular la activación del complemento. Una proteasa descrita en el presente documento puede escindir cualquiera de una o más proteínas del complemento *in vitro* o *in vivo* por lo tanto afectando a la activación del complemento *in vitro* o *in vivo*.

Una proteasa puede ser cualquier parte de una proteasa de longitud completa siempre que la parte de la proteasa conserve la actividad proteolítica. Por ejemplo, una proteasa puede incluir solo el dominio proteasa de un polipéptido o cualquier parte catalíticamente activa de la misma. El dominio proteasa puede incluir un dominio proteasa monocatenario del mismo y puede ser una proteína de fusión o un conjugado siempre que la proteína de fusión o el conjugado resultante conserven la actividad proteolítica.

Si una proteasa, o una parte de la misma, reconoce una secuencia sustrato dentro de una proteína o proteínas diana, tal como, por ejemplo, una proteína del complemento, (i) que modificaría la función, es decir, por inactivación de la proteína (o proteínas) diana tras la catálisis de la hidrólisis del enlace peptídico y (ii) la proteína (o proteínas) diana es un punto de intervención molecular para una enfermedad o enfermedades particulares, en comparación con la proteasa modificada por ingeniería genética con efecto terapéutico mediante un suceso de inactivación mediado por proteólisis. Las actividades del complemento pueden modificarse incluyen, pero sin limitación, hemólisis de eritrocitos y/o la generación de productos de escisión del complemento efectoras tales como, pero sin limitación, C3a, C3b, C4a, C5a, C5b-9 y Bb. Las actividades biológicas del complemento pueden modificarse *in vitro* o *in vivo*. Generalmente, una actividad del complemento se modifica mediante una proteasa al menos 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, o 10 veces en comparación con la ausencia de una proteasa. Típicamente, una actividad biológica se modifica 10, 20, 50, 100 o 1000 veces o más en comparación con la actividad en ausencia de la proteasa. Para los fines del presente documento con referencia a la actividad del complemento, una proteasa modula la activación del complemento o una actividad mediada por el complemento.

Una proteasa descrita, proporcionada en el presente documento, puede proceder de una cualquiera o más clases de serina, cisteína, aspártico, metalo o treonina proteasas. Una proteasa puede someterse a ensayo para determinar si escinde una cualquiera o más de las proteínas del complemento y/o puede usarse como un armazón para realizar modificaciones en uno cualquiera o más de los restos de aminoácidos que modulan la especificidad hacia un sustrato diana y/o modula una actividad de un sustrato diana. Más adelante se describen clases de proteasas y determinantes de aminoácidos ejemplares que contribuyen con la especificidad del sustrato.

### 1. Clases de proteasas

Las proteasas (denominadas también proteinasas o peptidasas) son enzimas degradadoras de proteínas que reconocen secuencias de aminoácidos o un sustrato polipeptídico dentro de una proteína diana. Después del reconocimiento de la secuencia de aminoácidos sustrato, las proteasas catalizan la hidrólisis o escisión de un enlace peptídico dentro de una proteína diana. Dicha hidrólisis de una proteína diana, dependiendo de la localización del enlace peptídico dentro del contexto de la secuencia de longitud completa de la secuencia diana, puede inactivar

una diana.

Las proteasas se clasifican basándose en el modo en el que atacan a las proteínas, exo- o endo- proteasas. Las proteasas o endopeptidasas atacan en el interior de la proteína para producir péptidos grandes. Las peptidasas o exopeptidasas atacan terminaciones o fragmentos de proteína para producir péptidos pequeños y aminoácidos. Las peptidasas se clasifican según su patrón de acción: las aminopeptidasas escinden aminoácidos del extremo amino: las carboxipeptidasas escinden aminoácidos del extremo carboxilo, las dipeptidil peptidasas escinden dos aminoácidos; las dipeptidasas dividen un dipéptido y las tripeptidasas escinden un aminoácido de un tripéptido. La mayoría de las proteasas son pequeñas de 21.000 a 45.000 Daltons. Muchas proteasas se sintetizan y se secretan como formas inactivas denominadas zimógenos y posteriormente se activan por proteólisis. Esto cambia la arquitectura del sitio activo de la enzima.

Las proteasas utilizan diversos tipos distintos de mecanismos catalíticos (Barret et al. (1994) Meth. Enzymol, 244: 18-61; Barret et al. (1994) Meth. Enzymol 244: 461-486; Barret et al. (1994) Meth. Enzymol. 248: 105-120; Barret et al. (1994) Meth. Enzymol. 248: 183-228). Basándose en sus mecanismos catalíticos, las carboxipeptidasas se subdividen en carboxipeptidasas de tipo serina, metalo y cisteína y las endopeptidasas son la serina, cisteína, aspártico, treonina y metaloendopeptidasas. Las serina peptidasas tienen un resto de serina implicado en el centro activo, las aspártico peptidasas tienen dos ácidos aspárticos en el centro catalítico, las peptidasas de tipo cisteína tienen un resto de cisteína, las peptidasas de tipo treonina tienen un resto de treonina y las metalo-peptidasas utilizan un ión metálico en el mecanismo catalítico. Generalmente, las proteasas pueden dividirse en clases basándose en su actividad catalítica de tal manera que las clases de proteasas pueden incluir serina, cisteína, aspártico, treonina o metalo-proteasas. La actividad catalítica de las proteasas es necesaria para escindir un sustrato diana. Por tanto, la modificación de una proteasa para modificar la actividad catalítica de una proteasa podría influir (*es decir* potenciar la especificidad/selectividad) en la capacidad de una proteasa para escindir un sustrato.

Cada proteasa tiene una serie de aminoácidos que reviste el bolsillo del sitio activo y establece contacto directo con el sustrato. Las estructuras cristalográficas de las peptidasas demuestran que el sitio activo se localiza normalmente en un surco en la superficie de la molécula entre dominios estructurales adyacentes, y la especificidad del sustrato está estipulada por las propiedades de los sitios de unión dispuestos a lo largo del surco en uno o ambos lados del sitio catalítico que es responsable de la hidrólisis del enlace escindible. Por consiguiente, la especificidad de una peptidasa se describe por la capacidad de cada subsitio para alojar una cadena lateral de un solo resto de aminoácido. Los sitios se cuentan desde el sitio catalítico, S1, S2...Sn hacia el extremo N del sustrato y S1', S2'...Sn' hacia el extremo C. Los restos que alojan se cuentan P1, P2...Pn, y P1', P2'...Pn', respectivamente. La escisión de una proteína diana se cataliza entre P1 y P1' en la que en los restos de aminoácidos desde el extremo N al extremo C del sustrato polipeptídico se marcan (Pi,.....P3, P2, P1, P1', P2', P3'.....Pj) y sus correspondientes bolsillos de reconocimiento de unión sobre la proteasa se marcan (Si,...., S3, S2, S1, S1', S2', S3',...., Sj) (Schechter y Berger (1967) Biochem Biophys Res Commun 27: 157-162). Por tanto, P2 interacciona con S2, P1 con S1, P1' con S1', etc. Por consiguiente, la especificidad de sustrato de una proteasa proviene de las posiciones S1-S4 en el sitio activo en el que la proteasa está en contacto con los restos P1-P4 de las secuencias del sustrato peptídico. En algunos casos, existe una escasa interacción (si la hubiera) entre los bolsillos S1-S4 del sitio activo, de tal manera que cada bolsillo parece reconocer y unirse al resto correspondiente sobre la secuencia de sustrato peptídico independientemente de los otros bolsillos. Por tanto, los determinantes de especificidad pueden cambiarse en un bolsillo sin afectar la especificidad del otro bolsillo.

Basándose en numerosas estructuras y en el modelado de los miembros de la familia, los restos de la superficie que aportan una mayor especificidad de sustrato y otras interacciones secundarias con un sustrato se han definido para muchas proteasas incluyendo las proteasas de la familia de la serina, cisteína, aspártico, metalo- y treonina proteasa (véase, *por ejemplo*, Wang et al., (2001) Biochemistry 40(34): 10038-46; Hopfner et al., (1999) Structure Fold Des. 7(8): 989-96; Friedrich et al. (2002) J Biol Chem. 277(3): 5 2160-8; Waugh et al., (2000) Nat Struct Biol. 7(9): 762-5; Cameron et al., (1993) J Biol Chem. 268: 11711; Cameron et al., (1994) J Biol Chem. 269: 11170). Una proteasa puede someterse a ensayo para determinar si escinde una cualquiera o más de las proteínas del complemento y/o si puede usarse como un armazón para realizar modificaciones en uno cualquiera o más de los restos de aminoácidos que modulan la especificidad hacia un sustrato diana de las proteínas del complemento y/o si modula una actividad de un sustrato diana de las proteínas del complemento. Para preparar una proteasa modificada con un perfil de reconocimiento de sustrato modificado, los aminoácidos en la estructura tridimensional que aportan la selectividad al sustrato (determinantes de especificidad) pueden dirigirse por mutagénesis. Como se describe más adelante y se proporciona en el presente documento, las proteasas ejemplares incluyen, pero sin limitación, cualquier proteasa tal como una serina, cisteína, aspártico, metalo- o treonina proteasa.

#### a. Serina Proteasas

La serina proteasas (SP), que incluyen enzimas secretadas y enzimas secuestradas en los orgánulos de almacenamiento citoplásmico, tienen diversas funciones fisiológicas, incluyendo funciones en la coagulación sanguínea, curación de heridas, digestión, respuestas inmunitarias e invasión tumoral y metástasis. Por ejemplo, la quimotripsina, tripsina y elastasa actúan en el tracto digestivo; el Factor 10, Factor 11, la Trombina y la Plasmina

participan en la coagulación y curación de heridas; y, como se ha indicado anteriormente, las C1r, C1s y C3 convertasas desempeñan una función en la activación del complemento.

Una clase de proteínas de la superficie celular denominada serina proteasas transmembrana de tipo II son proteasas que son proteínas ancladas a la membrana con dominios extracelulares. Al igual que las proteínas de superficie celular, desempeñan una función en la trasducción de señal intracelular y en la mediación de sucesos proteolíticos de la superficie celular. Otras serina proteasas son membranas unidas y actúan de una manera similar. Otras se secretan. Muchas serina proteasas ejercen su actividad después de unirse a los receptores de la superficie de la célula, y por tanto, actúan en la superficie de las células. La proteólisis de la superficie celular es un mecanismo para la generación de proteínas biológicamente activas que media una diversidad de funciones celulares.

Las serina proteasas, incluyendo las serina proteasas secretadas y transmembrana, participan en procesos que incluyen el desarrollo y la progresión neoplásica. Aunque la función exacta de estas proteasas aún no se ha esclarecido del todo, las serina proteasas y sus inhibidores están implicados en el control de muchos procesos fisiológicos intra- y extra- celulares, incluyendo acciones degradativas en la invasión de células cancerosas y propagación metastásica, y neovascularización de tumores que están implicados en la progresión tumoral. Las proteasas participan en la degradación y remodelación de la matriz extracelular (EMC) y contribuyen a la remodelación tisular, y son necesarias para la invasión y metástasis del cáncer. Se ha demostrado que la actividad y/o expresión de algunas proteasas se correlaciona con el desarrollo y la progresión tumoral.

La actividad de las proteasas en la familia de las serina proteasas depende de una serie de restos de aminoácidos que forman su sitio activo. Uno de los restos es siempre una serina; de ahí su denominación serina proteasa. Por ejemplo, la quimotripsina, la tripsina y la elastasa comparten una estructura similar y, en las tres, su resto de serina activo está en la misma posición (Ser-195). A pesar de sus similitudes, poseen diferentes especificidades de sustrato; escinden diferentes enlaces peptídicos durante la digestión de las proteínas. Por ejemplo, la quimotripsina prefiere una cadena lateral aromática en el resto cuyo carbono carbonilo es parte del enlace peptídico a escindir (grupo R de color azul más adelante). La tripsina prefiere un resto de Lys o de Arg cargado positivamente en esta posición. Las serina proteasas difieren notablemente en sus propiedades de reconocimiento al sustrato: algunas son muy específicas (es decir, las proteasas implicadas en la coagulación sanguínea y en el sistema del complemento inmunitario); algunas solo son parcialmente específicas (es decir, las proteasas digestivas de mamíferos, la tripsina y la quimotripsina); y otras, como la subtilina, una proteasa bacteriana, es completamente inespecífica. A pesar de estas diferencias en cuanto a la especificidad, el mecanismo catalítico de las serina proteasas está bien conservado.

El mecanismo de escisión de una proteína diana por una serina proteasa se basa en el ataque nucleofílico del enlace peptídico diana por una serina. La cisteína, la treonina o las moléculas de agua, asociadas con aspartato o con metales también pueden desempeñar esta función. En muchos casos, la propiedad nucleofílica de grupo se mejora por la presencia de una histidina, ayudando en un "estado aceptor de protones" mediante un aspartato. Las cadenas laterales de serina, histidina y aspartato alineadas construyen la triada catalítica común para la mayoría de la serina proteasas. Por ejemplo, los restos de sitios activos de la quimotripsina y de las serina proteasas, que son miembros de la misma familia que las quimotripsinas, tal como, por ejemplo MT-SP1, son Asp102, His57 y Ser195. Se han identificado más de 20 familias (indicadas como S1-S27) de las serina proteasas y se han agrupado en 6 clanes (SA, SB, SC, SE, SF y SG) basándose en la similitud estructural y en otras pruebas funcionales (Rawlings ND et al. (1994) Meth. Enzymol. 244: 19-61). Estas son similitudes en los mecanismos de reacción de diversas serina proteasas. Los clanes de quimotripsina, subtilina y carboxipeptidasa C tienen una triada catalítica en común de serina, aspartato e histidina: la serina actúa como un nucleófilo, el aspartato como un electrófilo y la histidina como una base. Las orientaciones geométricas de los restos catalíticos son similares entre las familias, a pesar de los diferentes plegamientos de las proteínas. Las disposiciones lineales de los restos catalíticos normalmente reflejan relaciones de clanes. Por ejemplo, en el clan de la quimotripsina (SA), la triada catalítica se dispone como HDS, pero en el clan de subtilina (SB) se dispone como DHS y en el clan de la carboxipeptidasa (SC) como SDH

En toda la familia de la quimotripsina de las serina proteasas, la interacción estructural entre el sustrato y la enzima está completamente conservada, pero las interacciones en la cadena lateral varían considerablemente. La identidad de los aminoácidos que contienen los bolsillos S1-S4 del sitio activo determina la especificidad del sustrato de este bolsillo concreto. El injerto de aminoácidos de una serina proteasa con otros del mismo plegamiento modifica la especificidad de uno con respecto al otro. Típicamente, los aminoácidos de la proteasa que contienen los bolsillos S1-S4 son los que tienen cadenas laterales de 4 a 5 ángstrom dentro del sustrato. Las interacciones que estos aminoácidos tienen con el sustrato de la proteasa se denominan generalmente interacciones de "primer armazón" ("*first shell*") porque se ponen directamente en contacto con el sustrato. Sin embargo, estas interacciones pueden ser de "segundo armazón" ("*second shell*") y de "tercer armazón" ("*third shell*") ya que finalmente sitúan los aminoácidos del primer armazón. Los efectos de la unión al sustrato del primer y segundo armazón se determinan principalmente por bucles entre dominios de tipo beta-barril. Dado que estos bucles no son elementos núcleo de la proteína, la integridad del plegamiento se mantiene mientras que pueden seleccionarse variantes de bucle con nuevas especificidades de sustrato durante el transcurso de la evolución para cumplir con los nichos metabólicos o reguladores necesarios a nivel molecular. Típicamente, para la serina proteasas, los siguientes aminoácidos en la secuencia primaria son determinantes de especificidad: 195, 102, 57 (la triada catalítica); 189, 190,191,192 y 226 (S1); 57, el bucle entre 58 y 64 y 99 (S2); 192, 217, 218 (S3); el bucle entre Cys168 y Cys180, 215 y de 97 a 100



(S4); y 41 y 151 (S2'), basándose en la numeración de la quimotripsina, en la que un aminoácido en una posición S1 influye en la especificidad de P1, un aminoácido en una posición S2 influye en la especificidad de P2, un aminoácido en la posición S3 influye en la especificidad de P3 y un aminoácido en la posición S4 influye en la especificidad de P4. La posición 189 en una serina proteasa es un resto oculto en el fondo del bolsillo que determina la especificidad de S1. En la Tabla 9 se indican determinantes estructurales para diversas serina proteasas, basándose en la numeración de la quimotripsina madura, estando los dominios proteasa de cada una de las proteasas indicadas alineados con los del dominio proteasa de la quimotripsina. El número que aparece debajo del encabezado de la columna Cys168-Cys182 y de la columna bucle de 60 indica el número de aminoácidos en el bucle entre los dos aminoácidos y en el bucle. La indicación si/no debajo del encabezado de la columna Cys191-Cys220 indica si en la proteasa hay un puente disulfuro. Estas regiones son variables dentro de la familia de las serina proteasas similares a la quimotripsina y en si mismas representan determinantes estructurales. La modificación de una proteasa para cambiar cualquiera de uno o más de los aminoácidos en el bolsillo S1-S4 influye en la especificidad o selectividad de una proteasa por un sustrato diana.

15

(Tabla 9 a continuación)

Tabla 9: Determinantes estructurales para diversas serina proteasas

Restos que Determinan Especificidad															
	S4						S3			S2			S1		
	171	174	180	215	Cys168 Cys182	192	218	99	57	Bucle de 60	189	190	226	Cys191 Cys220	
Granzima B	Leu	Tyr	Glu	Tyr	14	Arg	Asn	Ile	His	6	Gly	Ser	Arg	No	
Granzima A	Asn	Val	Met	Phe	17	Asn	Leu	Arg	His	7	Asp	Ser	Gly	Si	
Granzima M	Arg	Ser	Met	Phe	15	Lys	Arg	Leu	His	8	Ala	Pro	Pro	Si	
Catepsina G	Phe	Ser	Gln	Tyr	13	Lys	Ser	Ile	His	6	Ala	Ala	Glu	No	
MT-SP1	Leu	Gln	Met	Trp	13	Gln	Asp	Phe	His	16	Asp	Ser	Gly	Si	
Elastasa de neutrófilos	-	-	-	Thr	5	Phe	Gly	Leu	His	10	Gly	Val	Asp	Si	
Quimasa	Phe	Arg	Gln	Tyr	12	Lys	Ser	Phe	His	6	Ser	Ala	Ala	No	
Alfa-triptasa	Tyr	Ile	Met	Trp	22	lys	Glu	Ile	His	9	Asp	Ser	Gly	Si	
Beta-triptasa(I)	Tyr	Ile	Met	Trp	22	Gln	Glu	Val	His	9	Asp	Ser	Gly	Si	
Beta-triptasa (II)	Tyr	Ile	Met	Trp	22	Lys	Glu	Thr	His	9	Asp	Ser	Gly	Si	
Quimotripsina	Trp	Arg	Met	Trp	13	Met	Ser	Val	His	7	Ser	Ser	Gly	Si	
Easter	Tyr	Ser	Gln	Phe	16	Arg	Thr	Gln	His	14	Asp	Ser	Gly	Si	
Colagenasa	Tyr	Ile	-	Phe	12	Asn	Ala	Ile	His	8	Gly	Thr	Asp	Si	
Factor Xa	Ser	Phe	Met	Trp	13	Gln	Glu	Tyr	His	8	Asp	Ala	Gly	Si	
Proteina C	Met	asn	Met	Trp	13	Glu	Glu	Thr	His	8	Asp	Ala	Gly	Si	
C	Tyr	Gln	Met	Tyr	13	Arg	Pro	Phe	His	11	Asp	Ala	Ala	Si	
Calicreína plasmática	Glu	Arg	Glu	Trp	15	Gln	Leu	Thr	His	11	Asp	Ser	Gly	Si	
Plasmina	Tyr	Lys	Met	Trp	13	Gln	Tyr	Leu	His	6	Asp	Ser	Gly	Si	
Tripsina	Thr	He	Met	Trp	13	Glu	Glu	Leu	His	16	Asp	Ala	Gly	Si	
Trombina	Leu	Thr	Met	Trp	15	Gln	Leu	Tyr	His	11	Asp	Ala	Gly	Si	
tPA	His	Ser	Met	Trp	15	Gln	Arg	His	His	11	Asp	Ser	Gly	Si	
uPA	His	Ser	Met	Trp	15	Gln	Arg	His	His	11	Asp	Ser	Gly	Si	

**i. MT-SP1**

Como ejemplo de la proteasa armazón contemplada para su uso en la modulación de la activación del complemento o como un armazón para una modificación posterior para aumentar su actividad en la modulación de la ruta del complemento es la serina proteasa de tipo membrana MT-SP1 (denominada también matriptasa, TADG-15, supresor de tumorigenicidad 14, ST14); véanse las SEC ID Nos: 1, 2 y Nos de Registro de GenBank: AP118224 y AAD42765; (1999) J. Biol. Chem. 274: 18231-18236; Patente de Estados Unidos Nº 5.792.616; véase también Takeuchi (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 11054-1161. En el presente documento la proteína denominada como un armazón ejemplar es una proteasa MT-SP1 de 855 aminoácidos (véanse las SEC ID Nos: 1 y 2). La molécula de ácido nucleico cuya secuencia se indica en la SEC ID Nº: 1 (véase también Genbank AF118224) codifica la MT-SP1 de 855 aminoácidos (SEC ID Nº: 2, GenBank AAD42765).

Se trata de una proteinasa multidominio con un dominio serina proteinasa C terminal (Friedrich et al. (2002) J Biol Chem 277(3): 2160). Se ha aislado una variante de 683 aminoácidos de la proteasa, pero parece que esta proteína es una forma truncada o una forma ectodominio.

La MT-SP1 se expresa o activa altamente en cánceres de próstata, mama y colorrectal y puede desempeñar una función en la metástasis del cáncer de mama y próstata. La MT-SP1 también se expresa en diversos tejidos epiteliales con altos niveles de actividad y/o expresión en el tracto gastrointestinal humano y en la próstata. Se conocen otras especies de MT-SP1. Por ejemplo, se ha identificado un homólogo de ratón de MT-SP1 y se ha denominado epitina.

La MT-SP1 contiene un dominio transmembrana, dos dominios CUB, cuatro repeticiones LDLR y un dominio serina proteasa (o dominio S1 peptidasa) entre los aminoácidos 615-854 (indicado como SEC ID Nos: 9 y 10), que está muy conservado entre todos los miembros de la familia de peptidasas S1 de las serina proteasas, tal como por ejemplo, con quimotripsina (SEC ID Nos: 7 y 8). La MT-SP1 se sintetiza como un zimógeno y se activa por escisión para formar una doble cadena. Además, solo el dominio proteolítico monocatenario es catalíticamente activo y funcional.

La MT-SP1 pertenece a la familia de las peptidasas S1 de las serina proteasas (denominada también familia de la quimotripsina), que también incluye la quimotripsina y la tripsina. Generalmente, los miembros de la familia de la quimotripsina comparten homología de secuencia y estructural con la quimotripsina. En el presente documento la MT-SP1 se numera de acuerdo con la numeración de la quimotripsina madura, con su dominio proteasa alineado con el del dominio proteasa de la quimotripsina y sus restos se numeran de acuerdo con esto. Basándose en la numeración de la quimotripsina, los restos del sitio activo son Asp102, His57 y Ser195. La secuencia lineal de aminoácidos puede alinearse con la de la quimotripsina y numerarse de acuerdo con las láminas  $\beta$  de la quimotripsina. Las inserciones y deleciones se producen en los bucles entre las láminas beta, aunque en toda la familia estructural, las láminas núcleo se conservan. Las serina proteasas interactúan con un sustrato de una manera lámina beta conservada. Entre el sustrato y la enzima pueden producirse hasta 6 enlaces de hidrógeno conservados. Todas las serina proteasas de la familia de la quimotripsina tienen una región conservada en su extremo N del dominio proteasa que es necesario para la actividad catalítica (es decir, IIGG, WGG o IVGG, en el que el primer aminoácido es este cuartero se numera de acuerdo la numeración de la quimotripsina y proporciona la denominación Ile16. Esta numeración no refleja la longitud de la secuencia precursora).

La especificidad de sustrato de la MT-SP1 en el dominio proteasa se ha mapeado usando una biblioteca combinatoria sintética de exploración posicional y presentación de fagos al sustrato (Takeuchi et al. (2000) J Biol Chem 275: 26333). Los restos de escisión en los sustratos reconocidos por la MT-SP1 contienen Arg/Lys en P4 y restos básicos o Gln en P3, pequeños restos en P2, Arg o Lys en P1 y Ala en P1'. Los sustratos eficaces contienen Lys-Arg-Ser-Arg en los sitios P4 a P1, respectivamente. Generalmente, la especificidad de sustrato para MT-SP1 revela una tendencia mediante la cual si P3 es básico, entonces P4 tiende a ser no-básico y si P4 es básico, entonces P3 tiende a ser no-básico. Los sustratos conocidos para MT-SP1, incluyendo, por ejemplo, el receptor 2 activado por proteinasa (PAR-2), uPA monocatenario (sc-uPA), la proforma de MT-SP1 y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), conforman la secuencia de escisión para los sustratos específicos de MT-SP1.

La MT-SP1 puede escindir sustratos sintéticos seleccionados tan eficazmente como la tripsina, pero presenta una especificidad más limitada para los sustratos que la tripsina. El dominio catalítico de la MT-SP1 tiene un plegamiento estructural global de una serina proteasa de tipo (quimo)tripsina, pero muestra propiedades exclusivas, tales como, subsitios S2/S4 hidrófobos/ácidos y un bucle 60 expuesto. De manera similar, la MT-SP1 no escinde indiscriminadamente sustratos peptídicos en los restos de Lys o de Arg accesibles, ya que necesita el reconocimiento de restos adicionales entorno al enlace peptídico escindible. Esta necesidad de una secuencia primaria extendida pone de manifiesto la especificidad de la MT-SP1 por sus sustratos. Por ejemplo, aunque la MT-SP1 escinde el receptor 2 activado por proteinasa (PAR-2) (presentando una secuencia diana de P4 a P1 de Ser-Lys-Gly-Arg), la enzima no activa proteínas estrechamente relacionadas con este sustrato tales como PAR-1, PAR-3 y PAR-4 que no presentan secuencias diana emparejadas con la especificidad de MT-SP1 extendida cerca del enlace escindible (véase, Friedrich et al. (2002) J Biol Chem 277: 2160).

El dominio proteasa de MT-SP1 (véanse, por ejemplo, las SEC ID Nos: 9 y 10) está compuesto por una pro-región y un dominio catalítico. La parte catalíticamente activa del polipéptido comienza después del sitio de autoactivación en el resto de aminoácido 611 de la proteína madura (véanse, por ejemplo las SEC ID Nos: 1 y 2 en RQAR seguido por los restos VVGG). Los bolsillos S1 de la MT-SP1 y de la tripsina son similares con buena complementariedad por los restos de Lys así como de Arg en P1, explicando así algunas similitudes en cuanto a la escisión del sustrato con la tripsina. El alojamiento de los restos de Lys en P1 está mediado por Ser<sup>190</sup> cuya cadena lateral proporciona un aceptor de enlace de hidrógeno adicional para estabilizar el grupo  $\alpha$ -amino oculto (véase Friedrich et al. (2002) J Biol Chem 277: 2160). El bolsillo S2 se conforma para alojar cadenas laterales hidrófobas de tamaño pequeño a mediano de aminoácidos P2 y generalmente acepta una amplia diversidad de aminoácidos en la posición P2. Después de la unión al sustrato, el subsitio S2 no es rígido como se pone de manifiesto por la rotación del grupo bencilo de Phe<sup>99</sup>. La asociación de los aminoácidos de un sustrato en las posiciones P3 (por restos Gln o básicos) y P4 (por restos Arg o Lys) parece estar mediada por interacciones electrostáticas en los bolsillos S3 y S4 con cadenas laterales ácidas de Asp-217 y/o Asp-96 que podían pre-orientar favorablemente sustratos peptídicos básicos específicos a medida que se acercan a la hendidura del sitio activo enzimático. La cadena lateral de un resto en P3 también puede formar enlaces de hidrógeno con el grupo carboxamida de Gln<sup>192</sup> o, como alternativa, la cadena lateral de P3 puede extenderse hacia el interior del subsitio S4 para formar un enlace de hidrógeno con Phe<sup>97</sup> debilitando de esta manera los enlaces de hidrógeno entre la cadena principal con Gly<sup>216</sup>. En otra conformación, una cadena lateral básica en P3 puede interactuar favorablemente con el potencial negativo del bolsillo S4 de la MT-SP1. La compensación de carga mutua y la exclusión del mismo sitio S4 explica la baja probabilidad de la aparición simultánea de restos Arg/Lys en P3 y P4 en buenos sustratos de MT-SP1. Generalmente, las posiciones de aminoácidos de la MT-SP1 (basándose en la numeración de la quimotripsina) que contribuyen a extender la especificidad para la unión al sustrato incluyen: 146 y 151 (S1'); 189, 190, 191, 192, 216, 226 (S1); 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 99 (S2); 192, 217, 218, 146 (S3); 96, 97, 98, 99, 100, 168, 169, 170, 170A, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 215, 217, 224 (S4). La Tabla 10 resume los restos en MT-SP1 para algunas de las posiciones de aminoácidos importantes para interacciones de especificidad con un sustrato diana. Típicamente, la modificación de una proteasa MT-SP1 para cambiar uno cualquiera o más de los aminoácidos en el bolsillo de unión de especificidad extendida u otros sitios de interacción secundarios influye en la especificidad o selectividad de una proteasa por un sustrato diana.

30 **Tabla 10: Determinantes estructurales para la escisión de sustrato de MT-SP1**

Restos que Determinan Especificidad													
S4					S3		S2			S1			
171	174	180	215	Cys168 Cys182	192	218	99	57	Bucle de 60 (58-64)	189	190	226	Cys191 Cys220
Leu	Gln	Met	Trp	13	Gln	Asp	Phe	His	16	Asp	Ser	Gly	sí

ii. Granzima B

35 También se describe la granzima B

La granzima B es una serina proteasa (de tipo S1) necesaria para dirigir la lisis celular en respuestas inmunitarias mediadas por células. La granzima B está relacionada con una cascada de activación de caspasas (cisteína proteasas específicas de aspartato) responsables de ejecutar la apoptosis y escinde caspasa-3, caspasa-7, caspasa-9 y caspasa-10 para dar lugar a enzimas activas que median la apoptosis. La granzima B (SEC ID N°: 3, GenBank N°: M17016) codifica un polipéptido de 247 aminoácidos (SEC ID N°: 4, GenBank N°: P10144). El polipéptido precursor de la granzima B tiene una secuencia de señal y un péptido de activación propeptídico en los aminoácidos 1 a 20. La proteína granzima B madura se caracteriza por un dominio S1 peptidasa o proteasa de 21-245 aminoácidos.

45 La granzima B es un miembro de la familia de las serina proteasas con plegamiento quimotripsina y tiene una identidad mayor del 50% con otros miembros de la familia de las granzimas incluyendo las granzimas C-G, cathepsina G y proteasa II de mastocitos de rata. La proteína es un emparedado de dos dominios beta-barril antiparalelos de seis cadenas conectados mediante una hélice alfa corta.

50 Un sitio de escisión de sustrato de la granzima B de tipo silvestre tiene un sitio de reconocimiento consenso de I/V (P4)-E/Q/M (P3)-P/T (P2)-D (P1). Estos aminoácidos alinean el bolsillo P1-P4 de sustrato para el reconocimiento y escisión por la granzima B. Generalmente la granzima B tiene una preferencia para escindir después Asp en su reconocimiento consenso.

55 Los determinantes estructurales para la escisión del sustrato de la granzima B se han definido por la estructura tridimensional de la granzima B de rata (SEC ID Nos: 5 y 6) en complejo con la ecotina (IEPD), un inhibidor

macromolecular con un bucle de unión similar al sustrato (Waugh et al., (2000) Nature Struct. Biol 7: 762). La triada catalítica está compuesta por Asp102, His57 y Ser195. Los bucles de superficie se numeran de acuerdo con las adiciones y deleciones en comparación con la alfa-quimotripsina y representan las regiones más variables de esta familia estructural. Otros determinantes de especificidad estructural incluyen Lys 41, Ile99, Arg192, Asn218, Tyr215, Tyr174, Leu172, Arg226 y Tyr151, según la numeración de la quimotripsina. Los otros miembros de la familia de las granzimas de las serina proteasas solo comparten dos de estos aminoácidos con la granzima B. Son Tyr215 y Leu172, dos restos que varían muy poco a través de toda la familia estructural. Esto indica que aunque la identidad de secuencia de las granzimas es alta, sus especificidades de sustrato son muy diferentes. Los determinantes estructurales para la especificidad de sustrato de la granzima B se indican en la Tabla 11, con la numeración de la quimotripsina. Típicamente, la modificación de una proteasa granzima B para cambiar uno cualquiera o más de los aminoácidos en el bolsillo de unión de especificidad extendida, u otros sitios de interacciones secundarias, influye en la especificidad o selectividad de una proteasa por un sustrato diana incluyendo un sustrato diana de las proteínas del complemento.

**Tabla 11: Determinantes estructurales para la escisión de sustrato de la Granzima B**

Restos 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	189	190	226	Cys <sup>191</sup> Cys <sup>220</sup>
Leu	Tyr	Glu	Tyr	14	Arg	Asn	Ile	His	6	Gly	Ser	Arg	no

La importancia de los determinantes estructurales de la granzima B con respecto a la especificidad se ha caracterizado usando una biblioteca de sustrato combinatoria para determinar el efecto de una mutación sobre la especificidad extendida. La mutación de Ile 99, Arg192, Asn218 y Tyr174 con el aminoácido alanina ha demostrado que Ile99 contribuye a la especificidad por P2, Asn218 y Arg192 a la especificidad por P3 y Tyr174 a la especificidad por P4. Dado que la especificidad de una proteasa por P1 representa la mayor parte de su especificidad, las modificaciones no destruyen especificidades exclusivas de la granzima B hacia aminoácidos de ácido aspártico en P1 sino que modulan la especificidad en los sitios de P2 a P4 extendidos. Para los subsitios P3 y P4, las mutaciones en Tyr174, Arg192 y Asn218 no influyeron significativamente en la especificidad. Y174A aumenta la actividad hacia Leu en P4, pero el resto de los aminoácidos continúan seleccionándose mal. Tanto R192A como N218A amplían la especificidad en P3. En lugar de una fuerte preferencia por el ácido glutámico, en una proteasa modificada se introducen Ala, Ser, Glu y Gln. La actividad global ( $K_{cat}/K_m$ ) del mutante es menor del 10% por debajo de la actividad de tipo silvestre hacia un sustrato ideal de tipo silvestre, N-acetil-Ile-Glu-Pro-Asp-AMC (7-amino-4-metilcoumarina) (Ac-IEPD-AMC). Se observa un mayor efecto en el subsitio P2. En la granzima B de tipo silvestre, la preferencia es amplia con una ligera preferencia por los restos de Pro. I99A reduce la especificidad por P2 en los restos de Phe y Tyr. Phe reduce la especificidad en casi 5 veces sobre la actividad media del resto de aminoácidos en esta posición. Dentro de la familia de la quimotripsina de las serina proteasas, más de una docena de proteasas tienen un resto pequeño en este sitio estructural, una asparagina, serina, treonina, alanina o glicina. A partir de este grupo, se han caracterizado dos proteasas usando bibliotecas de sustrato combinatorias (calicreína plasmática y plasmina), y ambas muestran fuertes preferencias hacia Phe y Tyr. Estos dos resultados sugieren que cualquier serina proteasa que se mute por una Asn, Ser, Thr, Gly o Ala en la posición 99 mostrará la misma especificidad hidrófoba encontrada en la calicreína plasmática, plasmina y en el mutante de la granzima B, I99A.

Los determinantes de especificidad por P2 pueden expandirse con respecto a mutaciones de contraste y preferencia de sustrato. Por ejemplo, casi dos docenas de serina proteasas de plegamiento quimotripsina tienen un aminoácido aromático en la posición 99. Cuatro de estas proteasas se han caracterizado usando bibliotecas de sustrato combinatorias: la granzima B humana, el activador de plasminógeno de tipo tisular, el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa y la serina proteasa 1 de tipo membrana. Todas, salvo la granzima B, tienen una preferencia por los aminoácidos serina, glicina y alanina en la posición P2 del sustrato.

**b. Cisteína proteasas**

Las cisteína proteasas tienen un mecanismo catalítico que implica un grupo sulfhidrilo de la cisteína. La desprotonación del sulfhidrilo de la cisteína por un resto de histidina adyacente se produce tras un ataque nucleofílico de la cisteína en el carbono carbonilo del péptido. Un tioéster que enlaza el nuevo extremo carboxi con el tiol de la cisteína es un producto intermedio de la reacción (comparable con el producto intermedio acil-enzima de una serina proteasa). Las cisteína proteasas incluyen papaína, catepsina, caspasas y calpaínas.

Las cisteína proteasas de tipo papaína son una familia de endopeptidasas dependientes de tiol relacionadas por similitud estructural con la papaína. Forman una proteína de dos dominios, D e I (por Derecho e Izquierdo) y los bucles de ambos dominios forman una hendidura de reconocimiento del sustrato. Tienen una triada catalítica constituida por los aminoácidos Cys25, His159 y Asn175. A diferencia de las serina proteasas que reconocen y

proteolizan un péptido diana basándose en una conformación beta-lámina del sustrato, esta familia de proteasas no tiene bolsillos bien definidos para el reconocimiento del sustrato. El reconocimiento del sustrato principal se produce en el aminoácido P2 (en comparación con el resto P1 en las serina proteasas).

5 La especificidad de sustrato de diversas cisteína proteasas (catepsina humana L, V, K, S, F, B, papaína y cruzaina) se ha determinado usando una biblioteca combinatoria sintética de exploración posicional (PS-SCL, *Positional Scanning - Synthetic Combinatorial Library*) diversa completa. La biblioteca completa contiene sustratos tetrapeptídicos P1, P2, P3 y P4 en los que una posición se mantiene fija mientras que las otras tres posiciones se asignan al azar con mezclas equimolares de los 20 aminoácidos posibles, proporcionando una diversidad total de ~  
10 160.000 secuencias tetrapeptídicas.

Globalmente, la especificidad de P1 es casi idéntica entre las catepsinas, siendo Arg y Lys las más favorecidas aunque se toleran aminoácidos alifáticos pequeños. Gran parte de la selectividad se encuentra en la posición P2, donde las catepsinas humanas son estrictamente selectivas por aminoácidos hidrófobos. Es interesante observar que, la especificidad de P2 por restos hidrófobos se divide entre aminoácidos aromáticos tales como Phe, Tyr y Trp (catepsina L, V) y aminoácidos alifáticos voluminosos tales como Val o Leu (catepsina K, S, F). En comparación con la posición P2, la selectividad en la posición P3 es significativamente menos rigurosa. Sin embargo, muchas de las proteasas, tienen una preferencia clara por la prolina (catepsina V, S, y papaína), leucina (catepsina B) o arginina (catepsina S, cruzaina). Las proteasas muestran una amplia especificidad en la posición P4, de tal manera que no se selecciona ningún aminoácido por encima del otro.

El bolsillo S2 es el más selectivo y el mejor caracterizado de los sitios de reconocimiento de sustrato de las proteasas. Se define por los aminoácidos en las siguientes posiciones espaciales (numeración de la papaína): 66, 67, 68, 133, 157, 160 y 205. La posición 205 desempeña una función similar a la de la posición 189 en las serina proteasas, un resto oculto en el fondo del bolsillo que determina la especificidad. Los otros determinantes de especificidad incluyen los siguientes aminoácidos (numeración de acuerdo con la papaína): 61 y 66 (S3); 19, 20 y 158 (S1). En la Tabla 12 se indican los determinantes estructurales para diversas cisteína proteasas. Típicamente, la modificación de una cisteína proteasa, tal como, por ejemplo, una papaína proteasa, para modificar cualquiera de uno o más de los aminoácidos en el bolsillo de unión de especificidad extendida u otros sitios de interacción secundaria, influye en la especificidad o selectividad de una proteína por un sustrato diana, incluyendo un sustrato diana de las proteínas del complemento.

**Tabla 12: Determinantes estructurales para diversas cisteína proteasas**

Restos que Determinan Especificidad													
	Restos del Sitio Activo			S3		S2					S1		
	25	159	175	61	66	66	133	157	160	205	19	20	158
Catepsina L	Cys	His	Asn	Glu	Gly	Gly	Ala	Met	Gly	Ala	Gln	Gly	Asp
Catepsina V	Cys	His	Asn	Gln	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Asp
Catepsina K	Cys	His	Asn	Asp	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Leu	Gln	Gly	Asn
Catepsina S	Cys	His	Asn	Lys	Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Phe	Gln	Gly	Asn
Catepsina F	Cys	His	Asn	Lys	Gly	Gly	Ala	He	Ala	Met	Gln	Gly	Asp
Catepsina B	Cys	His	Asn	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Glu	Gln	Gly	Gly
Papaína	Cys	His	As	Tyr	Gly	Gly	Val	Val	Ala	Ser	Gln	Gly	Asp
Cruzaína	Cys	His	Asn	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Glu	Gln	Gly	Asp

35

**c. Aspártico Proteasas**

Las aspartato proteasas incluyen la pepsina enzimática digestiva, algunas proteasas encontradas en lisosomas, la renina enzimática renal y la proteasa del VIH. Dos restos de aspartato participan en la catálisis ácida/básica en el

sitio activo. En la reacción inicial, un aspartato acepta un protón de una molécula de H<sub>2</sub>O del sitio activo, que ataca al carbono carbonilo del engarce peptídico. De manera simultánea, el otro aspartato dona un protón al oxígeno del grupo carbonilo peptídico. Pueden presentar diversas especificidades, pero típicamente escinden entre dos aminoácidos hidrófobos. Los bolsillos de los subsitios S4, S3, S2, S1, S1', S2', S3' y S4' bien definidos para las cadenas laterales de aminoácidos del sustrato son característicos de estas enzimas (véase *por ejemplo* Brinkworth et al., (2001) J Biol Chem 276: 38844).

Las aspártico proteasas ejemplares incluyen proteasas retrovirales, tales como la PR de tipo 1 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), o la PR del virus de la mieloblastosis aviar/sarcoma de Rous (AMV/RSV) (Cameron et al., (1993) J Biol Chem. 268: 11711). Las PR poseen bolsillos de unión a sustrato que contienen al menos 7 subsitios (S4-S3') que interacciona con 7 aminoácidos del sustrato (P4-P3') (Cameron et al., (1993) J Biol Chem. 268: 11711; Cameron et al., (1994) J Biol Chem. 269: 11170). Los restos de la PR del AMV/RSV que contribuyen a la especificidad del sustrato incluyen P62,142, M73, R105', H7', Q63, R10', D41,164 (S4); H65, V104', R105', G106', Q63, R10', L35', D37', G39, D41, G66, 167, 1108', R111 (S3); I42, I44, H65, M73, A100, A40, D41,164, G66,167', 11Q8 (S2); H65, V104', R105', G106', S107', R10', L35', D37', D37, G39, G66, 167, 1108' (S1); H65', V104, R105, G106, S107, R10, L35, D37, D37', G39', G66', I67', 1108 (S1'), I42', I44', H65', M73', A100', V104', A40', D41', I64', G66', I67, 1108' (S2'); y S38', H65', V104, R105, G106, Q63', R10, L35, G39', D41', 164', G66', 167', 1108, R111' (S3'), donde los restos de aminoácidos en la segunda subunidad del dímero se indican mediante un símbolo prima. Los restos de la PR del VIH-1 que contribuyen a la especificidad de sustrato incluyen D30, V56, P81', R8', D29, 147 (S4); G48, T80', P81' V82', R8', L23', D25', G27, D29, G49, 150, 184', R87 (S3); D30, V32, G48, V56, L76, A28, D29, 147, G49, 150', 184 (S2); G48, T80', P81', V82', N83', R8', L23', ID25', D25, G27, G49, I50, I84' (S1); G48', T80, P81, V82, N83, R8, L23, D25, D25', G27', G49', 150', 184 (S1'); D30', V32', G48', V56', L76', T80' (S2'); y R8, L23, 5 G27', D29', 147', G49', I50', I84, R87' (S3'), donde los restos de aminoácidos en la segunda subunidad del dímero se indican mediante un símbolo prima. Típicamente, la modificación de una aspártico proteasa, tal como, por ejemplo, una proteasa retroviral, para modificar uno cualquiera o más de los aminoácidos en el bolsillo de unión de especificidad extendida, u otros sitios de interacción secundaria, influye en la especificidad o selectividad de una proteasa por un sustrato diana, incluyendo un sustrato diana de las proteínas del complemento.

#### 30 d. Metaloproteasas

Las metaloproteasas (denominadas también Zinc proteasas) incluyen las carboxipeptidasas enzimáticas digestivas, diversas metaloproteasas de la matriz (MMP) secretadas por las células, las ADAM (un dominio desintegrina y metaloproteasa) y proteasas lisosomales. Estas enzimas, incluyendo las ADAM y las MMP, tienen funciones en el desarrollo embrionario, crecimiento y proliferación celular, respuestas inflamatorias, curación de heridas, esclerosis múltiple, artritis y progresión y metástasis del cáncer (Manzetti et al., (2003) J of Computer-Aided Mol. Design, 17: 551). Algunas MMP (por ejemplo, la colagenasa) participan en la degradación de la matriz extracelular durante la remodelación tisular. Por ejemplo, muchas de estas enzimas pueden escindir componentes de la membrana basal y matriz extracelular. Algunas MMP tienen funciones en la señalización celular relacionadas con su capacidad para liberar citocinas o factores de crecimiento, tales como TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  e interleucinas, de la superficie celular por escisión de pre-proteínas unidas a membranas.

Un motivo de unión a cinc en el sitio activo de una metaloproteasa incluye dos restos de histidina cuyas cadenas laterales de imidazol son ligandos para el Zn<sup>++</sup>. Durante la catálisis, el Zn<sup>++</sup> promueve el ataque nucleofílico sobre el carbono carbonilo mediante el átomo de oxígeno de una molécula de agua en el sitio activo. Una base en el sitio activo (un resto de glutamato en la carboxipeptidasa) facilita esta reacción mediante la extracción de un protón de la molécula de agua atacante. Generalmente, estas enzimas tienen un motivo de unión a cinc común (HExxHxxGxxH) en su sitio activo, y un giro de metionina conservado después del sitio activo. La mutación de una cualquiera de las histidinas anula la actividad catalítica. La especificidad del sitio activo difiere entre las metaloproteasas para alojar diferentes estructuras peptídicas de sustratos entorno al enlace escindible. Un determinante molecular crucial de especificidad de sustrato de las MMP es la cadena lateral del aminoácido en la posición P1'. Por tanto, para la escisión, el subsitio S1' es importante en la determinación de la preferencia del enlace peptídico. Por ejemplo, el pequeño bolsillo S1' de la MMP-1 y MMP-7 promueve una preferencia por restos hidrófobos pequeños mientras que otras MMP tienen bolsillos S1' grandes (Overall et al., (2002) Mol Biotech 22: 51). La posición S2 también es un determinante molecular de especificidad. Por ejemplo, entre la MMP-2 y la MMP-9, el subsitio S2 es una de las pocas diferencias entre las hendiduras catalíticas de las MMP donde la presencia de Glu<sup>412</sup> en la MMP-2 frente a Asp<sup>410</sup> en la MMP-9 desempeña importantes funciones en la modificación de la especificidad del sustrato. De hecho, entre la familia más grande de las MMP, la posición Glu<sup>412</sup> es muy variable cuando está ocupada por restos ácidos, restos hidrófobos grandes e incluso glicina. Por otro lado, la mayoría de los restos que rodean el subsitio S2 están estrictamente conservados entre todas las MMP (Chen et al., (2003) J Biol Chem 278: 17158). Otros determinantes moleculares de especificidad se describen en la siguiente Tabla 13 (véase, por ejemplo, Manzetti et al., (2003) J Computer-Aided Mol Design 17: 551). Típicamente, la modificación de una metaloproteasa, tal como por ejemplo una proteasa MMP o ADAM, para cambiar uno cualquiera o más de los aminoácidos en el bolsillo de unión de especificidad extendida, u otros sitios de interacción secundaria, influyen en la especificidad o selectividad de una proteasa por un sustrato diana incluyendo un sustrato diana de las proteínas del complemento.

Tabla 13: Determinantes estructurales para diversas metaloproteasas

	S4	S3	S2	S1	S1'	S2'	S3'	S4'
<b>MMP-3</b>	F210 F83	F210 A169	H166 H211	L164 V198 P221	V163	L164	L164	L222
<b>ADAM9</b>	F317 V318 H357	V318 M315	V318 H351 N356	M315 H357	I344 A313 N373	N373 T312	S374 F333	G310
<b>ADAM 10</b>	P391 V332 W331	V332 P391 N387	V332 H392	L329 H392	L327 T379 A418	V326	N366	T421

#### e. Treonina

5

Las treonina proteasas incluyen las proteosoma hidrolasas. El proteosoma es un complejo proteico grande con forma de barril constituido por subunidades alfa y beta. Las subunidades beta proporcionan la maquinaria catalítica que se encuentra dentro de los dos anillos centrales del complejo. Típicamente, en cada sitio activo, en el mecanismo de catálisis de la subunidad beta catalíticamente activa participa una treonina N-terminal conservada. Las subunidades beta comienzan a activarse cuando el extremo N se escinde, haciendo que la treonina, tal como las treoninas catalíticas, en el resto N terminal se exponga en la superficie luminal. La hidrólisis se inicia por un ataque de un enlace amida por el nucleófilo hidroxilo en la maquinaria catalítica. Los determinantes de especificidad estructural de las subunidades beta del proteosoma se han determinado tal como, por ejemplo, usando bibliotecas de inhibidores covalentes basados en péptidos del proteosoma (véase, por ejemplo, Groll et al., (2002) Chem Biol 9: 655; Zhang et al., (2003) EMBO J, 22: 1488).

10

15

#### D. Proteínas armazón

20

Se describen las proteínas armazón. Las proteínas armazón incluyen cualquier proteasa de tipo silvestre siempre que sean proteasas que no pertenezcan al complemento y también incluyen variante alélicas o especies, o partes catalíticamente activas de las mismas. Las proteínas armazón que pueden usarse para dirigir (es decir, escindir) uno cualquiera o más de los sustratos de la ruta del complemento. Típicamente, dicha escisión produce la inactivación de una ruta del complemento. En algunos casos, dicha escisión puede producir la activación del complemento. Por tanto, dichas proteínas armazón pueden usarse como agentes terapéuticos dirigiendo sustratos de la ruta del complemento para, por ejemplo, inhibir la activación del complemento que está asociada con la etología de diversas enfermedades o trastornos. Las proteínas armazón también son cualquiera de las proteínas que puedan modificarse para escindir un sustrato diana. Entre estas se encuentran las proteasas armazón, cuya especificidad por el sustrato diana puede modificarse. Las proteínas armazón, incluyendo las proteasas, pueden modificarse en uno cualquiera o más aminoácidos de tal manera que la proteína resultante presente una especificidad o selectividad modificada por cualquiera de uno o más de los componentes proteicos de la ruta del complemento y/o module una actividad de una proteína o ruta del complemento. Por ejemplo una proteasa modificada puede tener una especificidad de sustrato modificada de tal manera que la proteasa modificada escinde preferentemente un componente de sustrato diana de la ruta del complemento en comparación con un sustrato no diana, tal como por ejemplo un sustrato nativo de una proteasa armazón de tipo silvestre. En una realización, la especificidad por un sustrato diana puede aumentarse en comparación con la especificidad de una proteasa armazón o de tipo silvestre. En otro ejemplo, una proteína modificada puede presentar una selectividad por un componente del complemento de tal manera que la capacidad de una proteasa modificada para escindir un sustrato particular es mayor que la de cualquier otro sustrato diana por el cual la proteasa modificada también puede presentar especificidad. Adicionalmente, una proteasa modificada puede escindir un sustrato diana, tal como por ejemplo cualquiera de una o más proteínas de una ruta del complemento y modular una actividad de una ruta del complemento.

35

40

45

50

Se describen proteasas armazón ejemplares que pueden usarse para escindir cualquiera de una o más proteínas del complemento o que pueden usarse como un molde para realizar modificaciones en la proteasa para aumentar la especificidad o la actividad del sustrato hacia una o más de las proteínas del complemento. Las proteasas armazón incluyen cualquier proteasa no perteneciente al complemento que es una cualquiera de las clases de serina, cisteína, aspártico, metalo- o treonina proteasas. Las proteasas armazón ejemplares se indican en la Tabla 14 y se describen en el presente documento. Las proteasas armazón incluyen variantes alélicas e isoformas de cualquier proteína, incluyendo los polipéptidos de proteasas armazón ilustrados en cualquiera de las SEC ID Nos: 2, 4, 8, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 13, 115, 17, 119, 121, 123, 125, 127, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 214, 218, 22Q, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262,



264, 266, 268, 269, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 373, 375, 377, 379, 381, 383, 385, 387, 544, 545, 547, 549 y 551.

5 Una proteína armazón o una proteasa armazón puede producirse o aislarse mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo el aislamiento a partir de fuentes naturales, aislamiento de proteínas producidas de forma recombinante en células, tejidos y organismos y mediante métodos recombinantes y mediante métodos que incluyen etapas simuladas por ordenador, métodos sintéticos y cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica. La Tabla 14 indica proteasas armazón ejemplares (véase también, por ejemplo, [www.merops.sanger.ac.uk](http://www.merops.sanger.ac.uk)).  
10 En la tabla se representan los identificadores de secuencia (SEC ID N°:) para la secuencia de nucleótidos y la secuencia precursora de aminoácidos codificada para cada una de las proteasas candidatas ejemplares. En la tabla también se indican los aminoácidos codificados correspondientes al péptido de señal o a la secuencia propeptídica para producir una proteína madura. Adicionalmente, también se indican los aminoácidos que designan el dominio proteasa (es decir, la unidad peptidasa), así como los restos del sitio activo que constituyen, por ejemplo, la triada catalítica de la proteasa respectiva. Dado que las interacciones son dinámicas, las posiciones de los aminoácidos  
15 indicadas son por referencia e ilustración. Las posiciones indicadas reflejan una serie de loci que varían en 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos. También existen variaciones entre variantes alélicas y variantes de especies. Los expertos en la técnica pueden identificar secuencias correspondientes por comparación visual u otras comparaciones incluyendo algoritmos fácilmente y programas informáticos fácilmente disponibles.

20

Tabla 14: Proteasas armazón ejemplares

Código según la base de datos Merops	Nombre	Gen	Nucl. AC NO:	Sinónimo	Proteína AC N°:	SEC ID N°:	Secuencia señal/ propep.	Unidad peptidasa (restos del sitio activo)
S01.010	granzima B, tipo humano	GZMB	M17016	HLP, CCP1, CGL1, CSPB, SECT, CGL-1, CSP-B, CTLA1, CTSGL1	P10144	3, 4	1-18/19-20	21-247 (64, 108, 203)
S01.011	Testisina	PRSS21	NM_00679 9 (v1) NM_14495 6 (v2) NM_144957(v3)	ESP-1, TEST1	NP_00679 0 NP_659205 NP_65920 6	70, 71 (V1); 72, 73 (V2); 74, 75 (V2)	1-19/20-41	42-288 (82, 137, 238)
S01.015	triptasa beta 1 (Homo sapiens) (II)	TPSB1	NM_00329 4	TPS1, TPS2, TPSAB1, alfa II	NP_00328 5	76, 77	1-18/19-30	31-274 (74, 121, 224)
S01.017	calicreina hk5	KLK5	NM_01242 7	SCTE, KLK2, KLK-L2	NP_03655 9	78, 79	1-22/	67-292 (108, 153, 245)
S01.019	Corina		NM_00658 7	CRN, ATC2, Lrp4, TMPRSS1 0	NP_00657 8	80, 81		802-1037 (843, 892, 985)
S01.020	calicreina 12	KLK12	NM_01959 8 (v1) NM_14589 4 (v2) NM_145895(v3) AF064819	KLK-L5	NP_06254 4 NP_66590 1 NP_66590 2	82, 83 (V1); 84, 85 (V2); 86, 87 (V3)	1-17/	22-248 (843, 892, 985 )
S01.021	DESC1 oriteasa				AAF04328	88, 89		191-422 (231, 276, 372)
S01.028	triptasa gamma 1	TPSG1	NM_01246 7	TMT, trpA, PRSS31	NP_036599 9	90, 91	1-19/1	38-272(78, 125, 222)
S01.029	calicreina hK14	KLK14	NM_02204 6	KLK-L6	NP_07132 9	92, 93	1-18/19-24	25-249 (67, 111, 204)
S01.033	serina proteasa de unión a hialuronano (proteína similar al activador del HGF)	HABP2	NM_00413 2	FSAP, HABP, PHBP, HGFAL	NP_00412 3	94, 95	1-23/	314-557 (362, 411, 509)
S01.034	serina, proteasa transmembrana 4	TMPRSS4	NM_01989 4 (v1) NM_18324 7 (v2)	MT-SP2, TMPRSS3	NP_06394 7 NP_89907 0	96, 97 (V1); 98, 99 (V2)		205-436 (245, 290, 387)
S01.054	triptasa delta I (Homo sapiens)	TPSD1	NM_01221 7	MCP7L1, MMCP-7L, MGC9542 8	NP_03634 9	100, 101	1-18/19-30	31-235 (74, 121, 224)
S01.074	Marapsina		NM_03194 8	PRSS27, CAPH2	NP_114154	102, 103	1-22/23-34	35-279 (75, 124, 229)
S01.075	triptasa homólogo 2 (Homo sapiens)		BC036846	PRSS33, EOS	AAN0405 5	104, 105		37-281 (77, 126, 231)

Código según la base de datos Merops	Nombre	Gen	Nucl. AC NO:	Sinónimo	Proteína AC N°:	SEC ID N°:	Secuencia señal/ propep.	Unidad peptidasa (restos del sitio activo)
S01.076	triptasa homólogo 3 (Homo sapiens)		supuestamente solo AC005570 (Cósmido 407D8)			106, 107		67-304 (107, 213, 259)
S01.077	triptasa cromosoma 21 (Homo sapiens)							
S01.079	serina, proteasa transmembrana 3	TMPRSS 3	NM_02402 2 (VA) NM_03240 1 (VB) NM_03240 4 (VC) NM_03240 5 (VD)	DFNB8, DFNB10, ECHOS1, TADG12	NP_07692 7 NP_11577 7 NP_11578 0 NP_11578 1	108, 109 (VA); 110, 111 (VB); 112, 113 (VC); 114, 115 (VD)		217-451 (257, 304, 401)
S01.081	caliceína hK15 (Homo sapiens)		NM_02300 6 (v1) NM_13856 3 (v2) NM_13856 4 (v3) NM_01750 9 (v4)	ACO, HSRNASP H 4(v3)	NP_07538 2 NP_061263 0 NP_61263_1 NP_05997 9	116, 117 (v1); 118, 119 (v2); 120, 121 (v3); 122, 123 (v4)	1-16/17-21	22-256 (62, 106, 209)
S01.085	Memame-AA031 peptidasa (deducida del EST por MEROPS)		BC035384	FLJ16649, MGC3502 2, TRYX3, UNQ2540	AAH3538 4	124,125		1-241 (56, 101, 195)
S01.087	serina proteasa mosaico de tipo membrana		AB048796		BAB39741	126, 127		321-556 (361, 409, 506)
S01.088	memame-AA038 peptidasa		supuestamente solo AL136097 (clon RP11-62C3)		CAC12709	128		10-142 (50, 101)
S01.098	memame-AA128 peptidasa (deducida del EST por MEROPS)		supuestamente solo BC041609		AAH4160 9	129, 130		33-202 (50, 152)
S01.127	tripsina catiónica (Homo sapiens-tipo 1) (catiónica)	PRSS1	NM_00276 9	TRP1, TRY1, TRY4, TRYP1	NP_00276 0	131,132	1-15/16-23	24-246 (63, 107, 200)
S01.131	Elastasa de neutrófilos	ELA2	NM_00197 2	NE, HW, HNE, PMN-E	NP_00196 3	133, 134	1-27/28-29	30-249 (70, 117, 202)
S01.132	serina proteasa 3 asociada a lectina de unión a manano		AF284421		AAK8407 1	135, 136	1-19/	449-710 (497, 553, 664)
S01.133	catépsina G	CTSG	NM_00191 1	CG, MGC2307 8	NP_00190 2	137,138	1-18/19-20	21-245 (64, 108, 201)

Código según la base de datos Merops	Nombre	Gen	Nucl. AC NO:	Sinónimo	Proteína AC N°:	SEC ID N°:	Secuencia señal/ propep.	Unidad peptidasa (restos del sitio activo)
S01.134	mieloblastina (proteína 3)	PRTN3	NM_00277 7	MBT, P29, ACPA, AGP7, PR-3, C-ANCA	NP_00276 8	139,140	1-25/26-27	28-250 (71, 118, 203)
S01.135	granzima A	GZMA	NM_00614 4	HFSP, CTLA3	NP_00613 5	141, 142	1-26/27-28	29-261 (69, 114, 212)
S01.139	granzima M	GZMM	NM_00531 7	METI, LMETI	NP_00530 8	143, 144	1-23/24-25	26-256 (66, 111, 207)
S01.140	quimasa (tipo humano)	CMA1	NM_00183 6	CYH, MCT1	NP_00182 7	145, 146	1-19/21-21	22-247 (66, 110, 203)
S01.143	alfa triptasa	TPS1	NM_00329 4	TPS1, TPS2, TPSB1, alpha II	NP_00328 5	147, 148	1-18/19-30	31-274 (74, 121, 224)
S01.146	granzima K	GZMK	NM_00210 4	TRYP2	NP_00209 5	149, 150	1-24/26-26	27-261 (67, 116, 214)
S01.147	granzima H	GZMH	NM_03342 3	CCP-X, CGL-2, CSP-CCTLA1, CTSG12	NP_21949 1	151,152	1-18/19-20	21-246 (64, 108, 202)
S01.152	quimotripsina B	CTRBI	M24400	CTRB, MGC8803 7	P17538	7, 8	1-18	34-263 (75, 120, 213)
S01.153	elastasa pancreática	ELA1	NM_00197 1		NP_00196 2	153,154	1-8/9-18	19-256 (63, 111, 206)
S01.154	endopeptidasa pancreática E(A)		NM_00574 7	ELA3	NP_00573 8	155,156	1-15/16-28	29-270(73,123, 217)
S01.155	elastasa II pancreática (IIA)		M16652		AAA5238 0	157, 158	1-16/7-28	29-269 (73, 121, 216)
S01.156	Enteropeptidasa	PRSS7	NM_00277 2	ENTK	NP_00276 3	159,160		785-1019 (825, 876, 971)
S01.157	quimotripsina C		NM_00727 2	CLCR	NP_00920 3	161,162	1-16/17-29	30-268 (74, 121, 216)
S01.159	Prostasina	PRSS8	NM_00277 3	3	NP_00276 4	163,164	1-29/30-32	45-288 (85, 134, 238)
S01.160	caliceína 1	KLK1	NM_00225 7	hK1, KLKR, Kik6	NP_00224 8	165, 166	1-18/19-24	25-261 (65, 120, 214)
S01.161	caliceína hK2 (Homo sapiens)	KLK2	NM_00555 1 (v1)NM_00100 2231 (v2)NM_00100 2232 (v3)	hK2, KLK2A2, MGC1220 1	NP_00554 2NP_00100 2231 NP_00100 2232	167,168 (v1); 169, 170 (v2); 171,172 (v3)	1-18/19-24	25-260 (65, 120, 213)
S01.162	caliceína 3	KLK3	NM_00164 8 (v1)NM_00103 0047 (v3)NM_00103 0048 (v4) NM_00103 0049 (v5) NM_00103 0050 (v6)	APS, PSA, hit. KLK2A1	NP_00163 9NP_00102 5218 NP_00102 5219 NP_00102 5220 NP_00102 5221	173, 174 (v1); 175, 176 (v3); 177,178 (v4); 179, 180 (v5); 181,182 (v6)	1-17/18-24	25-260 (65, 120, 213)
S01.174	Mesotripsina	PRSS3	NM_00277 1	MTG, TRY3, TRY4, PRSS4	NP_00276 2	183,184	1-24/	24-246 (63, 107, 200)
S01.205	endopeptidasa pancreática E forma B (B)	ELA3B	NM_00735 2		NP_03137 8	185, 186	1-15/16-28	29-270 (73, 123, 217)

Código según la base de datos Merops	Nombre	Gen	Nucl. AC NO:	Sinónimo	Proteína AC N°:	SEC ID N°:	Secuencia señal/ propep.	Unidad peptidasa (restos del sitio activo)
S01.206	elastasa pancreática II forma B (Homo sapiens) (IIB)		NM_01584 9	MGC9705 2	NP_05693 3	187, 188	1-16/17-28	29-269 (73, 121, 216)
S01.211	Factor de coagulación XIa	F12	NM_00050 5	HAF	NP_00049 6	189,190	1-19/	373-615 (412, 461, 563)
S01.212	callicreina plasmática	KLKB1	NM_00089 2	KLK3	NP_00088 3	191,192	1-19//	391-628 (434, 483, 578)
S01.213	coagulación factor XIa	F11	NM_00012 8(v1) NM_01955 9 (v2)	FXI	NP_00011 9 NP_06250 5	193, 194 (v1); 195, 196 (v2)	1-18/	388-625 (431, 480, 575)
S01.214	factor de coagulación IXa	F9	NM_00013 3	dominio FIX, PTC, HEMB, GLA	NP_00012 4	197,198	1-28/29-46	227-461 (267, 315, 411)
S01.215	factor de coagulación VIIa	F7	NM_00013 1 (v1) NM_01961 6(v2)		NP_00012 2 NP_06256 2	199,200 (v1); 201,202 (v2)	1-20/21-60	213-454 (253, 302, 404)
S01.216	factor de coagulación Xa	F10	NM_00050 4	FX, FXA	NP_00049 5	203,204	1-317 32-40	235-469 (276, 322, 419)
S01.217	Trombina	F2	NM_00050 6	PT	NP_00049 7	205, 206	1-24/25-43	364-620 (406, 462, 568)
S01.218	proteína C (activada)	PROC	NM_00031 2	PROC1, proteína C	NP_00030 3	207,208	1-32/33-42	212-452 (253, 299, 402)
S01.223	Acrosina	ACR	NM_00109 7		NP_00108 8	209,210	1-19	43-292 (88, 142, 240)
S01.224	Hepsina	HPN	NM18298 3(v1) NM_00215 1 (v2)	TMPRSS1	NP_89202 8 NP_00214 2	211, 212 (v1); 213, 214 (v2)		163-407 (203, 257, 353)
S01.228	activador del factor de crecimiento de hepatocitos	HGFAC	NM_00152 8	HGFA	NP_00151 9	215,216	1-35/36-372	408-648 (447, 497, 598)
S01.231	activador de plasminógeno u (uPA)	PLAU	NM_00265 8	ATF, uPA, URK, u-PA	NP_00264 9	217,218	1-20/	179-426 (224, 275, 376)
S01.232	activador de plasminógeno t (tPA)	PLAT	NM_00093 0 (v1) NM_00093 1 (v2) NM_03301 1 (v3)	TPA, T-PA, DKFZp686 I03148	NP_00092 1 NP_00092 2 NP_12750 9	219,220 (v1); 221, 222 (v2), 223,224 (v3)	1-23/24-32 y 33-35	311-562 (357, 406, 513)
S01.233	Plasmina	PLG	NM_00030 1	DKFZp779 M0222	NP_00029 2	225,226	1-19/20-97	581-810 (622, 665, 760)
S01.236	Neurosina	KLK6	NM_00277 4 (vA) NM_00101 2964 (vB) NM_001012965(vC) NM_00101 2966 (vD)	hk6, Bssp, Kik7, SF59, ZYME, PRSS9, PRSS 18, MGC9355, NEUROSI NA	NP_00276 5 NP_00101 2982 NP_00101 2983 NP_00101 2984	227, 228 (vA); 229, 230 (vB); 231,232 (vC); 233, 234 (vD)	1-16/17-21	22-244 (62, 106, 197)

Código según la base de datos Merops	Nombre	Gen	Nucl. AC NO:	Sinónimo	Proteína AC N°:	SEC ID N°:	Secuencia señal/ propep.	Unidad peptidasa (restos del sitio activo)
S01.237	Neurofisinina	PRSS12	NM_00361 9	BSSP3, BSSP-3, MGC12722, MOTOPSINA	NP_00361 0	235,236	1-20//	631-875 (676, 726, 825)
S01.242	triptasa beta 2 (Homo sapiens) (I)	TPSB1	N_02416 4	TPS2,TPSB1, triptasaC	NP_07707 8	237,238	1-30/	31-268
S01.244	Neuropsina	KLK8	NM_00719 6 (v1)NM_14450 5(v2)NM14450	NP, HNP, NRPN, PRSS19, TADG14	NP_00912 7NP_65308 8 NP_65308	239, 240 (v1); 241, 242 (v2), 243,244 (v3); 245,	1-28/29-32	33-258 (73, 120, 212)
S01.246	caliceína hK10 (Homo sapiens)	KLK10	6 (v3) NM_14450 7 (v4) NM00277 6(v1) NM_14588 8		9 NP_65309 0	246 (v4)		
S01.247	Epiteliasina	TMPRSS2	NM_00565 6	PRSS10	NP_00276 7NP_65589 5	247,248 (v1); 249, 250 (v2)	1-30/	35-276 (86, 137, 229)
S01.251	Prostasa	KLK4	NM_00491 7	ARM1, EMSP, PSTS, EMSP1, KLK-L1, PRSS17	NP_00564 7	251,252		256-491 (296, 345, 441)
S01.252	Serina proteinasa 2 cerebral		NM_02211 9	BSSP-4, MGC9599, SP001LA, hBSSP-4	NP_00490 8	253,254	1-26/27-30	31-254 (71, 116, 207)
S01.256	Quimopasina	CTRL	NM_00190 7	CTRL1, MGC7082 1	NP_07140 2	255,256	1-32	50-292 (90, 141, 242)
S01.257	caliceína 11	KLK11	NM00685 3(v1) NIVM4494 7 (v2)	TLSF, PRSS20, MGC3306 0	NP_00189 8	257,258	1-18/19-33	34-264 (75, 121, 214)
S01.258	tripsina aniónica (Homo sapiens) (I)	PRSS2	NM_00277 0	TRY2, TRY8, TRYP2	NP_00684 4NP_65919 6	259,260 (v1); 261,262 (v2)	1-50/51-53	22-250 (62,110, 203)
S01.291	LOC14475 7 peptidasa (Homo sapiens)		Supuesta BC048112	MGC5734 1	NP_00276 1	263,264	1-15/16-23	24-246( 63, 107, 200)
S01.292	Memame-AA169 peptidasa		BN000133		AAH4811 2	265,266		78-319 (122, 171, 268)
S01.294	Memame-AA171 peptidasa		Supuestamente sin ADN		CAD67985	267,268	1-19	175-406 (215, 260, 356)
S01.298	Memame-AA174 peptidasa		sec supuestamente son ADN	TRY6	AAC80208	269		
S01.299	Memame-AA175 peptidasa		NM_19846 4	4	NP_94086 6	271,272		24-246 (63, 107, 200)
S01.300	enzima quimotriptica del estrato córneo	KLK7	NM_00504 6 (v1)NM_13927 7(v2)	SCCE, PRSS6	NP_00503 7 NP_64480 6	273,274 (v1); 275, 276 (v2)	1-22/23-29	68-302 (108, 156, 250)

Código según la base de datos Merops	Nombre	Gen	Nucl. AC NO:	Sinónimo	Proteína AC N°:	SEC ID N°:	Secuencia señal/ propep.	Unidad peptidasa (restos del sitio activo)
S01.301	enzima respiratoria similar a tripsina (Homo sapiens)		NM_00426 2	HAT	NP_00425 3	277,278		187-471 (227, 272, 368)
S01.302	Matripasa	ST14	AF118224	HAI, MTSP1, SNC19, MT-SP1, MTSP-1, PRSS14, TADG-15	AAD4276 5	1,2		615-855 (656, 711, 805)
S01.306	caliceína hk13	KLK13	NM_01559 6	KLK4, KLK-L4, DKFZP58 6J1923	NP_05641 1	279,280	1-16/	36-263 (76, 124, 218)
S01.307	caliceína hk9 (numeración humana)	KLK9	NM_01231 5	KLK13, KLK-L3	NP_03644 7	281,282	1-15/	23-250 (63, 111, 204)
S01.308	Memame-AA035 peptidasa		NM_15360 9		NP_70583 7	283,284		49-283 (89, 140, 234)
S01.309	proteína de vena umbilical		NM_00717 3	SIG13, SPUVE, ZSIG13, MGC5107	NP_00910 4	285,286	1-23/	95-383 (175, 246, 316)
S01.311	proteína LCLP (LCLP (extremo N))		Péptido sin fragmento de ADN		P34168	287		1-26 (0)
S01313	Espinesina	TMPRSS5	NM_03077 0		NP_110397	288,289		218-455 (258, 308, 405)
S01.318	Memame-AA178 peptidasa	MPN2	NM_18306 2		NP_89888 5	290,291	1-33/	53-288 (93, 143, 238)
S01.320	Memame-AA180 peptidasa	OVTN	BN000120		CAD66452	292,293	1-23/	52-301 (92, 142, 240)
S01.322	Memame-AA182 peptidasa	OVCH1	BN000128		CAD67579	294,295	1-17/	8-298 (87, 139, 237)
S01.414	Memame-AA122 peptidasa (deducida del EST por MEROPS)		Supuesta AK075142		BAC11431 1431	296,297		1-177 (12, 64, 168)
C01.032	Catepsina L	CTSL	Y14734		P07711	372,373	1-17/18-113	113-333 (132, 138, 276, 300)
C01.009	Catepsina V	CTSL2	U13665		060911	374,375	1-17/18-113	114-334 (132, 138, 277, 301)
C01.036	Catepsina K	CTSK	S93414		P43235	376,377	1-15/16-114	115-329 (133, 139, 276, 296)
C01.034	Catepsina S	CTSS	AJ007331		P25774	378,379	1-16/17-114	115-331 (133, 139, 278, 298)

Código según la base de datos Merops	Nombre	Gen	Nucl. AC NO:	Sinónimo	Proteína AC N°:	SEC ID N°:	Secuencia señal/ propep.	Unidad peptidasa (restos del sitio activo)
C01.018	Catepsina F	CTSF	M14221		Q9UBX1	380,381	1-19/20-270	271-484 (289, 295, 431, 451)
C01.060	Catepsina B	CTSB	M 15203		P07858	382,383	1-17/18-79	80-331 (102, 108, 278, 298)
C01.001	Papaina		M84342		P00784	384,385	1-18/19-133	135-342 (158, 292, 308)
C01.075	Cruzaina (Cruzapaina)		Y14734		P25779	386,387	123-467/	124-334 (147, 284, 304,
A02.001	proteasa del VIH-1			retropepsina del HIV-1; PR HIV-1	P03366 (aa 500-598)	544		
A02.015	RSV			aviar	P03322	545		
	proteasa			retropepsina del virus de la mieloblastosis; endopeptidasa del virus del sarcoma aviar; retropepsina	(aa 578-701)			
M10.005	Metaloproteasa de la matriz-3	MMP3	X05232	proteína activadora de colagenasa; MMP-3; estromelisinina 1; transina	CAA28859 1	546, 547		
M12.209	endopeptidasa ADAM 9	ADAM 9	NM_00381 6	MDC9	NP_00380 7	548, 549		
M12.210	endopeptidasa ADAM 10	ADAM10	NM_00381 6	MADM	NP_0011010 1	550, 551		



En algunas realizaciones, la proteasa armazón es una granzima B, granzima A, granzima M, catepsina G, MT-SP1, elastasa de neutrófilos, quimasa, alfa triptasa, beta triptasa I o II, quimotripsina, colagenasa, factor XII, factor XI, factor CII, factor X, trombina, proteína C, activador de plasminógeno u (u-PA), activador de plasminógeno t (t-PA), plasmína, calicreína plasmática, quimotripsina, tripsina, una catepsina, papaína, cruzaina, una metaloproteasa y variaciones alélicas, isomorfas y partes de las mismas catalíticamente activas. Dichas proteasas pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento para dirigir uno o más sustratos diana de una ruta del complemento. Dichas proteasas también pueden modificarse para tener especificidad o selectividad modificada por uno cualquier o más de los componentes proteicos de la ruta del complemento y/o para modular una actividad de una proteína o ruta del complemento. Las proteasas o proteasas modificadas pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento para modular la activación del complemento, y por tanto pueden usarse como agentes terapéuticos para tratar cualquier enfermedad o trastorno mediado por complemento. En algunas realizaciones, la proteasa armazón es una MT-SP1. Las modificaciones de aminoácidos en la MT-SP1 pueden realizarse para modificar la especificidad y/o selectividad para un sustrato diana de las proteínas del complemento.

## 15 1. Proteasas armazón

Prácticamente todos los aspectos de una proteasa pueden modificarse, incluyendo la especificidad de secuencia del sustrato de la enzima, la termoestabilidad, el perfil de pH, la eficacia catalítica, la estabilidad oxidativa y la función catalítica. En el presente documento se proporcionan proteasas modificadas que presentan especificidad y/o selectividad aumentada a una cualquiera o más proteínas del complemento en comparación con una proteasa armazón. Las proteasas pueden modificarse usando cualquier método conocido en la técnica para la modificación de proteínas. Dichos métodos incluyen mutagénesis dirigida y al azar. Pueden usarse ensayos tales como los ensayos para la función biológica de la activación del complemento proporcionados en el presente documento y conocidos en la técnica para evaluar la función biológica de una proteasa modificada para determinar si la proteasa modificada se dirige a un sustrato para la escisión e inactivación. En el presente documento se proporcionan métodos ejemplares para identificar una proteasa y las proteasas modificadas.

Por ejemplo, puede emplearse cualquiera de una diversidad de estrategias generales para el desarrollo dirigido a proteínas basadas en mutagénesis. Cualquiera de estas, sola o en combinación, puede usarse para modificar un polipéptido tal como una proteasa para conseguir especificidad y/o selectividad modificadas por un sustrato diana. Dichos métodos incluyen mutagénesis al azar, en la que los aminoácidos en la secuencia de proteína de partida se reemplazan por todos (o un grupo) de los 20 aminoácidos en sustituciones sencillas o múltiples en diferentes posiciones de aminoácidos sobre la misma molécula, al mismo tiempo. Otro método, la mutagénesis al azar restringida, introduce todos o algunos de los 20 aminoácidos o restos sesgados de ADN. El sesgo se basa en la secuencia del ADN y no en la de la proteína de una manera estocástica o semiestocástica, respectivamente, dentro de regiones restringidas o predefinidas de la proteína que se sabe de antemano que están implicadas en la actividad biológica a “desarrollar”. En la solicitud de Estados Unidos relacionada N° 10/677.977 se describen métodos ejemplares para generar proteasas modificadas.

Adicionalmente, puede usarse cualquier método conocido en la técnica para modificar o alterar una secuencia polipeptídica de proteasa.

Entre los polipéptidos modificados descritos en el presente documento existen proteasas con una o más modificaciones en comparación con una proteasa armazón. Los polipéptidos de proteasa modificados incluyen aquellos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 35 17, 18, 19, 20 o más posiciones modificadas. Las proteasas modificadas descritas en el presente documento conservan su capacidad proteasa pero presentan una especificidad alterada (es decir, aumentada) hacia una cualquiera o más de los sustratos diana de las proteínas del complemento en comparación con un sustrato natural de la proteasa y/o presentan una selectividad alterada para una cualquiera o más de las proteínas del sistema del complemento. Una proteasa modificada específica para una cualquiera o más de las proteínas del complemento puede generarse de manera racional o empírica mediante: (a) direccionamiento racional a sitios que complementan una secuencia de escisión de un sustrato del complemento diana reconocido por una proteasa conocida tal como, por ejemplo, el Factor I del complemento o, (b) ensayo empírico de una biblioteca de proteasas modificadas en ensayos funcionales para la activación de la cascada del complemento.

### 55 a. Modificación racional

Se describen métodos para modificar racionalmente una proteasa para aumentar la especificidad y/o selectividad por un sustrato diana, tal como una cualquiera o más proteínas del complemento. En dicho método, se conoce una secuencia de escisión del sustrato diana. Los sitios de escisión dentro de las proteínas diana se identifican mediante los siguientes criterios: 1) se localizan sobre la superficie expuesta de la proteína; 2) se localizan en regiones que están desprovistas de estructura secundaria (es decir, no en láminas P o hélices), como se determina mediante estructura atómica o algoritmos de predicción estructural (estas regiones tienden a formar bucles sobre la superficie de las proteínas o tallos sobre los receptores de la superficie celular); 3) se localizan en sitios que probablemente inactivan la proteína, basándose en su función conocida. Las secuencias de escisión tienen, por ejemplo, cuatro restos de longitud para coincidir con la especificidad de sustrato extendida de muchas proteasas, pero pueden ser

mayores o más cortas.

El Factor I es una serina proteasa que funciona como un regulador natural de la activación del complemento escindiendo C3b y C4b. El Factor I escinde e inactiva C3b y C4b después de la activación por la convertasa en C3 y C4, respectivamente, y libera C3a y C4a. Las secuencias de escisión peptídica reconocidas por el Factor I incluyen LPSR (SEC ID N°: 388) y SLLR (SEC ID N°: 389) en C3 y HRGR (SEC ID N°: 390) en C4 (véase, por ejemplo, Davis et al., (1982) *Biochemistry* 21: 5745); Harrison et al., (1980) *Sol. Immunology* 17: 9; Kai et al., (1980) *J Immunol.* 125: 2409). En el presente documento se describen métodos para diseñar racionalmente el bolsillo de unión de especificidad de una proteasa para reconocer y escindir específicamente los sustratos del Factor I, incluyendo C3 y C4 así como iC3, C3b, iC4 y C4b, inhibiendo de esta manera la activación del complemento. Se describen productos que escinden sustratos del Factor I.

Como un ejemplo, las proteasas modificadas con especificidad alterada específicamente por una secuencia diana del Factor I se generan mediante una estrategia de diseño basado en la estructura. Cada proteasa tiene una serie de aminoácidos que revisten el bolsillo del sitio activo y establecen contacto directo con un sustrato. Los aminoácidos que revisten el bolsillo del sitio activo de una proteasa se denominan S1-S4 y los sitios de contacto del sustrato respectivo se denominan P1-P4. La identidad de los aminoácidos que contienen el bolsillo S1-S4 del sitio activo determina la especificidad por el sustrato de ese bolsillo en particular. En el presente documento se describen aminoácidos que forman el bolsillo de unión al sustrato de proteasas ejemplares. Generalmente, la especificidad de sustrato de una proteasa se conoce o puede determinarse tal como, por ejemplo, mediante modelado molecular basándose en estructuras tridimensionales del complejo de una proteasa y sustrato (véase, por ejemplo, Wang et al., (2001) *Biochemistry* 40(34): 10038; Hopfner et al., *Structure Fold Des.* 1999 7(8): 989; Friedrich et al., (2002) *J Biol Chem* 277(3): 2160; Waugh et al., (2000) *Nat Struct Biol.* 7(9): 762). En un ejemplo, los aminoácidos que participan en el bolsillo de unión a sustrato S1-S4 de la MT-SP1 son los siguientes (basándose en la numeración de la quimotripsina): 189, 190, 191, 192, 216 y 226 (S1); 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 99 (S2); 146, 192, 217, 218 (S3); 96, 97, 98, 99, 100, 168, 169, 170, 170A, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 215, 217, 224 (S4). En otro ejemplo, los aminoácidos en una proteasa de la familia de la papaína que contribuyen a la especificidad de P2 (numeración de papaína convencional) incluyen los aminoácidos 66-68, 133, 157, 160 y/o 215. La modificación de uno cualquiera o más de los aminoácidos que constituyen el sitio activo S1-S4 de una proteasa alteraría la especificidad de sustrato de esa proteasa. Por ejemplo, una mutación en la posición 99 en el bolsillo S2 de una serina proteasa, tal como por ejemplo, una MT-SP1 proteasa, por un aminoácido más pequeño confiere una preferencia por restos hidrófobos más grandes en la posición P2 del sustrato. Usando este proceso de mutagénesis selectiva, pueden generarse proteasas con especificidades de sustrato para la secuencia de escisión del Factor I.

En una realización, pueden realizarse mutaciones puntuales en los aminoácidos que contribuyen al bolsillo de unión de especificidad de una proteasa, particularmente en uno cualquiera o más restos de aminoácidos S1-S4 que contribuyen a la especificidad del sustrato P1-P4. Generalmente, los restos de aminoácidos que contribuyen a la especificidad P1-P4 de una proteasa pueden reemplazarse racionalmente de tal manera que se produzca el sitio de escisión del sustrato diana reconocido por el Factor I. En un ejemplo, una proteasa puede modificarse para reconocer la secuencia de escisión diana LPSR/KI en la que uno cualquiera o más aminoácidos en la posición S4 pueden modificarse para reconocer una leucina en la posición P4, uno cualquiera o más aminoácidos en la posición S3 puede modificarse para reconocer una prolina en la posición P3, uno cualquiera o más aminoácidos en la posición S2 puede modificarse para reconocer una serina en la posición P2 y uno cualquiera o más aminoácidos en la posición S1 puede modificarse para reconocer una arginina en la posición P1. En otro ejemplo, una proteasa puede modificarse para reconocer la secuencia de escisión diana SLLR/SE en la que uno cualquiera o más de los aminoácidos en la posición S4 puede modificarse para reconocer una serina en la posición P4, uno cualquiera o más aminoácidos en la posición S3 puede modificarse para reconocer una leucina en la posición P3, uno cualquiera o más de los aminoácidos en la posición S2 puede modificarse para reconocer una leucina en la posición P2 y uno cualquiera o más de los aminoácidos en la posición S1 puede modificarse para reconocer una arginina en la posición P1. En un ejemplo adicional, puede modificarse una proteasa para reconocer la secuencia de escisión diana HRGR/TL en la que uno cualquiera o más aminoácidos en la posición S4 puede modificarse para reconocer una histidina en la posición P4, uno cualquiera o más aminoácidos en la posición S3 puede modificarse para reconocer una arginina en la posición P3, uno cualquiera o más aminoácidos en la posición S2 puede modificarse para reconocer una glicina en la posición P2 y uno cualquiera o más aminoácidos en la posición S1 puede modificarse para reconocer una arginina en la posición P1. En algunos casos, mutaciones en serina proteasas han demostrado que cada uno de los subsitios que forman el sitio activo (S1-S4) funciona independientemente entre sí, de tal manera que la modificación de especificidad en un subsitio tiene poca influencia sobre la especificidad en subsitios adyacentes. Por tanto, la modificación por ingeniería genética de la especificidad de sustrato y/o la selectividad a través del sitio de unión extendido puede conseguirse de una manera gradual.

Por ejemplo, una proteasa con una baja especificidad por un resto en un sitio de unión particular o por una secuencia particular está alterada en su especificidad por medio de mutaciones puntuales en el bolsillo de unión a la secuencia sustrato. En algunos casos, el mutante resultante tiene un aumento mayor que 1,5, 2, 5, 8 o 10 veces, o incluso mayor, en especificidad en un sitio para una secuencia particular con respecto al tipo silvestre. En otra realización, el mutante resultante tiene un aumento mayor de 100 veces en especificidad en un sitio para una secuencia particular con respecto al tipo silvestre. En otra realización, el mutante resultante tiene un aumento de

más de 1000 veces en especificidad en un sitio o para una secuencia particular con respecto al tipo silvestre.

En una realización ejemplar, la proteasa MT-SP1 de tipo silvestre que tiene una preferencia P1-P4 por una secuencia de escisión diana de Arg/Lys en P4, restos básicos o Gln en P3, restos pequeños en P2 y Arg o Lys en P1 puede modificarse para que la secuencia de escisión del Factor I de LPSR, SLLR o HRGR se reconozca por una proteasa MT-SP1 (véase Tabla 15). En dicho ejemplo, la posición S1 de la MT-SP1 modificada no se cambia dado que el resto de arginina en el sitio P1 está conservado entre el sitio de escisión del sustrato diana de MT-SP1 y los sitios de escisión del Factor I. Los restos de aminoácidos en uno cualquiera o más de los subsitios S2-S4 de la MT-SP1 pueden modificarse en solitario o en combinación para aumentar la especificidad y/o selectividad por una secuencia de escisión del Factor I. Por ejemplo, para modificar una MT-SP1 indicada en la SEC ID N°: 2 o 10 para que tenga una especificidad y/o selectividad aumentada por una secuencia de escisión del Factor I de SLLR en C3b, las modificaciones en la posición S4 de la MT-SP1 para reconocer una serina en la posición P4 del sustrato pueden incluir modificaciones de aminoácidos Q174H, D217Q, D217N, D217H, D96A, D96V, D96F, D96S y/o D96T, basándose en la numeración de la quimotripsina; la modificación en la posición S3 de la MT-SP1 para reconocer una leucina en la posición P3 del sustrato puede incluir modificaciones de aminoácidos Q192L, Q192I, Q192F y/o Y146F, basándose en la numeración de la quimotripsina; y/o las modificaciones en la posición S2 de la MT-SP1 para reconocer una leucina en la posición P2 del sustrato pueden incluir las modificaciones de aminoácidos F99A, F99V, F99S y/o F99G, basándose en la numeración de la quimotripsina. En otro ejemplo, para modificar una MT-SP1 indicada en la SEC ID N°: 2 o 10 para que tenga una especificidad y/o selectividad aumentada por una secuencia de escisión del Factor I de LPSR en C3b, las modificaciones en la posición S4 de la MT-SP1 para reconocer una leucina en la posición P4 del sustrato pueden incluir las modificaciones de aminoácidos W215F, W215Y, Q174F, Q174V, Q174L, Q174Y y/o M180E, basándose en la numeración de quimotripsina; las modificaciones en la posición S3 de la MT-SP1 para reconocer una prolina en la posición P3 del sustrato pueden incluir modificaciones en los aminoácidos Q192K, Q192R, Q192R, basándose en la numeración de la quimotripsina; y/o las modificaciones en la posición S2 de la MT-SP1 para reconocer una serina en la posición P2 del sustrato pueden incluir modificaciones del aminoácido F99Y, basándose en la numeración de la quimotripsina. En un ejemplo adicional, para modificar una MT-SP1 indicada en la SEC ID N°: 2 o 10 para que tenga especificidad y/o selectividad aumentada por una secuencia de escisión del Factor I de HRGR en C4b, las modificaciones en la posición S4 de la MT-SP1 para reconocer una histidina en la posición P4 del sustrato pueden incluir las modificaciones de aminoácidos W215F, W215Y, Q174A, Q174V, Q174F, Q174R y/o Q174K, basándose en la numeración de la quimotripsina; las modificaciones en la posición S3 de la MT-SP1 para reconocer una arginina en la posición P3 del sustrato pueden incluir las modificaciones de los aminoácidos D217A, D217V y/o Q192E, basándose en la numeración de la quimotripsina; y/o la modificación en la posición S2 de la MT-SP1 para reconocer una glicina en la posición P2 del sustrato puede incluir las modificaciones de aminoácidos F99W, F99Y y/o F99D, basándose en la numeración de la quimotripsina. En la Tabla 15 se resumen modificaciones ejemplares de una proteasa MT-SP1 armazón. También se contemplan combinaciones de modificaciones de las posiciones indicadas. Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para efectuar mutaciones de uno cualquiera o más aminoácidos en una proteína diana. Los métodos incluyen mutagénesis dirigida convencional (usando, por ejemplo, un kit tal como el kit QuikChange disponible en Stratagene) de moléculas de ácido nucleico codificantes, o mediante métodos de síntesis de polipéptidos en fase sólida.

**Tabla 15: Modificaciones ejemplares en MT-SP1 para alterar la especificidad diana de la secuencia de escisión del Factor I**

	S4				S3			S2
	D96	Q174	M180	W215	D217	Y146	Q192	F99
<b>SLLR</b>	A, V, F, S, T	H			Q, N, H	F	L, I, F	A, V, S, G
<b>LPSR</b>		F, V, L, Y	E	F, Y			K, R, Y	Y
<b>HRGR</b>		A, V, F, R, K		F, Y	A, V		E	W, Y

i. Síntesis de bibliotecas de exploración posicional y selección usando fluorescencia

Una proteasa, modificada en uno cualquiera o más de los subsitios S1-S4 puede verificarse con respecto a la especificidad de sustrato P1-P4 en cualquier subsitio dado usando una biblioteca combinatoria sintética de exploración posicional (PS-SCL) que contiene una biblioteca combinatoria de sustratos fluorogénicos (Harris et al., (2000) PNAS 97: 7754; documentos US 2004/0175777; US 2004/0146938). Una estrategia PS-SCL permite determinar de manera rápida y fácil la especificidad del sustrato proteolítico en uno cualquier o más de los subsitios del sitio activo S1-S4. Una estrategia PS-SCL implica el uso de bibliotecas de péptidos mediante las cuales una posición en la biblioteca se mantiene constante, mientras que las restantes posiciones están constituidas por todas las combinaciones de los aminoácidos usados para preparar la biblioteca. Puede usarse una biblioteca combinatoria de sustratos peptídicos fluorogénicos, tal como por ejemplo un sustrato peptídico fluorogénico de 7-amino-metilcoumarina (AMC) o un sustrato peptídico fluorogénico de 7-amino-4-carbamoilmetilcoumarina (ACC), para

ensayar la actividad de una proteasa modificada, liberándose un resto fluorogénico de un sustrato peptídico tras la acción de la proteasa. Los expertos en la materia apreciarán que estos métodos proporcionan una amplia diversidad de formatos de bibliotecas alternativas. En un ejemplo, una proteasa puede perfilarse con una biblioteca de diversos P1. Una biblioteca tetrapeptídica de diversos P1 contiene tetrapéptidos fluorogénicos ACC o AMC, con lo que la posición P1 se mantiene sistemáticamente constante mientras que las posiciones P2, P3 y P4 contienen una mezcla equimolar de uno cualquiera o más de los 20 aminoácidos. Una biblioteca de P1 fijo ACC permite la verificación de las especificidades P4, P3 y P2 de una cualquiera de las proteasas modificadas. En otro ejemplo, la fijación de la posición P2 como un aminoácido hidrófobo grande puede eludir la escisión interna preferente por proteasas de plegamiento de papaína y conducir a un registro adecuado de la secuencia del sustrato. La determinación y consideración de limitaciones particulares relevantes con respecto a cualquier enzima particular o método de determinación de especificidad de la secuencia sustrato se encuentran dentro de la capacidad de un experto en la materia.

Los expertos en la materia reconocerán que existen muchos métodos para preparar los péptidos. En una realización ejemplar, la biblioteca de sustrato se explora uniendo un sustrato marcado fluorogénicamente a un soporte sólido. En un ejemplo, el grupo fluorogénico saliente del péptido sustrato se sintetiza mediante condensación de un derivado N-Fmoc de coumarina, a un engarce Rink inestable a ácidos para proporcionar la resina ACC (Backes et al., (2000) *Nat Biotechnol.* 18: 187). La retirada de Fmoc produce una amina libre. A la amina pueden acoplarse aminoácidos naturales, no naturales y modificados que pueden elaborarse mediante el acoplamiento de aminoácidos adicionales. En una realización alternativa, el grupo fluorogénico saliente puede ser 7-amino-4-metilcoumarina (AMC) (Harris et al., (2000) *PNAS* 97: 7754). Después de finalizar la síntesis del péptido, el conjugado de péptido-resto fluorogénico puede escindirse del soporte sólido, o como alternativa, el conjugado puede permanecer encadenado al soporte sólido.

Típicamente, un método para la preparación de un péptido fluorogénico o un material que incluye un péptido fluorogénico incluye: (a) proporcionar un primer conjugado que contiene un resto fluorogénico unido covalentemente a un soporte sólido; (b) poner en contacto el primer conjugado con un primer resto de aminoácido protegido y un agente activador, formando así un enlace peptídico entre un grupo carboxilo y el nitrógeno de amina del primer conjugado; (c) desproteger, formando así un segundo conjugado que tenga un resto amina reactivo; (d) poner en contacto el segundo conjugado con un segundo aminoácido protegido y un agente activador, formando así un enlace peptídico entre un grupo carboxilo y el resto amina reactivo; y (e) desproteger, formando así un tercer conjugado que tiene un resto amina reactivo. En una realización ejemplar, el método incluye adicionalmente: (f) poner con contacto el tercer conjugado con un tercer aminoácido protegido y un agente activador, formando así un enlace peptídico entre un grupo carboxilo y el resto amina reactivo; y (e) desproteger, formando así un cuarto conjugado que tiene un resto amina reactivo.

Para los aminoácidos que son difíciles de acoplar (por ejemplo, Ile, Val, etc.), pueden permanecer sobre el soporte aminoácidos libres que no han reaccionado y complicar la síntesis posterior y las operaciones del ensayo. Una etapa de protección especializada que emplea el éster activo de 3-nitrotriazol de ácido acético en DMF acila eficazmente la anilina restante. La coumarina protegida con ácido acético resultante que puede estar presente en la solución de secuencia de sustrato no purificada generalmente no es una secuencia sustrato de proteasa.

La síntesis peptídica en fase sólida en la que el aminoácido C terminal de la secuencia está unido a un soporte insoluble seguido por la adición secuencial de los demás aminoácidos de la secuencia es un método ilustrativo para preparar la estructura peptídica de los polipéptidos proporcionados en el presente documento. Describen técnicas para la síntesis en fase sólida Narany y Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; páginas 3-284 en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2; *Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.*, Gross y Meienhofer, eds. Academic press, N. Y., (1980); y Stewart et al., (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. La síntesis en fase sólida se realiza más fácilmente con sintetizadores peptídicos disponibles en el mercado utilizando química Fmoc o t-BOC.

Por ejemplo, la síntesis peptídica puede realizarse usando la química de síntesis Fmoc bien conocida. Por ejemplo, las cadenas laterales de Asp, Ser, Thr y Tyr se protegen usando t-butilo y la cadena lateral del resto Cys usando S-trilitilo y S-t-butiltio, y los restos Lys se protegen usando t-Boc, Fmoc y 4-metiltrilitilo. Los reactivos de aminoácidos protegidos apropiadamente se encuentran disponibles en el mercado o pueden prepararse usando métodos reconocidos en la técnica. El uso de grupos protectores múltiples permite el desbloqueo selectivo y el acoplamiento de un fluoróforo a cualquier cadena lateral deseada particular. Por tanto, por ejemplo, la desprotección de t-Boc se consigue usando TFA en diclorometano. La desprotección de Fmoc se consigue usando, por ejemplo, piperidina al 20% (v/v) en DMF o N-metilpirrolidona, y la desprotección de 4-metiltrilitilo se consigue usando, por ejemplo, TFA del 1 al 5% (v/v) en agua o TFA al 1% y triisopropilsilano al 5% en DCM. La desprotección de A-t-butiltio se consigue usando, por ejemplo, mercaptoetanol acuoso (10%). La retirada de grupos t-butilo, t-boc y S-trilitilo se consigue usando, por ejemplo, TFA:fenol:agua:tioanis:etanoditio (85:5:5:2,5:2,5), o TFA:fenol:agua (95:5:5).

La diversidad en cualquier posición o combinación particular de posiciones puede introducirse usando una mezcla de al menos dos, seis, 12, 20 o más aminoácidos para extender la cadena peptídica. Las mezclas de aminoácidos pueden incluir cualquier cantidad útil de un aminoácido particular en combinación con cualquier cantidad útil de uno

o más aminoácidos diferentes. En una realización, la mezcla es una mezcla isocinética de aminoácidos (una mezcla en proporciones adecuadas para permitir una reactividad equimolar de todos los componentes).

5 Las proteasas modificadas pueden combinarse para adquirir la especificidad de múltiples proteasas modificadas. Una mutación en un resto de un armazón, que proporciona especificidad en un sitio, se combina en la misma proteasa con otra mutación en otro sitio del armazón para construir una proteasa de especificidad combinada. Puede usarse cualquier número de mutaciones en sitios discretos sobre el mismo armazón para crear una proteasa de especificidad combinada.

10 Las proteasas modificadas, tales como, por ejemplo, una proteasa MT-SP1 modificada, que coinciden con el perfil de especificidad deseado, después pueden someterse a ensayo usando sustratos peptídicos fluorogénicos individuales correspondientes a la secuencia de escisión deseada. Un método para ensayar una proteasa modificada que puede escindir una cualquiera o más de las secuencias de escisión del Factor I incluye: (a) poner en contacto una muestra fluorogénica peptídica (que contiene una secuencia de escisión del Factor I) con una proteasa, de tal manera que se libere un resto fluorogénico de una secuencia sustrato peptídica tras la acción de la proteasa, produciéndose así un resto fluorescente; y (b) observar si la muestra experimenta un cambio detectable de fluorescencia, siendo el cambio detectable una señal de la presencia de la proteasa enzimáticamente activa en la muestra. En dicho ejemplo, puede crearse un tetrapéptido ACC o AMC, tal como Ac-SLLR-AMC o Ac-HRGR-AMC, e incubarse con una proteasa modificada y la actividad de la proteasa puede evaluarse ensayando con respecto a la liberación del resto fluorogénico.

25 El ensayo de una proteasa en una solución requiere simplemente añadir una cantidad de la solución madre de una proteasa a un péptido indicador de proteasa fluorogénico y medir el aumento posterior de fluorescencia o la disminución en la banda de excitación en el espectro de absorción. La solución y el indicador fluorogénico también pueden combinarse y someterse a ensayo en un “tampón de digestión” que optimiza la actividad de la proteasa. Los expertos en la materia conocen bien tampones adecuados para someter a ensayo la actividad proteasa. En general, se selecciona un tampón con un pH que corresponde al pH óptimo de la proteasa particular. Por ejemplo, un tampón particularmente adecuado para ensayar la actividad de la elastasa contiene fosfato de sodio 50 mM, EDTA 1 mM a pH 8,9. La medición se realiza más fácilmente en un fluorómetro, un instrumento que proporciona una fuente de luz de “excitación” para el fluoróforo y después mide la luz emitida posteriormente a una longitud de onda particular. La comparación con una solución indicadora de control que carece de proteasa proporciona una medida de la actividad proteasa. El nivel de actividad puede cuantificarse de manera exacta generando una curva patrón para la combinación proteasa/indicador en la que se determina la tasa de cambio en cuanto a la fluorescencia producida por la soluciones proteasa de actividad conocida.

35 Aunque la detección de los compuestos fluorogénicos se puede conseguir usando un fluorómetro, la detección también puede conseguirse mediante diversos métodos distintos bien conocidos por los expertos en la materia. Por tanto, por ejemplo, cuando los fluoróforos emiten en las longitudes de onda visibles, la detección puede realizarse simplemente por inspección visual de fluorescencia en respuesta a la excitación por una fuente de luz. La detección también puede realizarse por medio de un sistema de análisis de formación de imágenes utilizando una cámara de video conectada a un digitalizador u otro sistema de obtención de imágenes. La detección también puede realizarse por visualización a través de un filtro, tal como un microscopio de fluorescencia. El microscopio puede proporcionar una señal que simplemente visualiza el operador. Como alternativa, la señal puede registrarse en una película fotográfica o usando un sistema de análisis de video. La señal también puede cuantificarse simplemente en tiempo real usando un sistema de análisis de imágenes o un fotómetro.

50 Por tanto, por ejemplo, un ensayo básico de la actividad proteasa de una muestra implica suspender o disolver la muestra en un tampón (al pH óptimo de la proteasa particular que se esté ensayando), añadir al tampón un indicador peptídico de proteasa fluorogénico y controlar el cambio resultante en fluorescencia usando un espectrofluorómetro como muestran, por ejemplo, Harris et al., (1998) J Biol Chem 273: 27364. El espectrofluorómetro se ajusta para excitar el fluoróforo a la longitud de onda de excitación del fluoróforo. El indicador de proteasa fluorogénico es una secuencia sustrato de una proteasa que cambia en fluorescencia debido a una proteasa que escinde el indicador.

55 Las proteasas modificadas también se ensayan para averiguar si escindirán la secuencia deseada cuando se presentan en el contexto de la proteína de longitud completa. Las proteínas sustrato diana que contienen sitios de escisión del Factor I están en las secuencias C3 y C4, específicamente en C3b y C4b que se generan a partir de C3 y C4, respectivamente, después de activación por convertasa. El Factor I también escinde iC3 e iC4 que son formas de especies modificadas de C3 y C4. En el presente documento se describen métodos para evaluar la escisión de una proteína diana y/o son bien conocidos en la técnica. En un ejemplo, una proteína del complemento purificada, C3b, C4b, iC3 o iC4, puede incubarse en presencia o ausencia de una proteasa modificada y el suceso de escisión puede controlarse mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Azul Brillante de Coomassie para la proteína y análisis de los productos de escisión usando densitometría. La actividad de la proteína diana también se sometió a ensayo, tal como, por ejemplo, a un ensayo de hemólisis, usando los métodos descritos en el presente documento o bien conocidos en la técnica, para verificar que el suceso de escisión ha destruido su función.

65

## b. Modificación empírica

Puede generarse una biblioteca de proteasas modificadas mediante mutación de uno cualquiera o más restos de aminoácidos de una proteasa usando un método comúnmente conocido en la técnica (véase también la solicitud de Estados Unidos publicada N° 2004/0146938). La biblioteca de proteasas modificadas puede ensayarse en ensayos funcionales de activación del complemento para determinar si son "Acieros" para inhibir la activación del complemento. Puede identificarse el sustrato del complemento diana de la proteasa modificada y puede determinarse la secuencia de escisión peptídica.

En un ejemplo, uno cualquiera o más de los aminoácidos de una proteasa se mutan usando cualquier kit de mutagénesis dirigida convencional tal como por ejemplo QuikChange (Stratagene). En otro ejemplo, se mutan uno cualquiera o más aminoácidos de una proteasa mediante mutagénesis de saturación de restos del sitio activo. En este ejemplo, los restos que forman el bolsillo S1-S4 de una proteasa (estando la proteasa en contacto con los restos P1-P4 del sustrato peptídico) y/o que se ha demostrado que son determinantes importantes de la especificidad, se mutan por todos los aminoácidos posibles, tanto en solitario como en combinación. En algunos casos, existe una escasa (si la hubiera) interacción entre los bolsillos S1-S4 del sitio activo, de tal manera que cada bolsillo parece reconocer y unirse al resto correspondiente de la secuencia sustrato peptídica independientemente de otros bolsillos. Por tanto, los determinantes de especificidad generalmente pueden cambiarse en un bolsillo sin afectar a la especificidad de los otros bolsillos. En una realización ejemplar, se usa una técnica de mutagénesis de saturación en la que el resto o los restos que cubren el bolsillo se mutan por cada uno de los 20 aminoácidos posibles (véase, por ejemplo, el método Kunkle, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., Media Pa.). En dicha técnica, se sintetiza un cebador oligonucleotídico mutagénico que contiene aleatorización de NNK o NNS en el codón deseado. El cebador se hibrida con el molde de ADN monocatenario y se añade la ADN polimerasa para sintetizar la cadena complementaria del molde. Después del ligamiento, el molde de ADN bicatenario se utiliza para transformar *E. coli* para la amplificación.

En el presente documento se describen aminoácidos que forman el bolsillo de unión al sustrato extendido de proteasas ejemplares. Generalmente, la especificidad del sustrato de una proteasa se conoce tal como, por ejemplo, mediante modelado molecular basándose en estructuras tridimensionales del complejo de una proteasa y sustrato (véase, por ejemplo, Wang et al., (2001) Biochemistry 40(34): 10038; Hopfner et al., Structure Fold Des. 1999 7(8): 989; Friedrich et al., (2002) J Biol Chem 277(3): 2160; Waugh et al., (2000) Nat Struct Biol. 7(9): 762). En un ejemplo, las mutaciones de MT-SP1 pueden ser en uno o más restos (en base a la numeración de la quimotripsina) que contribuyen a la especificidad del sustrato incluyendo 195, 102, 57 (la tríada catalítica); 189, 190, 191, 192, 216 y 226 (S1); 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 99 (S2); 146, 192, 217, 218 (S3); 96, 97, 98, 99, 100, 168, 169, 170, 170A, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 184, 215, 217, 224 (S4). En otro ejemplo, la mutación de restos de aminoácidos en una proteasa de la familia de la papaína puede ser en uno o más restos que afectan a la especificidad de P2 (numeración de la papaína convencional) incluyendo 66-68, 133, 157, 160 y/o 215. Además, los restos que no entran en contacto directamente con el sustrato de proteasa, pero que afectan a la posición y/o conformación de los restos que están en contacto (tal como, por ejemplo, los enumerados anteriormente) también pueden mutarse para alterar la especificidad de una proteasa armazón.

Para identificar las proteasas modificadas que se dirigen a una cualquiera o más de las proteínas del complemento, se sometió a ensayo una biblioteca de proteasas modificadas generadas a partir de una proteasa armazón, tal como por ejemplo un armazón MT-SP1, en ensayos funcionales de activación del complemento. En el presente documento se describen ensayos para la activación del complemento y pueden incluir una cualquiera o más de los ensayos hemolíticos y/o ensayos para detectar los productos de activación de una o más de las cascadas del complemento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos enzimáticos o ELISA para detectar la presencia de los productos de escisión de la activación del complemento tales como, por ejemplo, C4a, C5a, C3b, C3d y C5-b9. Las proteasas modificadas que inhiben la activación del complemento (tal como aumentando los niveles de CH50 como se determina mediante un ensayo hemolítico o disminuyendo la detección de un producto de escisión del complemento) pueden identificarse como un "Acierito". En una realización, pueden realizarse combinaciones de "Acieritos" para aumentar adicionalmente la especificidad y/o selectividad de una proteasa para inhibir la activación del complemento.

Las proteasas modificadas, tales como, por ejemplo, una MT-SP1 modificada, que se identifican como "Acieritos" para inhibir la activación del complemento en ensayos funcionales, puede explorarse para determinar el sustrato diana de la proteína del complemento. En el presente documento se describen ensayos para detectar la escisión de una proteína del complemento. En un ejemplo, puede incubarse una proteína del complemento purificada en presencia o ausencia de una proteasa modificada y analizarse y resolverse en un gel de SDS-PAGE y los productos de escisión de la proteína pueden detectarse tras la tinción con un tinte para proteínas tal como Azul Brillante de Coomassie. Los productos de escisión pueden escindirse y la secuencia de escisión peptídica puede determinarse mediante secuenciación N terminal. Usando la secuencia de escisión peptídica identificada determinada ensayando empíricamente una biblioteca de proteasas modificadas, pueden identificarse y generarse más proteasas modificadas usando la estrategia racional descrita anteriormente para las secuencias de escisión del Factor I.

## 2. Métodos para evaluar la especificidad

En el presente documento se describen métodos para evaluar la especificidad de sustrato de la proteasa armazón o modificada resultante. En una realización, la especificidad de uno cualquiera o más de los subsitios S1-S4 puede determinarse usando bibliotecas de exploración posicional ACC o AMC como se ha indicado anteriormente. En otra realización, la especificidad de una proteasa armazón o modificada por un sustrato diana en comparación con un sustrato no diana puede determinarse usando ensayos cinéticos de un solo sustrato, véase por ejemplo Harris, et al. (2000) PNAS, 97: 7754. En realizaciones específicas, puede usarse la comparación de las especificidades de una proteasa diana y una proteasa armazón para determinar si la proteasa modificada presenta especificidad modificada, por ejemplo, aumentada, en comparación con una proteasa armazón.

La especificidad de una proteasa por un sustrato diana puede medirse observando cuántas secuencias dispares escinde una proteasa modificada a una actividad dada en comparación con una proteasa armazón. Si la proteasa modificada escinde menos sustratos diana que la proteasa de tipo silvestre, la proteasa modificada tiene mayor especificidad que la proteasa armazón para estos sustratos diana. La especificidad de una proteasa por un sustrato diana puede determinarse a partir de la constante de especificidad de escisión de un sustrato diana en comparación con un sustrato no diana (es decir, una secuencia sustrato de tipo silvestre nativa de una proteasa). Puede constituirse una proporción de las constantes de especificidad de una proteasa modificada por un sustrato diana frente a un sustrato no diana para determinar la proporción de la eficacia de escisión de la proteasa. La comparación de la proporción de la eficacia de escisión entre una proteasa modificada y una proteasa armazón puede usarse para evaluar el factor de cambio en la especificidad por un sustrato diana. El factor de cambio es un aumento en la especificidad de una proteasa modificada por un sustrato diana en comparación con una proteasa armazón que es suficiente para conseguir una alteración predeterminada en la activación del complemento o en la actividad mediada por el complemento. La especificidad puede ser al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 veces o más veces mayor cuando se compara con la especificidad de una proteína armazón por un sustrato diana frente a un sustrato no diana.

En un ejemplo, una proteasa modificada que coincide con los perfiles de especificidad deseado, según se determina usando bibliotecas de sustratos de exploración posicional, puede someterse a ensayo usando sustratos peptídicos individuales correspondientes a la secuencia de escisión diana deseada en comparación con una secuencia de escisión sustrato no diana para determinar la magnitud y cambio en especificidad. En una realización, las secuencias de escisión peptídica individuales pueden unirse a un sustrato marcado fluorogénicamente, tal como por ejemplo un grupo fluorogénico saliente ACC o AMC tal como se describe en el presente documento, y la liberación del resto fluorogénico puede determinarse como una medida de especificidad de una proteasa por una secuencia de escisión peptídica. La tasa de aumento en fluorescencia de una secuencia de escisión sustrato no diana o una secuencia de escisión diana puede medirse tal como usando un espectrofotómetro de fluorescencia. La tasa de aumento en fluorescencia puede medirse a lo largo del tiempo. Las constantes cinéticas de Michaelis-Menton pueden determinarse mediante métodos cinéticos convencionales. Las constantes cinéticas  $k_{cat}$ ,  $K_m$  y  $k_{cat}/K_m$  pueden calcularse representando gráficamente la inversa de la concentración del sustrato frente a la inversa de la velocidad de la escisión del sustrato y ajustando a la ecuación de Lineweaver-Burk ( $1/\text{velocidad} = (K_m/V_{max})(1/[S]) + 1/V_{max}$ ; en la que  $V_{max} = [ET]k_{cat}$ ). La constante de especificidad ( $k_{cat}/K_m$ ) es una medida de cómo de bien una proteasa particular escinde un sustrato.

En una realización, una secuencia de escisión sustrato no diana puede ser una secuencia de escisión sustrato nativa, tal como una secuencia de escisión reconocida por la MT-SP1 de tipo silvestre. Por ejemplo, la autoactivación eficaz de MT-SP1 conlleva el reconocimiento y escisión de una secuencia diana Arg-Gln-Ala-Axg P4-P1. La MT-SP1 también puede activar eficazmente el receptor-2 activado por proteinasa (PAR2), uPA monocatenario y el factor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión. Estas proteínas localizadas en la superficie celular presentan las secuencias diana P4 a P1 Ser-Lys-Gly-Arg, Pro-Arg-Phe-Lys y Lys-Gln-Gly-Arg, respectivamente, que coinciden estrechamente con las necesidades de especificidad de escisión de MT-SP1 observadas para sustratos peptídicos pequeños. En una realización, puede usarse un tetrapéptido marcado fluorogénicamente de RQAR (SEC ID N°: 401), o SLGR (SEC ID N°: 392), o PRFK (SEC ID N°: 402), o KQGR (SEC ID N°: 403) como una secuencia de escisión sustrato no diana.

En otra realización, puede determinarse una cualquiera o más de las secuencias de escisión de una proteína del complemento y usarse como una secuencia de escisión diana deseada. Por ejemplo, puede usarse una cualquiera o más de las secuencias de escisión del Factor I, tales como, por ejemplo, SLLR (SEC ID N°: 389), LPSR (SEC ID N°: 388) y HRGR (SEC ID N°: 390) como una secuencia de escisión diana tetrapeptídica marcada fluorogénicamente. En otro ejemplo, puede determinarse empíricamente la secuencia de escisión deseada en una proteína del complemento marcada con una cualquiera o más proteasas de tipo silvestre o modificadas, mediante secuenciación N terminal de productos de escisión tras la escisión de una cualquiera o más de las proteínas del complemento por una proteasa. En dicho ejemplo, puede usarse una cualquiera o más de las secuencias de escisión identificadas como secuencias de escisión diana de una proteasa proporcionada en el presente documento, incluyendo las descritas en el Ejemplo 3. Por lo tanto, por ejemplo, un tetrapéptido marcado fluorogénicamente de GATR (SEC ID

Nº: 391), SLGR (SEC ID Nº: 392), VFAK (SEC ID Nº: 393), REFK (SEC ID Nº: 394), QHAR (SEC ID Nº: 398), GLAR (SEC ID Nº: 395), RLGR (SEC ID Nº: 396), AEGK (SEC ID Nº: 397), o HRGR (SEC ID Nº: 390) puede usarse como una secuencia de escisión sustrato diana.

5 En una realización adicional, puede usarse una proteína del complemento de longitud completa como un sustrato diana para someter a ensayo la especificidad de la proteasa en comparación con un sustrato diana nativo de longitud completa de una proteasa. Además, puede usarse una proteína del complemento de longitud completa para evaluar la correlación entre la especificidad del sustrato y la escisión por una proteasa de un sustrato diana de longitud completa frente a una secuencia de escisión sustrato P1-P4 de cuatro aminoácidos contenida dentro del sustrato diana. En un ejemplo, puede usarse una proteína C2 de longitud completa como una diana de escisión deseada de una cualquiera o más de las proteasas para evaluar la especificidad. En este ejemplo, la escisión de C2 por una proteasa modificada o armazón puede compararse con la escisión de otro sustrato de longitud completa, o la escisión puede compararse con una secuencia de escisión tetrapeptídica fluorogénica de C2, tal como se describe en el Ejemplo 11 (es decir, GATR, SLGR o VFAK). La constante de especificidad de la escisión de una proteína de longitud completa por una proteasa puede determinarse usando densitometría en gel para evaluar los cambios en la densitometría a lo largo del tiempo de una banda de sustrato diana de longitud completa incubada en presencia de una proteasa.

### 3. Polipéptidos de proteasa

20 Usando los métodos descritos en el presente documento, se describen proteasas que escinden una cualquiera o más de las proteínas del complemento, inhibiendo la escisión de las proteínas del complemento la activación del complemento. Como se proporciona en el presente documento, un polipéptido de proteasa que escinde una cualquiera o más de las proteínas del complemento es una proteasa que no pertenece al complemento. Un polipéptido de proteasa puede incluir la secuencia de aminoácidos de una proteasa armazón, que se proporciona en el presente documento, tal como en una cualquiera de las SEC ID Nº: 2, 4, 8, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 269, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 373, 375, 377, 379, 381, 383, 385, 387, 544, 545, 547, 549 y 551 o una parte catalíticamente activa de las misma. Por ejemplo, la proteasa armazón puede ser una forma de tipo silvestre o prominente de la proteasa. En otra realización, la proteasa armazón puede ser una variante alélica de una proteasa. La proteasa armazón es de origen de mamífero, particularmente de origen humano, aunque la secuencia polipeptídica de la proteasa armazón también puede proceder de uno cualquiera o más de hámster, ratón, rata, vaca, mono, orangután, babuino, chimpancé, macaco, gibón o gorila. En otras realizaciones, la proteasa armazón puede no proceder de mamífero, tal como una proteasa armazón procedente de una planta o un parásito.

En una realización, una proteasa armazón se modifica para tener mayor especificidad y/o selectividad con respecto a una cualquiera o más proteínas del complemento en comparación con la proteasa armazón, pero sigue codificando una proteína que mantiene su actividad proteasa. Los polipéptidos de proteasa modificados incluyen aquellos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más posiciones modificadas. Generalmente, una proteasa modificada incluye cualquier variante en la que los restos en una posición particular de la secuencia se han sustituido por otros aminoácidos, y adicionalmente incluye la posibilidad de insertar un resto o restos adicionales entre dos restos de la proteína proteasa de tipo silvestre así como la posibilidad de delecionar uno o más restos de la secuencia de la proteasa de tipo silvestre. En el presente documento se proporciona cualquier sustitución, inserción o delección de aminoácidos de una secuencia proteasa de tipo silvestre.

En el presente documento se describen polipéptidos modificados que contienen una secuencia de longitud completa de una proteasa armazón, pero que contienen modificaciones en uno cualquiera o más aminoácidos que contribuyen a la especificidad y/o selectividad por el sustrato. En una realización, los polipéptidos de proteasa modificados proporcionados en el presente documento tienen una especificidad y/o selectividad de sustrato aumentada por una cualquiera o más proteínas del complemento en comparación con una proteasa armazón, inhibiendo la escisión de una proteína del complemento la activación del complemento. En otra realización, un polipéptido de proteasa modificado tiene una mayor especificidad para la escisión de una proteína del complemento en comparación con un VEGF o VEGFR. En una realización adicional, las proteasas modificadas proporcionadas en el presente documento no escinden un VEGF o VEGFR. Adicionalmente, un polipéptido de proteasa modificado proporcionado en el presente documento que contiene modificaciones en uno cualquiera o más aminoácidos que contribuye a la especificidad y/o selectividad de sustrato, también puede contener otras modificaciones en regiones que no son esenciales para la especificidad de sustrato de una proteasa.

Los polipéptidos de proteasa modificados descritos en el presente documento también pueden contener una parte catalíticamente activa de una proteasa armazón o no modificada de longitud completa. Cuando el polipéptido incluye una parte catalíticamente activa, puede incluir otras partes que no son proteasa además de estas, siempre que el polipéptido resultante presente una actividad proteasa de al menos el 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 50%, 100% o más de la longitud completa del polipéptido. Además, la parte catalíticamente activa es menos que la longitud completa en al menos un aminoácido, y puede ser menor que el dominio proteasa de longitud completa siempre que se conserve la



actividad proteasa. Una parte catalíticamente activa de una proteasa que contiene modificaciones en uno cualquiera o más aminoácidos que contribuyen a la especificidad de sustrato puede ser una forma mono o bicatenaria activa de una proteasa armazón. En algunas realizaciones, una proteasa modificada puede introducirse en otro polipéptido, en el extremo N o en el extremo C, tal como en una proteína de fusión. En realizaciones adicionales, puede insertarse una proteasa polipeptídica modificada, tal como, por ejemplo, una parte catalíticamente activa de una proteasa modificada, para reemplazar el dominio proteasa de otra proteasa.

En el presente documento se describen proteasas que presentan especificidad y/o selectividad aumentada con respecto a una cualquiera o más proteínas del complemento que tienen una secuencia de aminoácidos incluida en una cualquiera de las SEC ID N°: 298, 299, 300, 302, 304, 305, 306, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 326, 328, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 344, 660-662 o un fragmento de las mismas que presente actividad en el complemento.

#### a. Polipéptidos de MT-SP1

En el presente documento se describen polipéptidos de MT-SP1 que escinden una cualquiera o más de las proteínas del complemento, inhibiendo la escisión de la proteína del complemento la activación del complemento. Un polipéptido de MT-SP1 proporcionado en el presente documento puede ser un polipéptido de MT-SP1 de longitud completa (SEC ID N°: 2) o puede ser un fragmento o una secuencia parcial de una MT-SP1 de longitud completa que presenta actividad catalítica. En un ejemplo, un polipéptido de MT-SP1 puede ser un dominio proteasa monocatenario de MT-SP1 (SEC ID N°: 10). En otra realización, un polipéptido de MT-SP1 puede ser una cualquiera o más de las variantes alélicas de MT-SP1 indicadas en la SEC ID N°: 448.

También se describen en el presente documento polipéptidos de MT-SP1 modificados que contienen modificaciones en uno cualquiera o más aminoácidos de un polipéptido de MT-SP1 armazón usando uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En una realización, las modificaciones pueden realizarse en una MT-SP1 armazón indicada en la SEC ID N°: 2, o pueden realizarse en cualquier variante alélica de una MT-SP1 de tipo silvestre, tal como, por ejemplo, una cualquiera de las variantes alélicas indicadas en la SEC ID N°: 448. Un polipéptido de MT-SP1 modificado proporcionado en el presente documento puede constituir una secuencia de longitud completa de una MT-SP1 armazón o puede constituir una parte catalíticamente activa de una proteasa armazón MT-SP1 de longitud completa. La MT-SP1 modificada presenta un aumento en la especificidad y/o selectividad con respecto a una cualquiera o más de las proteínas del complemento en comparación con una MT-SP1 armazón, inhibiendo la escisión de la proteína la activación del complemento.

En el presente documento se describen polipéptidos de MT-SP1 modificados con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más posiciones modificadas. En una realización, un polipéptido de MT-SP1 modificado incluye mutaciones de uno cualquiera o más aminoácidos en el bolsillo de unión al sustrato extendido de MT-SP1 incluyendo, por ejemplo, la modificación de uno cualquiera o más restos de aminoácidos de 195, 102, 57 (la tríada catalítica); 189, 190, 191, 192, 216 y 226 (S1); 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 99 (S2); 146, 192, 217, 218 (S3); 96, 97, 98, 99, 100, 168, 169, 170, 170A, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 215, 217, 224 (S4), basándose en la numeración de la quimotripsina. Las modificaciones en el dominio proteasa de MT-SP1 que modifican la especificidad y/o selectividad del sustrato también incluyen la modificación de uno cualquiera o más restos de aminoácidos de 41, 60c, 143, 147, 151 o 221a, basándose en la numeración de la quimotripsina.

En el presente documento se describen polipéptidos de MT-SP1 modificados en los que se identificaron los siguientes restos de aminoácidos en el dominio proteasa de MT-SP1 como restos que aumentaban la especificidad y/o selectividad de la escisión de una cualquiera o más proteínas del complemento inhibiendo de esta forma la activación del complemento: 41, 60c, 97, 143, 146, 147, 151, 172, 175, 192, 217, 221a y 224 basándose en la numeración de la quimotripsina. Los polipéptidos de MT-SP1 modificados presentan mayor especificidad y/o selectividad hacia uno cualquiera o más de los componentes del complemento en comparación con una MT-SP1 de tipo silvestre de la SEC ID N°: 2 o una parte catalíticamente activa de la misma indicada en la SEC ID N°: 10. Por tanto, en el presente documento se proporcionan polipéptidos de MT-SP1 modificados que presentan mayor especificidad y/o selectividad hacia uno cualquiera o más componentes del complemento que contienen una modificación en una posición de aminoácido correspondiente a uno cualquiera o más restos de aminoácidos seleccionados de entre 141, R60<sub>c</sub>, F97, H143, Y146, G147, G151, L172, Q175, Q192, D217, Q221<sub>a</sub> o K224 en una MT-SP1 indicada en la SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 10, basándose en la numeración de la quimotripsina. En una realización, la sustitución o sustituciones de aminoácidos corresponden a cualquiera de las siguientes posiciones: 141T, 141A, 141L, 141F, 141D, 141E, R60<sub>c</sub>D, R60<sub>c</sub>W, F97D, F97E, F97A, F97W, H143V, Y146N, Y146D, Y146E, Y146A, Y146W, Y146R, Y146F, G147E, G151L, L172N, Q175D, Q175E, Q175H, Q175L, Q175F, Q175W, Q175Y, Q175R, Q175K, Q192A, Q192R, Q192V, Q192F, D217F, Q221<sub>a</sub>D, Q221<sub>a</sub>L, Q221<sub>a</sub>E, 5 K224A, K224L, K224R, K224N, K224T, K224Y, K224S y K224F del dominio proteasa de la MT-SP1, basándose en la numeración de la quimotripsina. La Tabla 16 proporciona ejemplos no limitantes de sustituciones de aminoácidos que aumentan la especificidad y/o selectividad con respecto a una cualquiera o más proteínas del complemento, incluyendo los números de identificación de secuencia para secuencias de polipéptidos ejemplares y las secuencias de ácidos nucleicos codificantes.

Tabla 16:

ID N°	Modificación	SEC ID N°: (aa, nt) de longitud completa	SEC ID N°: (aa, nt) de parte catalíticamente activa
CB200	tipo silvestre	1,2	10,9
CB12	F97D	406, 482	16, 15
CB13	F97E	407, 483	18, 17
CB16	Y145F	646	592
CB17	L172N	647	593
CB20	Q175D	636	582
CB21	Q175E	635	581
CB31	F97A	408, 484	20, 19
CB32	F97W	409, 485	22, 21
CB40	Y146N	410, 486	24, 23
CB41	Y146D	411, 487	26, 25
CB42	Y146E	412, 488	28, 27
CB43	Y146A	413, 489	30, 29
CB44	Y146W	414, 490	32, 31
CB45	Y146R	415, 491	34, 33
CB62	Q192V	405, 481	14, 13
CB64	Q192R	416, 492	36, 35
CB66	K224A	417, 493	38, 37
CB67	K224F	418, 494	40, 39
CB80	R60 <sub>c</sub> D	623	569
CB82	R60 <sub>c</sub> W	621	567
CB268	Q221aD	614	560
CB274	G147E	622	568

- En el presente documento también se describen polipéptidos de MT-SP1 modificados en los que se identificaron los siguientes restos de aminoácidos en el sitio de unión al sustrato S1-S4 de MT-SP1 como restos que aumentaban la especificidad y/o selectividad de escisión de una cualquiera o más de las proteínas del complemento que contienen una secuencia de escisión del Factor I SLLR/SB, inhibiéndose de esta manera la activación del complemento: 96, 174, 217, 146, 192 y 99, basándose en la numeración de la quimotripsina. Los polipéptidos de MT-SP1 modificados presentan mayor especificidad y/o selectividad hacia un sustrato de proteína del complemento C3b o iC3 en comparación con un sustrato diana nativo de la MT-SP1 de tipo silvestre de la SEC ID N°: 2 o una parte catalíticamente activa indicada como SEC ID N°: 10. En una realización la sustitución o sustituciones de aminoácidos corresponden a una cualquiera de las siguientes posiciones: D96A, D96V, D96F, D96S, D96T, Q174H, D217Q, D217N, D217H, Q192L, Q192I, Q192F, F99A, F99V, F99S o F99G del dominio proteasa de la MT-SP1, basándose en la numeración de la quimotripsina. La Tabla 17 proporciona ejemplos no limitantes de sustituciones de aminoácidos que aumentan la especificidad y/o selectividad con respecto a una cualquiera o más proteínas del complemento, incluyendo los números de identificación de secuencia para secuencias polipeptídicas ejemplares y las secuencias de ácidos nucleicos codificantes.

Tabla 17:

Modificación	SEC ID N° de longitud completa	SEC ID N° de parte catalíticamente activa
D96A	423, 499	45, 455
D96V	424, 500	46, 456
D96F	425, 501	47, 457
D96S	426, 502	48, 458
D96T	427, 503	49, 459
Q174H	419, 495	41, 451
D217Q	420, 496	42, 452
D217N	421, 497	43, 453
D217H	422, 498	44, 454
Q192L	428, 504	50, 460
Q192I	429, 505	51, 461
Q192F	430, 506	52, 462
Y146F	431, 507	53, 463
F99A	432, 508	54, 464
F99V	433, 509	55, 465
F99S	434, 510	56, 466
F99G	435, 511	57, 467

5 En el presente documento también se describen polipéptidos de MT-SP1 modificados en los que se identificaron los siguientes restos de aminoácidos en el sitio de unión al sustrato S1-S4 de MT-SP1 como restos que aumentaban la especificidad y/o selectividad de la escisión de una cualquiera o más proteínas del complemento que contienen una secuencia de escisión del Factor I LPSR/KI, inhibiéndose de esta forma la activación del complemento: 174, 180, 215, 192 y 99, basándose en la numeración de la quimotripsina. Los polipéptidos de MT-SP1 modificados presentan mayor especificidad y/o selectividad hacia un sustrato de proteínas del complemento C3b o iC3 en comparación con un sustrato diana nativo de MT-SP1 de tipo silvestre de la SEC ID N°: 2 o una parte catalíticamente activa de la misma indicada como SEC ID N°: 10. En una realización, la sustitución o sustituciones de aminoácidos corresponden a cualquiera de las siguientes posiciones: Q174F, Q174V, Q174L, Q174Y, M180E, W215F, W215Y, Q192K, Q192R, Q192Y o F99Y del dominio proteasa de MT-SP1 basándose en la numeración de la quimotripsina. La Tabla 18 proporciona ejemplos no limitantes de sustituciones de aminoácidos que aumentan la especificidad y/o selectividad con respecto a una cualquiera o más proteínas del complemento, incluyendo los números de identificación de secuencia para secuencias polipeptídicas ejemplares y las secuencias de ácidos nucleicos codificantes.

Tabla 18:

Modificación	SEC ID N° de longitud completa	SEC ID N° de parte catalíticamente activa
Q174F	440, 516	62, 472
Q174V	439, 515	61, 471
Q174L	529, 539	524, 534
Q174Y	530, 540	525, 535
M186B	531, 541	526, 536
W215F	436, 512	58, 468
W215Y	437, 513	59, 469

Modificación	SEC ID N° de longitud completa	SEC ID N° de parte catalíticamente activa
Q192K	532, 542	527, 537
Q192R	416, 492	35, 36
Q192Y	533, 543	528, 538
F99Y	447, 523	69, 479

En el presente documento también se describen polipéptidos de MT-SP1 modificados en los que se identificaron los siguientes restos de aminoácidos en el sitio de unión al sustrato S1-S4 de la MT-SP1 como restos que aumentaban la especificidad y/o selectividad de la escisión de una cualquiera o más proteínas del complemento que contienen una secuencia de escisión del Factor I HRGR/TL, inhibiendo de esta manera la activación del complemento: 174, 215, 192, 217 y 99, basándose en la numeración de la quimotripsina. Los polipéptidos de MT-SP1 modificados presentan mayor especificidad y/o selectividad hacia un sustrato de proteínas del complemento C4b o iC4 en comparación con un sustrato diana nativo de MT-SP1 de tipo silvestre de la SEC ID N°: 2 o una parte catalíticamente activa de la misma indicada como SEC ID N°: 10. En una realización, la sustitución o sustituciones de aminoácidos corresponden a cualquiera de las siguientes posiciones: W215F; W215Y, Q174A, Q174V, Q174F, Q174R, Q174K, D217A, D217V, Q192E, F99W y F99Y del dominio proteasa de MT-SP1 basándose en la numeración de la quimotripsina. La Tabla 19 proporciona ejemplos no limitantes de sustituciones de aminoácidos que aumentan la especificidad y/o selectividad con respecto a una cualquiera o más proteínas del complemento, incluyendo los números de identificación de secuencia para secuencias polipeptídicas ejemplares y las secuencias de ácidos nucleicos codificantes.

Tabla 19:

Modificación	SEC ID N° de longitud completa	SEC ID N° de parte catalíticamente activa
W215F	436, 512	58, 468
W215Y	437, 513	59, 469
Q174A	438, 514	60, 470
Q174V	439, 515	61, 471
Q174F	440, 516	62, 472
Q174R	441, 517	63, 473
Q174K	442, 518	64, 474
D217A	443, 519	65, 475
D217V	444, 520	66, 476
Q192E	445, 521	67, 477
F99W	446, 522	68, 478
F99Y	447, 523	69, 479

En una realización, las proteasas modificadas pueden combinarse de tal manera que, por ejemplo, adquieren la especificidad de múltiples proteasas. Una mutación en un resto de un armazón de proteasa, que produce especificidad en un sitio de una secuencia sustrato, puede combinarse en la misma proteasa con otra mutación en otro sitio de la secuencia de la proteasa armazón para obtener una proteasa con especificidad combinada. Puede usarse cualquier cantidad de mutaciones en sitios discretos sobre la misma proteasa armazón para crear una proteasa con especificidad combinada. Una proteasa modificada puede contener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más mutaciones combinando dos o más mutaciones cualesquiera identificadas como mutaciones que contribuyen a la especificidad y/o selectividad de sustrato de la proteasa.

Por ejemplo, una proteasa MT-SP1 modificada puede contener dos o más mutaciones cualesquiera, tal como dos o más mutaciones cualesquiera de las indicadas anteriormente, para generar una proteasa combinada. En el presente documento se proporcionan polipéptidos de MT-SP1 modificados que tienen dos o más modificaciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 41, 60c, 96, 97, 99, 143, 146, 147, 151, 172, 174, 175, 192, 215, 217, 221 a y 224, basándose en la numeración de la quimotripsina. El polipéptido de MT-SP1 modificado presenta mayor especificidad y/o selectividad con respecto a uno cualquiera o más componentes del complemento en comparación con una MT-SP1 armazón o de tipo silvestre de la SEC ID N°: 2 o una parte catalíticamente activa de la

5 misma indicada en la SEC ID N°: 10. Por tanto, en el presente documento se describen polipéptidos de MT-SP1 modificados que presentan mayor especificidad y/o selectividad hacia una cualquiera o más componentes del complemento que contienen dos o más modificaciones en una posición de aminoácido correspondiente a dos o más restos de aminoácidos cualesquiera seleccionados de entre I41, R60<sub>c</sub>, D96, F97, F99, H143, Y146, G147, G151, L172, Q174, Q175, Q192, W215, D217, Q221<sub>a</sub> o K224 en una MT-SP1 indicada en la SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 10, basándose en la numeración de la quimotripsina. En algunos ejemplos, una MT-SP1 modificada que contiene dos o más modificaciones contiene una modificación en una o ambas de las posiciones Y146 y K224. En otro ejemplo, una MT-SP1 modificada que contiene dos o más modificaciones contiene una modificación en la posición G151. Los polipéptidos de MT-SP1 modificados pueden generarse usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. La Tabla 20 proporciona ejemplos no limitantes de sustituciones de aminoácidos que aumentan la especificidad y/o selectividad con respecto a una cualquiera o más proteínas del complemento, incluyendo los números de identificación de secuencia para secuencias polipeptídicas ejemplares y las secuencias de ácidos nucleicos codificantes.

15

Tabla 20:

ID N°	Modificación	SEC ID N° de longitud completa	SEC ID N° de parte catalíticamente activa
CB155	Y146D/K224F	404, 480	11, 12
CB212	Y146N/K224F	655	601
CB213	Y146E/K224F	642	588
CB214	Y146A/K224F	643	589
CB216	Q192V/K224F	659	605
CB218	Q192F/K224F	657	603
CB219	Y146D/Q192A/K224F	658	604
CB232	Y146E/K224L	620	566
CB235	Y146E/K224A	630	576
CB238	Y146D/K224L	628	574
CB244	Y146D/K224R	617	563
CB245	Y146D/K224N	637	583
CB251	Y146E/K224R	615	561
CB252	Y146E/K224N	606	552
CB255	Y146E/K224T	644	590
CB257	Y146E/K224Y	633	579
CB331	I41D/Y146D/K224L	653	599
CB332	I41E/Y146D/K224L	639	585
CB349	I41D/Y146D/K224F	654	600
CB350	I41E/Y146D/K224F	652	598
CB351	I41T/Y146D/K224F	608	554
CB353	H143V/Y146D/K224F	641	587
CB357	I41T/Y146D/K224L	626	572
CB367	Y146D/Q175D/K224R	624	570
CB373	Y146E/Q175D/K224R	619	565
CB377	Y146E/Q175D/K224N	616	562
CB381	Y146D/Q175D/K224L	631	577
CB383	Y146D/Q175L/K224L	625	571

ES 2 400 306 T3

ID N°	Modificación	SEC ID N° de longitud completa	SEC ID N° de parte catalíticamente activa
CB385	Y146D/Q175F/K224L	634	580
CB387	Y146D/Q175W/K224L	627	573
CB388	Y146D/Q175Y/K224L	632	578
CB403	Y146D/D217F/K224L	640	586
CB409	I41A/Y146D/K224F	651	597
CB412	I41L/Y146D/K224B	649	595
CB413	I41F/Y146D/R224F	648	594
CB421	I41T/Y146D/Q175D/K224F	656	602
CB422	I41T/Y146E/Q175D/K224N	609	555
CB423	I41T/Y146E/K224L	645	591
CB450	I41T/I46D/G151L/K224F	650	596
CB451	Y146D/Q221aL/K224S	638	584
CB458	Y146E/Q221aE/K224R	629	575
CB464	Y146E/Q221aE/k224F	611	557
CB476	I41T/Y146D/Q175D/K224L	663	672
CB477	I41T/Y146D/Q175D/K224R	664	673
CB478	I41T/Y146D/Q175D/K224N	665	674
CB480	I41T/Y146D/G151L/Q175D/K224F	666	675
CB481	I41T/Y146D/G151L/Q175D/K224L	667	676
CB482	I41T/Y146D/G151L/Q175D/K224R	668	677
CB483	I41T/Y146D/G151L/Q175D/K224N	669	678
CB484	I41T/Y146E/Q175D/K224F	670	679
CB485	I41T/Y146E/Q175D/K224L	671	680
CB486	I41T/Y146E/Q175D/K224R	607	553
CB487	I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224N	613	559
CB488	I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224F	618	564
CB489	I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224L	610	556
CB490	I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224R	612	558
	I41T/Y146D/G151L/K224N	681	696
	Y146D/Q175D/K224N	682	697
	I41T/Y146D/K224N	683	698
	Y146D/G151L/K224N	684	699
	Y146D/Q175R/K224N	685	700
	Y146D/Q175K/K224N	686	701
	Y146D/Q175H/K224N	687	702
	I41T/Y146D/G151L/Q175K/K224F	688	703
	I41T/Y146D/G151L/Q175R/K224F	689	704

ID N°	Modificación	SEC ID N° de longitud completa	SEC ID N° de parte catalíticamente activa
	I41T/Y146D/G151L/Q175H/K224F	690	705
	I41T/Y146D/G151L/Q175Y/K22aF	691	706
	I41T/Y146D/G151L/Q175K/K224N	692	707
	I41T/Y146D/G151L/Q175R/K224N	693	708
	I41T/Y146D/G151L/Q175H/K224N	694	709
	I41T/Y146D/G151L/Q175Y/K224N	695	710

En el presente documento se describen polipéptidos de MT-SP1 modificados en los que la sustitución o sustituciones se realizan en un armazón polipeptídico de MT-SP1 que tiene una secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 2, en el que el polipéptido de MT-SP1 modificado presenta mayor especificidad y/o selectividad con respecto a uno cualquiera o más componentes del complemento en comparación con la proteína no modificada. En el presente documento también se describen polipéptidos de MT-SP1 modificados que contienen una o más sustituciones en un armazón de MT-SP1 que tiene una secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 10, en el que el polipéptido de MT-SP1 modificado presenta mayor especificidad y/o selectividad con respecto a uno cualquiera o más componentes del complemento en comparación con la proteína no modificada. Dicho polipéptido armazón de MT-SP1 es una parte catalíticamente activa de un polipéptido de MT-SP1. Los polipéptidos de MT-SP1 modificados ejemplares descritos en el presente documento que contienen una o más modificaciones de una parte catalíticamente activa de un armazón de MT-SP de longitud completa tienen una secuencia de aminoácidos como la indicada en una cualquiera de las SEC ID N°: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40-69, 524-528, 552-605, 672-680 o 696-710. Los polipéptidos de MT-SP1 modificados ejemplares descritos en el presente documento que contienen una o más modificaciones de un armazón de MT-SP1 de longitud completa tienen una secuencia de aminoácidos como la indicada en una cualquiera de las SEC ID N°: 404-418-447, 529-533, 606-659, 663-671 o 681-695.

#### 20 E. Ensayos para evaluar o controlar actividades proteasa modificadas sobre las funciones mediadas por el complemento

Una proteasa modificada puede presentar alteraciones en cuanto a la especificidad y/o selectividad con respecto a una cualquiera o más proteínas del complemento y por lo tanto inactivar una cualquiera o más proteínas del complemento en comparación con la correspondiente forma de longitud completa, armazón o de tipo silvestre de la proteína del complemento. Las proteínas modificadas conservan su actividad proteasa pero pueden presentar una mayor especificidad y/o selectividad con respecto a una cualquiera o más proteínas del complemento. Las proteasas ejemplares escinden específicamente una cualquiera o más proteínas del complemento y por lo tanto modifican la actividad de una proteína del complemento. Todas estas proteasas armazón o modificadas con mayor especificidad y/o selectividad con respecto a una cualquiera o más proteínas del complemento son candidatos terapéuticos.

30 Cuando la proteasa presenta una mayor especificidad y/o selectividad con respecto a una o más proteínas del complemento, pueden usarse ensayos *in vitro* e *in vivo* para controlar o explorar proteasas en relación con los efectos sobre funciones mediadas por el complemento. Dichos ensayos son bien conocidos por los expertos en la materia. Un experto en la materia puede ensayar una proteasa armazón particular o modificada para determinar la escisión de una cualquiera o más proteínas del complemento y/o ensayar para evaluar cualquier cambio en los efectos de una proteasa sobre una actividad mediada por el complemento en comparación con la ausencia de una proteasa. Algunos de estos ensayos se ilustran en el presente documento.

40 En el presente documento se proporcionan ensayos ejemplares *in vitro* e *in vivo* para comparar la actividad de una proteasa armazón o modificada sobre la función de una cualquiera o más proteínas del complemento diana. Muchos de los ensayos pueden aplicarse a otras proteasas y proteasas modificadas. Además, los expertos en la materia conocen numerosos ensayos, tales como ensayos para medir la activación del complemento. Los ensayos para detectar actividades del complemento incluyen, pero sin limitación, ensayos que miden los productos de activación de la activación del complemento, tales como, por ejemplo, el complejo MAC C5b-9, y la generación de uno cualquiera o más de los productos de escisión del complemento tales como C4a, C5a, C3b y C3d. Los ensayos para medir la activación del complemento también incluyen ensayos funcionales que miden la actividad funcional de componentes específicos de las rutas del complemento, tales como, por ejemplo, ensayos hemolíticos usados para medir la activación de una cualquiera de la ruta clásica, de la lectina o alternativa. Los ensayos para evaluar los efectos de las proteasas y proteasas modificadas sobre las proteínas del complemento y/o las funciones mediadas por el complemento incluyen, pero sin limitación, análisis SDS seguido por Transferencia de Western o Tinción con Azul Brillante de Coomassie, ensayos inmunoenzimáticos y ensayos hemolíticos. En un ejemplo, pueden realizarse ensayos *in vitro* usando proteínas del complemento purificadas. En otro ejemplo, pueden realizarse ensayos *in vivo* para ensayar el suero de una especie, incluyendo una especie de mamífero o humana, para determinar la activación

funcional del complemento. A continuación se describen ensayos ejemplares.

a. Detección de proteínas

5 La detección de proteínas es un medio que mide componentes individuales del complemento en una muestra. Las proteínas de complemento pueden detectarse para evaluar directamente los efectos de una proteasa armazón o modificada sobre la escisión de las proteínas o, como alternativa, las proteínas del complemento pueden medirse como un medio para evaluar la activación del complemento. Las proteínas del complemento, tratadas en presencia o en ausencia de una proteasa armazón o modificada, pueden analizarse mediante cualquiera de uno o más ensayos  
10 incluyendo SDS-PAGE seguido por tinción de Coomassie o Transferencia de Western, inmunoensayo enzimático, inmunohistoquímica, citometría de flujo, nefelometría, difusión en gel con agar o inmunodifusión radial. A continuación se describen ensayos ejemplares para la detección de proteínas.

i. Análisis mediante SDS-PAGE

15 El análisis de las proteínas del complemento en presencia o en ausencia de concentraciones en aumento de una proteasa armazón o modificada puede realizarse mediante análisis de proteínas en SDS-PAGE seguido por la detección de estas proteínas. En dichos ejemplos, las proteínas del complemento pueden detectarse por tinción para proteína total, tal como por tinción con Azul Brillante de Coomassie, tinción con Plata o mediante cualquier otro  
20 método conocido por un experto en la técnica, o mediante Transferencia de Western usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para una proteína específica. Típicamente, una proteína del complemento purificada, tal como por ejemplo una cualquiera o más de las proteínas implicadas en las rutas del complemento, pueden incubarse en presencia o en ausencia de una proteasa armazón o modificada. La proteína del complemento tratada puede determinarse sobre un gel de SDS-PAGE seguido por un método para detectar la proteína en el gel,  
25 por ejemplo, mediante tinción con Azul Brillante de Coomassie. La proteína tratada puede compararse con su proteína afín de longitud completa y los productos de degradación formados pueden determinarse por la escisión de la proteína proteasa.

30 En otra realización, una muestra, tal como por ejemplo suero o plasma humano, puede tratarse en presencia o en ausencia de una proteasa armazón o modificada o puede recogerse después del tratamiento de un animal o un ser humano con o si una proteasa. La muestra tratada con proteasa puede analizarse en SDS-PAGE y mediante Transferencia de Western puede detectarse una proteína del complemento específica, tal como por ejemplo Clq, MBL, C2, C3, C4, C5 o Factor B, usando anticuerpos monoclonales o policlonales contra la proteína. La escisión de la proteína del complemento puede compararse con una muestra no tratada con una proteasa. Adicionalmente, la  
35 muestra puede estimularse para iniciar la activación del complemento tal como por incubación con IgG que estimula la activación de la ruta clásica o por LPS que estimula la activación de la ruta alternativa. La muestra puede determinarse por SDS-PAGE para la detección de una o más de las proteínas del complemento nativas para determinar la presencia o ausencia de productos de escisión de una proteína específica comparación con una muestra de la proteína no tratada con una proteasa. En dichos ejemplos, la escisión de moléculas efectoras de las  
40 proteínas del complemento nativas también pueden analizarse mediante transferencia de Western usando anticuerpos monoclonales y policlonales para evaluar la activación de una o más de las rutas complemento. Los ejemplos de moléculas efectoras del complemento pueden incluir, pero sin limitación, C3a, C3d, iC3b, C4d, Bb y C5-b9. Por ejemplo, en una muestra, una expresión disminuida de C4d puede indicar que una proteasa armazón o modificada inhibe la activación de una o más de la ruta clásica o de la lectina del complemento. En otro ejemplo, en  
45 una muestra una expresión disminuida de Bb puede indicar que una proteasa armazón o modificada inhibe la activación de la ruta alternativa del complemento. Los productos de escisión de las moléculas efectoras también pueden determinarse para evaluar los efectos de las concentraciones en aumento de una proteasa armazón o modificada sobre la escisión de las propias moléculas efectoras del complemento.

50 ii. Inmunoensayo enzimático

El ensayo inmunoenzimático (EIA; denominado también ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; ELISA) es un ensayo que se utiliza para medir la presencia de una proteína en una muestra. Típicamente, la medición de la proteína es una medición indirecta de la unión de la proteína con un anticuerpo, que en sí mismo está químicamente  
55 marcado con un sustrato de detección, tal como una enzima o un compuesto fluorescente. Los ensayos EIA pueden usarse para medir los efectos de las proteasas armazón o modificadas sobre la activación del complemento midiendo la presencia de una molécula efectora del complemento generada después de la activación del complemento. En dichos ejemplos, una muestra, tal como, por ejemplo, suero o plasma humano, puede tratarse previamente en presencia o en ausencia de concentraciones en aumento de una proteasa armazón o modificada y posteriormente activarse para inducir la activación del complemento mediante incubación con moléculas iniciadoras o puede recogerse después del tratamiento de un animal o un ser humano con una proteasa. Por ejemplo, la ruta clásica puede activarse por incubación con IgG y la ruta alternativa puede activarse por incubación de la muestra con LPS. Un ensayo de activación del complemento específico para la ruta de la lectina requiere que la ruta clásica del complemento esté inhibida ya que la actividad de escisión de C4/C2 de la ruta de la lectina está compartida con  
60 la ruta clásica del complemento. La inhibición de la ruta clásica puede conseguirse usando un tampón con elevada fuerza iónica que inhibe la unión de Clq con complejos inmunitarios y altera el complejo C1, mientras que un tampón  
65



con elevada fuerza iónica no influye en la actividad de unión con carbohidratos de la MBL. Por consiguiente, la activación de la ruta de la lectina puede inducirse por incubación de una muestra, tal como suero o plasma humano, con una superficie recubierta con manano en presencia de NaCl 1 M.

- 5 Después de la activación, la muestra puede inactivarse con la adición de Pefabloc (Roche) y EDTA para minimizar la activación continuada de las rutas. Las muestras pueden analizarse para detectar la presencia de moléculas efectoras del complemento mediante un ensayo EIA o ELISA. Los ensayos EIA y ELISA para medir las proteínas del complemento son bien conocidos por los expertos en la técnica. Puede evaluarse cualquier producto de activación del complemento. Los productos de activación de complemento ejemplares para la medición de la activación del complemento incluyen iC3b, Bb, C4d, C5b-9, C3a, C3a-desArg, C4a-desArg y C5a-desArg. La ruta del complemento activada puede determinarse dependiendo del producto de activación del complemento que vaya a medirse: Por ejemplo, la medición del producto de escisión Bb es un marcador exclusivo de la ruta alternativa.

15 En algunos ejemplos, la EIA puede complementarse con la detección de las proteínas del complemento escindidas mediante análisis de la muestra estimulada por complemento, tratada con proteasa, mediante SDS-PAGE seguido de análisis de transferencia de Western para la identificación de los componentes específicos del complemento. Usando programación informática densitométrica, la escisión del producto del complemento puede compararse con el componente del complemento de longitud completa escindido a lo largo del ensayo y puede determinarse la presencia de todos los productos de degradación principales y el porcentaje de escisión.

### 20 iii. Inmunodifusión radial (RID)

La inmunodifusión radial (RID) es una técnica que se basa en la precipitación de complejos inmunitarios formados entre anticuerpos incorporados en geles de agarosa cuando esta se vierte y antígenos presentes en una muestra de ensayo dando como resultado una línea circular de precipitina alrededor del pocillo de la muestra. El diámetro del anillo de precipitina es proporcional a la concentración del anticuerpo (o antígeno) presente en la muestra de ensayo. Comparando el diámetro del anillo de precipitina del espécimen de ensayo con patrones conocidos, puede conseguirse un cálculo relativamente insensible de la concentración del anticuerpo o antígeno específico. La RID puede usarse para medir la cantidad de una proteína del complemento en una muestra. Por ejemplo, una muestra tal como, por ejemplo, suero o plasma humano, puede tratarse en presencia o en ausencia de concentraciones en aumento de una proteasa armazón o modificada. La muestra tratada con proteasa puede añadirse a un pocillo de un gel de agarosa que se ha preparado para incorporar un anticuerpo policlonal o monoclonal contra una cualquiera de las proteínas del complemento, tal como incluyendo, pero sin limitación, C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C9 o Factor B. Después de retirar las proteínas no precipitadas por exposición a NaCl 0,15 M, los anillos de la proteína precipitada pueden evaluarse tiñendo con un colorante para proteínas, tal como, por ejemplo, tinción con azul Brillante Coomassie o tinción doble de Crowley.

### b. Ensayos hemolíticos

40 Los ensayos hemolíticos funcionales proporcionan información sobre la función del complemento en su conjunto. Este tipo de ensayo utiliza eritrocitos de oveja sensibilizados o no con anticuerpos. Los ensayos hemolíticos incluyen el ensayo del complemento hemolítico total (CH50), que mide la capacidad de la ruta clásica y del CAM para lisar una RBC (*Red Blood Cell*) de oveja. Esto depende de la activación secuencial de los componentes de la ruta clásica (C1 a C9) para lisar eritrocitos de oveja que se han sensibilizado con cantidades óptimas de anticuerpos de conejo anti-eritrocitos de oveja para preparar complejos antígeno-anticuerpo celulares. Los ensayos hemolíticos también pueden incluir un ensayo CH50 de la ruta alternativa (CH50 o APCH50 de conejo), que mide la capacidad de la ruta alternativa y del CAM para lisar una RBC de conejo. Una unidad CH50 y/o APCH50 se define como la cantidad o dilución de suero necesaria para lisar el 50% de los glóbulos rojos en el ensayo. Típicamente, para evaluar la activación del complemento, una muestra, tal como por ejemplo suero o plasma humano, puede tratarse en presencia o en ausencia de concentraciones en aumento de una proteasa armazón o modificada, o puede recogerse después del tratamiento de un animal o un ser humano en presencia o en ausencia de una proteasa. La muestra tratada con proteasa puede posteriormente mezclarse con eritrocitos de oveja que se han activado o sensibilizado con IgG. Una muestra solo de agua mezclada con eritrocitos de oveja puede actuar como un control de lisis total para evaluar de manera precisa el porcentaje de lisis de las muestras analizadas. A la muestra puede añadirse NaCl 0,15 M para detener la reacción de lisis. La lisis de los eritrocitos, inducida por la activación de los componentes terminales de la ruta del complemento, puede evaluarse midiendo la liberación de hemoglobina. La medición puede ser por lecturas de densidad óptica (DO) de las muestras usando un espectrofotómetro a una DO de 415 nm.

60 En una realización, para medir la actividad funcional de los componentes específicos de cualquier ruta pueden utilizarse ensayos hemolíticos de dilución limitante. En un ensayo de este tipo, se utiliza una fuente de suero que tiene un exceso de todos los componentes del complemento, pero es deficiente en cuanto al que va a medirse en la muestra, es decir, para una proteína específica el medio o la fuente de suero está empobrecida de complemento. El grado de hemólisis depende por lo tanto de la presencia del componente medido en la muestra de ensayo. En un ensayo de este tipo, una proteína del complemento purificada, tal como, por ejemplo, una cualquiera de las proteínas nativas del complemento, incluyendo pero sin limitación, C1q, MBL, C2, C3, C4 o C5, puede incubarse en presencia o en ausencia de concentraciones en aumento de una proteasa armazón o modificada. Después, las

proteínas del complemento purificadas, tratadas con proteasa, pueden mezclarse con medios o plasma empobrecidos de complemento y eritrocitos de oveja activados con IgG y la hemólisis de la muestra puede evaluarse como se ha descrito anteriormente. En otra realización, la escisión de la proteasa puede correlacionarse con la activación del complemento ensayando la actividad hemolítica de una muestra tratada con proteasa, y posteriormente analizando la muestra en gel de SDS-PAGE seguido por tinción con una tinción para proteínas, tal como, por ejemplo, Azul Coomassie. La proteína del complemento purificada tratada con la proteasa puede evaluarse para determinar la escisión y el porcentaje del componente de complemento de longitud completa escindido a lo largo del ensayo y puede calcularse la aparición de todos los productos de degradación principales. Como alternativa, el análisis de la proteína del complemento tratada con proteasa puede ser mediante transferencia de Western.

Para evaluar la activación de la ruta clásica puede usarse una alternativa al ensayo hemolítico, denominado inmunoensayo liposómico (LIA). El LIA (Waco Chemicals USA, Richmond, Va.) utiliza liposomas recubiertos con dinitrofenilo (DNP) que contiene la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Cuando el suero se mezcla con los liposomas y un sustrato contiene anticuerpo anti-DNP, la glucosa-6-fosfato y el dinucleótido de nicotinamida adenina, activan la lisis de los liposomas y se produce una reacción colorimétrica enzimática que es proporcional a la actividad del complemento clásico total.

#### **F. Métodos para producir proteasas que codifican ácidos nucleicos y métodos para producir polipéptidos de proteasa**

Los polipéptidos de proteasa, incluyendo polipéptidos de MT-SP1 modificados, o dominios de los mismos, pueden obtenerse mediante métodos bien conocidos en la técnica de purificación de proteínas y expresión de proteínas recombinantes. Para la identificación de ácidos nucleicos que codifican genes deseados puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Para obtener un clon de ADN genómico o ADNc de longitud completa (*es decir*, que incluya toda la región codificante) que codifique una proteína proteasa, puede usarse cualquier método disponible en la técnica tal como a partir de una fuente celular o tisular. Como se describe en el presente documento, las proteasas modificadas pueden modificarse por ingeniería genética a partir de una proteasa armazón o de tipo silvestre, tal como mediante mutagénesis dirigida.

Las proteasas pueden clonarse o aislarse usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para la clonación y aislamiento de moléculas de ácido nucleico. Tales métodos incluyen amplificación por PCR de los ácidos nucleicos y exploración de bibliotecas incluyendo exploración de hibridación de ácidos nucleicos, exploración basada en anticuerpos y exploración basada en actividad.

Pueden usarse métodos para la amplificación de ácidos nucleicos para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican una proteasa, incluyendo por ejemplo, el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como material de partida puede usarse un ácido nucleico que contenga material a partir del cual pueda aislarse una molécula de ácido nucleico que codifique una proteasa. Por ejemplo, en los métodos de amplificación pueden usarse preparaciones de ADN y ARNm, extractos celulares, extractos de tejidos, muestras de fluidos (por ejemplo, sangre, suero, saliva), muestras de sujetos sanos y/o enfermos. Como una fuente de material de partida también pueden usarse bibliotecas de ácido nucleico. Para amplificar una proteasa pueden diseñarse cebadores. Por ejemplo, pueden diseñarse cebadores basándose en secuencias expresadas a partir de las cuales se genera una proteasa. Pueden diseñarse cebadores basándose en la retro-traducción de una secuencia de aminoácidos de proteasa. Las moléculas de ácido nucleico generadas para amplificación pueden secuenciarse y confirmarse para codificar una proteasa.

A una molécula de ácido nucleico que codifica una proteasa pueden unirse secuencias de nucleótidos adicionales, incluyendo secuencias engarzadoras que contienen sitios de restricción de endonucleasa para clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteínas o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias de ADN que codifican una proteína núcleo. Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcionales pueden unirse operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifique una proteasa. Los ejemplos de dichas secuencias incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras diseñadas para facilitar la expresión de proteínas intracelulares y secuencias de secreción diseñadas para facilitar la secreción de proteínas. Otras secuencias de nucleótidos tales como secuencias que especifican regiones de unión a proteínas también pueden unirse a moléculas de ácido nucleico que codifican proteasas. Dichas regiones incluyen, pero sin limitación, secuencias que facilitan la captación de una proteasa en células diana específicas o, de otra manera, potencian los perfiles farmacocinéticos del gen sintético.

Los ácidos nucleicos identificados y aislados pueden después insertarse en un vector de clonación apropiado. En la técnica puede usarse una gran cantidad de sistemas hospedador-vector conocidos. Los posibles vectores incluyen, pero sin limitación, plásmidos o virus modificados, si bien el sistema vectorial debe ser compatible con la célula hospedadora usada. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, bacteriófagos tales como derivados de lambda o plásmidos tales como pBR322 o derivados del plásmido pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). La inserción en un vector de clonación puede, por ejemplo, conseguirse ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tenga un extremo cohesivo complementario. La inserción puede efectuarse usando vectores de

clonación TOPO (INVITROGEN, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, las terminaciones de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente. Como alternativa, puede producirse cualquier sitio deseado ligando las secuencias de nucleótidos (engarces) en las terminaciones del ADN; estos engarces ligados pueden contener oligonucleótidos específicos químicamente sintetizados que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. En un método alternativo, el vector de escisión y el gen de la proteína proteasa pueden modificarse mediante prolongación homopolimérica. Las moléculas recombinantes pueden introducirse en células hospedadoras, por ejemplo, mediante transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de tal manera que se generen muchas copias de la secuencia génica.

En realizaciones específicas, la transformación de las células hospedadoras con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen de la proteína proteasa aislado, el ADNc o la secuencia de ADN sintetizada permite la generación de múltiples copias del gen. Por tanto, el gen puede obtenerse en grandes cantidades cultivando transformantes, aislando las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperando del ADN recombinante aislado el gen insertado.

### 1. Vectores y células

Para la expresión recombinante de una o más proteínas proteasas, el ácido nucleico que contiene toda o parte de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína proteasa puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de la proteína insertada. Las señales transcripcionales y traduccionales necesarias también pueden proporcionarse por el promotor nativo para los genes de proteasa, y/o sus regiones flanqueantes.

También se proporcionan vectores que contienen ácido nucleico que codifica la proteasa o la proteasa modificada. También se proporcionan las células que contienen los vectores. Las células incluyen células eucariotas y procariotas, y los vectores son cualquiera que sea adecuado para su uso en el presente documento.

Se proporcionan células procariotas y eucariotas, incluyendo células endoteliales, que contienen los vectores. Dichas células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, arqueobacterias, células vegetales, células de insecto y células de animales. Las células se usan para producir una proteasa o una proteína proteasa modificada de la misma, cultivando las células descritas anteriormente en condiciones en las que la célula exprese la proteína proteasa codificada y recuperando la proteína proteasa expresada. Para los fines del presente documento, la proteasa puede secretarse en el medio.

En una realización, se proporcionan, vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad proteasa y que contiene toda o una parte del dominio de la proteasa, o copias múltiples del mismo. También se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de la proteasa y partes adicionales de una proteína proteasa hasta e incluyendo una proteína proteasa de longitud completa, así como múltiples copias de la misma. Los vectores pueden seleccionarse para la expresión de la proteína proteasa armazón o modificada o su dominio proteasa en la célula o de tal manera que la proteína proteasa se exprese como una proteína secretada. Cuando el dominio de la proteasa se expresa el ácido nucleico está ligado al ácido nucleico que codifica una señal de secreción, tal como la secuencia de señal del factor de acoplamiento  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* o una parte del mismo, o la secuencia de señal nativa.

Para expresar la secuencia codificante de la proteína puede usarse una diversidad de sistemas hospedador-vector. Estos incluyen, pero sin limitación, sistemas celulares de mamíferos infectados con virus (por ejemplo, virus vacuna, adenovirus y otros virus); sistemas celulares de insectos infectados con virus (por ejemplo baculovirus); microorganismos, tales como levaduras que contienen vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico o ADN cósmido. Los elementos de expresión de los vectores varían en cuanto a su fuerza y especificidades. Dependiendo del sistema hospedador-vector usado, puede usarse cualquiera de los diversos elementos de transcripción y traducción adecuados.

Para construir vectores de expresión que contengan un gen quimérico que contenga señales de control transcripcionales/traduccionales apropiadas y secuencias codificantes de proteínas puede usarse cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica para la inserción de fragmentos de ADN en un vector. Estos métodos pueden incluir técnicas sintéticas y de ADN recombinante *in vitro* y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína proteasa armazón o modificada o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de la misma, puede regularse mediante una segunda secuencia de ácido nucleico de tal manera que los genes o los fragmentos de la misma se expresen en un hospedador transformado con la molécula (o moléculas) de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede controlarse mediante cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En una realización específica, el promotor no es nativo para los genes de una proteína proteasa. Los promotores que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, el promotor temprano del SV40 (Bemoist y Chambon, Nature 290: 304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al. Cell 22: 787-797 (1980)), el promotor de la timidina quinasa de herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445

(1981)), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster et al., Nature 296: 39-42 (1982)); vectores de expresión procariotas tales como el promotor de la  $\beta$ -lactamasa (Jay et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 5543) o el promotor *tac* (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25 (1983)); véase también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American 242: 79-94 (1980)); vectores de expresión en plantas que contienen el promotor de la nopalina sintetasa (Herrar-Estrella et al., Nature 303: 209-213 (1984)) o el promotor del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner et al., Nucleic Acids Res. 9: 2871 (1981)) y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bisfosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., Nature 310: 115-120 (1984)); elementos promotores de levaduras y otros hongos tal como el promotor Gal4, al promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de la fosfoglicerol quinasa, el promotor de la fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control transcripcional de animales que presentan especificidad tisular y que se han usado en animales transgénicos: región del control del gen de la elastasa I que es activo en células acinares pancreáticas (Swift et al., Cell 38: 639-646 (1984); Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7: 425-515 (1987)); la región de control del gen de la insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan et al., Nature 315: 115-122 (1985)), la región de control del gen de la inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., Cell 38: 647-658 (1984); Adams et al., Nature 318: 533-538 (1985); Alexander et al., Mol. Cell Biol. 7: 1436-1444 (1987)), la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, mamarias, linfoides y mastocitos (Leder et al., Cell 45: 485-495 (1986)), la región de control del gen de la albúmina que es activa en hígado (Pinckert et al., Genes y Devel. 1: 268-276 (1987)), la región de control del gen de la alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al., Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648 (1985); Hammer et al., Science 235: 53-58 (1987)), la región de control del gen de la alfa-1 antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., Genes y Devel. 1: 161-171 (1987)), la región de control del gen de la beta globina que es activa en células mieloides (Mogram et al., Nature 315: 338-340 (1985); Kollias et al., Cell 46: 89-94 (1986)), la región de control del gen de la proteína básica de mielina que es activa en células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead et al., Cell 48: 703-712 (1987)), la región de control del gen de la miosina 2 de cadena ligera que es activa en el músculo esquelético (Sani, Nature 314: 283-286 (1985)), y la región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que es activa en gonadotropos hipotalámicos (Mason et al., Science 234: 1372-1378 (1986)).

En una realización específica, se usa un vector que contiene un promotor unido operativamente a ácidos nucleicos que codifican una proteína proteasa armazón o modificada, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo, de la misma, uno o más orígenes de replicación y, opcionalmente, uno o más marcadores de selección (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Los vectores y sistemas para la expresión de los dominios proteasa de las proteínas proteasa incluyen los vectores de *Pichia* bien conocidos (disponibles, por ejemplo, de Invitrogen, San Diego, CA), particularmente vectores diseñados para la secreción de las proteínas codificadas. Los vectores plasmídicos ejemplares para la transformación de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA; véase también la bibliografía publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor del fago T5 (reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*) y un módulo de represión doble del operador *lac* que proporciona un alto nivel de expresión, fuertemente regulado, de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión al ribosoma sintético (RBS II) para una traducción eficaz, una secuencia codificante marcadora 6XHis, terminadores transcripcionales  $t_0$  y T1, un origen de replicación de ColE1 y un gen de beta-lactamasa para conferir existencia a ampicilina. Los vectores pQE permiten colocar un marcador 6xHis en cualquiera de los extremos N o C de la proteína recombinante. Dichos plásmidos incluyen pQE 32 (SEC ID N°: 345), pQE 30 y pQE 31 que proporcionan sitios de clonación múltiples para estas tres fases de lectura y proporcionan la expresión de proteínas marcadas en el extremo N con 6xHis. Otros vectores plasmídicos ejemplares para la transformación de células *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase, la patente de Estados Unidos 4.952.496; disponible de NOVAGEN, Madison, WI; véase también la bibliografía publicada por Novagen que describe el sistema). Dichos plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor *lac* de T7, el terminador de T7, el operador *lac* inducible de *E. coli*, el gen represor *lac*; pET 12a-c, que contiene el promotor de T7, el terminador de T7 y la señal de secreción *ompT* de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (NOVAGEN, Madison, WI), que contiene una secuencia líder His-Tag™ para su uso en la purificación con una columna de His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión después de la purificación sobre la columna, la región del promotor *lac* de T7 y el terminador de T7.

## 2. Expresión

Las proteasas modificadas pueden producirse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, incluyendo métodos *in vivo* e *in vitro*. Las proteasas modificadas pueden expresarse en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades y las formas necesarias de una proteasa modificada necesaria para la administración y el tratamiento. Los hospedadores de expresión incluyen organismos procariotas y eucariotas tales como células de *E. coli*, de levaduras, de plantas, de insectos y de mamíferos, incluyendo líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los hospedadores de expresión pueden diferenciarse en cuanto a sus niveles de producción de proteínas así como en cuanto a los tipos de modificaciones postraduccionales que están presentes en las proteínas expresadas. La elección del hospedador de expresión puede realizarse basándose en estos y otros factores, tales como aspectos reguladores y de seguridad, costes de producción y la necesidad y métodos para la purificación.

Muchos vectores de expresión se encuentran disponibles en la técnica y los expertos en la técnica los conocen y pueden usarse para la expresión de proteasas modificadas. La elección del vector estará influenciada por la elección del sistema de expresión del hospedador. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores transcripcionales y opcionalmente potenciadores, señales traduccionales y señales de terminación transcripcionales y traduccionales. Los vectores de expresión que se usan para la transformación estable típicamente tienen un marcador de selección que permite la selección y la conservación en las células transformadas. En algunos casos, puede usarse un origen de replicación para amplificar el número de copias del vector.

Las proteasas modificadas también pueden utilizarse o expresarse como proteínas de fusión. Por ejemplo, una proteína de fusión puede generarse para añadir funcionalidad adicional a una proteasa. Los ejemplos de proteínas de fusión de proteasas incluyen, pero sin limitación, fusiones de una secuencia de señal, un marcador tal como para localización, por ejemplo, un marcador de his<sub>6</sub> o un marcador myc o un marcador para la purificación, por ejemplo, una fusión de GST, y una secuencia para dirigir la secreción de las proteínas y/o la asociación a la membrana.

En una realización, la proteasa puede expresarse en una forma activa. En otra realización, la proteasa se expresa en una forma de zimógeno, inactiva.

#### a. Procariotas

Los procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para la producción de grandes cantidades de proteínas tales como proteasas o proteasas modificadas. La transformación de *E. coli* es una técnica rápida y sencilla bien conocida por los expertos en la técnica. Los vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles, tales promotores son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteínas y para expresar proteínas que presentan cierta toxicidad por las células hospedadoras. Son ejemplos de promotores inducibles los que incluyen el promotor lac, el promotor trp, el promotor tac híbrido, los promotores de ARN de T7 y SP6 y el promotor de λPL regulado por la temperatura.

Las proteasas modificadas pueden expresarse en el entorno citoplásmico de *E. coli*. El citoplasma es un entorno reductor y para algunas moléculas, esto puede producir la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Los agentes reductores tales como ditioneol y β-mercaptoetanol y desnaturizantes, tales como HCl de guanidina y urea pueden usarse para resolubilizar las proteínas. Una estrategia alternativa es la expresión de una proteasa modificada en el espacio periplásmico de bacterias que proporciona un entorno oxidante e isomerasas disulfuro y similares a chaperoninas y pueden conducir a la producción de proteínas solubles. Típicamente, una secuencia líder se fusiona con la proteína que va a expresarse que dirige a la proteína al periplasma. Después, la secuencia líder se elimina mediante peptidasas de señal dentro del periplasma. Ejemplos de secuencias líder de direccionamiento periplásmico incluyen la secuencia líder pelB del gen de la peptidasa y la secuencia líder derivada del gen de la fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la filtración de la proteína expresada en el medio de cultivo. La secreción de proteínas permite la purificación sencilla y rápida del sobrenadante de cultivo. Las proteínas que no se secretan pueden obtenerse del periplasma por lisis osmótica. De manera similar a la expresión citoplásmica, en algunos casos las proteínas pueden volverse insolubles y desnaturizantes y pueden usarse agentes reductores para facilitar la solubilización y replegamiento. La temperatura de inducción y el crecimiento también puede influir en los niveles de expresión y solubilidad, típicamente se usan temperaturas entre 25 °C y 37 °C. Típicamente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por tanto, si la proteína requiere glicosilación para funcionar, la glicosilación puede añadirse *in vitro* después de la purificación de las células hospedadoras.

#### b. Levaduras

Las levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son hospedadores de expresión de levaduras bien conocidos que pueden usarse para la producción de proteasas modificadas. Las levaduras pueden transformarse con vectores de replicación episomales o mediante integración cromosómica estable por recombinación homóloga. Típicamente, se usan promotores inducibles para regular la expresión génica. Los ejemplos de dichos promotores incluyen los promotores de GAL1, GAL7 y GAL5 y de la metalotionina, tales como CUP1, AOX1 u otro promotor de *Pichia* u otra levadura. Los vectores de expresión a menudo incluyen un marcador de selección tal como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para la selección y conservación del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levaduras son frecuentemente solubles. La coexpresión con chaperoninas tales como Bip y la proteína disulfuro isomerasa pueden mejorar los niveles de expresión y la solubilidad. Adicionalmente, las proteínas expresadas en levaduras pueden dirigirse para la secreción usando sus fusiones de péptidos de señales de secreción, tales como la señal de secreción del factor de acoplamiento de tipo alfa de levadura procedente de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de la superficie celular de levaduras tales como el receptor de adhesión de acoplamiento Aga2p o la glucoamilasa de *Arxula adenivorans*. Un sitio de escisión de proteasas, tal como la proteasa Kex-2, puede modificarse por ingeniería genética para eliminar las secuencias fusionadas de los polipéptidos expresados a medida que salen de la ruta de secreción. Las levaduras también pueden realizar la glicosilación en motivos Asn-X-Ser/Thr.

## c. Células de insecto

Las células de insecto, particularmente las que usan expresión en baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos tal como proteasas modificadas. Las células de insecto expresan altos niveles de proteínas y pueden realizar la mayoría de las modificaciones postraduccionales usadas por eucariotas superiores. Los baculovirus tienen una variedad limitada de hospedadores que mejora la seguridad y reduce los aspectos reguladores de la expresión eucariota. Los vectores de expresión típicos usan un promotor para un alto nivel de expresión tal como el promotor de la polihedrina de baculovirus. Los sistemas de baculovirus normalmente usados incluyen baculovirus tales como el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) y el virus de la polihedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea celular de insecto tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para un alto nivel de expresión, la secuencia de nucleótidos de la molécula a expresar se fusiona inmediatamente cadena abajo del codón de inicio de la polihedrina del virus. Las señales de secreción de mamíferos se procesan de manera precisa en células de insecto y pueden usarse para secretar la proteína expresada en el medio de cultivo. Además, las líneas celulares de *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con modelos de glicosilación similares a los de los sistemas celulares de mamíferos.

Un sistema de expresión alternativo en células de insecto es el uso de células transformadas estables. Para la expresión pueden usarse líneas celulares tales como Schnieder 2 (S2) y célula Kc (*Drosophila melanogaster*) y células C7 (*Aedes albopictus*). El promotor de la metalotionina de *Drosophila* puede usarse para inducir altos niveles de expresión en presencia de inducción de metales pesados con cadmio o cobre. Los vectores de expresión se mantienen típicamente mediante el uso de marcadores de selección tales como neomicina e higromicina.

## d. Células de mamífero

Para expresar proteasas modificadas pueden usarse sistemas de expresión de mamífero. Las construcciones de expresión pueden transferirse a células de mamífero por infección viral tal como adenovirus o por transferencia directa de ADN tal como liposomas, fosfato cálcico, DEAE-dextrano y mediante medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamíferos típicamente incluyen un sitio de protección de ARNm, una caja TATA, una secuencia de iniciación traduccional (secuencia consenso de Kozak) y elementos de poliadenilación. Dichos vectores a menudo incluyen potenciadores-promotores transcripcionales para altos niveles de expresión, por ejemplo, el potenciador-promotor del SV40, el promotor del citomegalovirus humano (CMV) y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores-potenciadores son activos en muchos tipos de células. Las regiones promotoras y potenciadoras de tipo tisular y celular también pueden usarse para la expresión. Las regiones promotoras/potenciadoras ejemplares incluyen, pero sin limitación, regiones de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus de tumor mamario de ratón, albúmina, alfa fetoproteína, antitripsina alfa-1, beta globina, proteína básica mielínica, miosina 2 de cadena ligera y control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica. Pueden usarse marcadores de selección para seleccionar y mantener células con la construcción de expresión. Los ejemplos de genes de marcadores de selección, incluyen pero sin limitación, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, aminoglucósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa y timidina quinasa. La fusión con moléculas señalizadoras de la superficie celular, tales como TCR-C y FC<sub>ε</sub>RI-γ, puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo sobre la superficie celular.

Muchas líneas celulares se encuentran disponibles para la expresión en mamíferos incluyendo células de ratón, rata, ser humano, mono, pollo y hámster. Las líneas celulares ejemplares incluyen, pero sin limitación, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretadora) y otras líneas celulares de mieloma, hibridoma e heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, células Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 2935, 2B8 y HKB. También existen líneas celulares adaptadas a medios aséricos que facilitan la purificación de las proteínas secretadas de los medios de cultivo celulares. Un ejemplo de este tipo es la línea celular asérica EBNA-1 (Pham et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84: 332-42.)

## e. Plantas

Las células de las plantas transgénicas y las plantas pueden expresar proteasas modificadas. Las construcciones de expresión se transfieren típicamente a las plantas usando transferencia directa de ADN tal como transferencia de bombardeo con microproyectiles y mediada por PEG en protoplastos, y con transformación mediada con agrobacterium. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias promotoras y potenciadoras, elementos de terminación de la transcripción y elementos de control de la traducción. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación normalmente se dividen entre hospedadores de dicotiledóneas, tales como *Arabidopsis* y tabaco, y hospedadores de monocotiledóneas, tales como maíz y arroz. Los ejemplos de promotores de plantas usados para la expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de la nopalina sintasa, el promotor de la ribosa bisfosfato carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. Los marcadores de selección, tales como higromicina, fosfomanosa isomerasa y neomicin fosfotransferasa a menudo se usan para facilitar la selección y el mantenimiento de las células transformadas. Las células de las plantas transformadas pueden mantenerse en cultivo como células, agregados (tejido calloso) o regenerarse en plantas completas. Las células de plantas transgénicas

también pueden incluir algas modificadas por ingeniería genética para producir proteasas o proteasas modificadas (véase por ejemplo Mayfield et al. (2003) PNAS 100: 438-442). Debido a que las células de las plantas tienen diferentes modelos de glicosilación en comparación con las de mamífero, esto puede tener influencia sobre la elección de las proteasas o proteasas modificadas producidas en estos hospedadores.

5

### 3. Técnicas de purificación

Los métodos para realizar la purificación de los polipéptidos de proteasa de las células hospedadoras dependerán de las células hospedadoras seleccionadas y de los sistemas de expresión. Para moléculas secretadas, generalmente las proteínas se purifican de los medios de cultivo después de retirar las células. Para la expresión intracelular, las células pueden someterse a lisis y las proteínas purificarse del extracto. Cuando para la expresión se usan organismos transgénicos, tales como plantas y animales transgénicos, como material de partida para preparar un extracto de células lisadas pueden usarse tejidos u órganos. Adicionalmente, la producción en animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en leche o huevos, que pueden recogerse, y si fuera necesario, las proteínas pueden extraerse y posteriormente purificarse usando métodos convencionales existentes en la técnica.

La proteasa puede expresarse y purificarse en una forma inactiva (forma zimógeno) o como alternativa la proteasa expresada puede purificarse en una forma activa mediante autocatálisis para eliminar la proregión. Típicamente, la activación se produce durante el proceso de purificación, tal como incubando a temperatura ambiente durante 24-72 horas. La tasa y grado de activación depende de la concentración de la proteína y de la proteasa modificada específica, de tal manera que, por ejemplo, a temperatura ambiente una muestra más diluida puede necesitar un periodo de tiempo de incubación más prolongado. La activación puede controlarse mediante SDS-PAGE (un cambio de 3 kilodalton) y mediante actividad enzimática (escisión de un sustrato fluorogénico). Típicamente, antes de la purificación, se permite que una proteasa consiga una activación > 75%.

Las proteasas pueden purificarse usando técnicas de purificación de proteínas convencionales conocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitación, SDS-PAGE, cromatografía por exclusión y fracción de tamaño, precipitación en sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tal como de intercambio aniónico. También pueden utilizarse técnicas de purificación por afinidad para mejorar la eficacia y la pureza de las preparaciones. Por ejemplo, en cualquier purificación por afinidad pueden utilizarse anticuerpos, receptores y otras moléculas que se unen a proteasas. Las construcciones de expresión también pueden modificarse por ingeniería genética para añadir un marcador de afinidad a una proteína tal como un epítipo myc, una fusión con GST o His<sub>6</sub> y purificarse por afinidad con un anticuerpo myc, una resina de glutatión y una resina de Ni, respectivamente. La pureza puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo electroforesis en gel y tinción y técnicas espectrofotométricas.

### 4. Proteasas de fusión

También se proporcionan proteínas de fusión que contienen una proteasa y uno o más polipéptidos distintos. Se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen dichas proteínas de fusión formuladas para la administración mediante una vía adecuada. Las proteínas de fusión se forman engarzándose en cualquier orden a la proteasa armazón o modificada y a otro polipéptido, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, un factor de crecimiento, un receptor, un ligando u otro agente de este tipo con el fin de facilitar la purificación de una proteasa, modificar las propiedades farmacodinámicas de una proteasa dirigiendo la proteasa a una célula o tejido diana y/o aumentando la expresión o secreción de una proteasa. Dentro de una proteína de fusión de proteasa, el polipéptido de proteasa puede corresponder a toda o a una parte catalíticamente activa de la misma de una proteína proteasa armazón o de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la proteasa o su parte catalíticamente activa es una proteasa modificada. Las proteínas de fusión proporcionadas en el presente documento conservan sustancialmente toda su especificidad y/o selectividad para una cualquiera o más de las proteínas del complemento. Generalmente, los polipéptidos de fusión de proteasa conservan al menos aproximadamente una especificidad y/o selectividad de sustrato del 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% en comparación con una proteasa que no es una proteasa de fusión, incluyendo una especificidad de sustrato del 96%, 97%, 98%, 99%, o más, en comparación con una proteasa que no es una proteasa de fusión.

El engarce de un polipéptido de proteasa y otro polipéptido puede efectuarse directa o indirectamente mediante un engarzador. En un ejemplo, el engarce puede ser un engarce químico, tal como mediante agentes heterobifuncionales o engarces thiol u otros engarces de este tipo. La fusión de una proteasa con otro polipéptido puede ser en el extremo N o C del polipéptido de proteasa. Ejemplos no limitantes de polipéptidos que pueden usarse en las proteínas de fusión con una proteasa proporcionada en el presente documento incluyen, por ejemplo, un polipéptido de GST (glutatión S-transferasa), un dominio Fc de inmunoglobulina G o una secuencia de señal heteróloga. Las proteínas de fusión pueden contener componentes adicionales, tales como una proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli* que ayuda a las células a captar la proteína (véase, la Solicitud PCT internacional N° WO 01/32711).

65

Una proteína proteasa de fusión puede producirse mediante técnicas recombinantes convencionales. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias polipeptídicas pueden ligarse entre sí en fase de lectura de acuerdo con técnicas convencionales, empleando, por ejemplo, extremos con terminaciones romas o escalonadas para el ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, rellenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para impedir uniones no deseables y ligamiento enzimático. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos génicos puede realizarse utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a proyecciones complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel et al (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Además, en el mercado ya existen muchos vectores de expresión que codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido de GST). En dicho vector de expresión puede clonarse un ácido nucleico que codifique una proteasa de tal manera que el resto de fusión está engarzado en fase de lectura con la proteína proteasa.

### 5. Secuencias de nucleótidos

En el presente documento se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican proteasas armazón o modificadas. Las moléculas de ácido nucleico incluyen variantes alélicas o variantes de corte y empalme de cualquier proteasa armazón codificada, o una parte catalíticamente activa de la misma. En una realización, las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento tienen una identidad de secuencia de al menos 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 99% o se hibridan en condiciones de rigurosidad media o elevada a lo largo de al menos el 70% de la longitud completa de cualquier proteasa armazón codificada por el ácido nucleico, o una parte catalíticamente activa de la misma. En otra realización, una molécula de ácido nucleico puede incluir las secuencias con codones degenerados de cualquiera de las proteasas armazón o partes catalíticamente activas de las mismas tales como las proporcionadas en el presente documento. Las moléculas de ácido nucleico ejemplares, que codifican proteasas armazón o modificadas, o partes de las mismas catalíticamente activas, tienen una secuencia de nucleótidos como se indica en una cualquiera de las SEC ID N°: 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 451-523 y 534-543.

También se proporcionan moléculas de ácido nucleico, o proteínas de fusión que contienen una parte catalíticamente activa de una molécula de ácido nucleico, unida operativamente a un promotor, tal como un promotor inducible para la expresión en células de mamífero. Dichos promotores incluyen, pero sin limitación, promotores del CMV y del SV40; promotores de adenovirus, tal como el promotor del gen E2, que es sensible a la oncoproteína E7 del HPV; un promotor de PV, tal como el promotor p89 del PBV que es sensible a la proteína E2 del PV; y otros promotores activados por el VIH o PV o por oncogenes.

Las proteasas armazón o modificadas proporcionadas en el presente documento, también pueden administrarse a las células en vectores de transferencia de genes. Los vectores de transferencia también pueden codificar otro agente (o agentes) terapéutico adicional para el tratamiento de enfermedades o trastornos, tales como artritis reumatoide o enfermedades cardiovasculares, para los que se administra la proteasa. Los factores de transferencia que codifican una proteasa pueden usarse sistémicamente, administrando el ácido nucleico a un sujeto. Por ejemplo, el vector de transferencia puede ser un vector viral, tal como un vector adenoviral. Los vectores que codifican una proteasa también pueden incorporarse en células madre y dichas células madre administrarse a un sujeto tal como mediante trasplante o injerto de las células madre en sitios para terapia. Por ejemplo, pueden modificarse genéticamente células madre mesenquimales (MSC) para expresar una proteasa y dichas MSC injertarse en un sitio tumoral para terapia.

### G. Métodos de uso: Formulación/envasado/administración

Las composiciones farmacéuticas que contienen una proteasa o una proteasa modificada producida en el presente documento, incluyendo polipéptidos de MT-SP1 (modificados), proteínas de fusión de proteasas modificadas o moléculas de ácido nucleico codificantes, pueden formularse de cualquier manera convencional mezclando una cantidad seleccionada del polipéptido con uno o más transportadores o excipientes fisiológicamente aceptables. La selección del transportador o excipiente se incluye dentro de la habilidad del profesional que lo administre y puede depender de diversos parámetros. Estos incluyen, por ejemplo, el modo de administración (es decir, modo sistémico, oral, nasal, pulmonar, local, tópico o cualquier otro) y el trastorno a tratar. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden formularse para la administración de una sola dosificación (directa) o para dilución u otra modificación. Las concentraciones de los compuestos en las formulaciones son eficaces para administrar una cantidad, después de la administración, que sea eficaz para el tratamiento deseado. Típicamente, las composiciones se formulan para administración de una sola dosificación. Para formular una composición, la fracción en peso de un compuesto, o una mezcla de la misma, se disuelve, se suspende, se dispersa o, de otra manera, se mezcla en un vehículo seleccionado a una concentración eficaz de tal manera que la afección tratada se alivie o mejore. Los transportadores o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos proporcionados en el presente documento incluyen cualquiera de los transportadores conocidos por los expertos en la técnica que son adecuados para el modo de administración particular.



## 1. Administración de polipéptidos de proteasa modificada

Los polipéptidos pueden formularse como el único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o pueden combinarse con otros ingredientes activos. Los polipéptidos pueden dirigirse para la administración, tal como mediante conjugación con un agente diana, tal como un anticuerpo. Como transportadores farmacéuticamente aceptables también pueden ser adecuadas las suspensiones liposomales, incluyendo los liposomas dirigidos a tejidos. Estas pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse formulaciones liposomales como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.522.811. La administración liposomal también puede incluir formulaciones de liberación lenta, incluyendo matrices farmacéuticas tal como geles de colágeno y liposomas modificación con fibronectina (véase, por ejemplo, Weiner et al (1985) J Pharm Sci. 74(9): 922-5).

El compuesto activo se incluye en el transportador farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios no deseables en sujeto tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente sometiendo a ensayo los compuestos en sistemas conocidos *in vivo* o *in vitro*, tales como los ensayos descritos en el presente documento.

Los polipéptidos proporcionados en el presente documento (es decir, compuestos activos) pueden administrarse *in vivo*, *ex vivo*, o *in vivo* poniendo en contacto una mezcla, tal como un fluido corporal u otra muestra de tejido, con un polipéptido de proteasa proporcionado en el presente documento, incluyendo cualquiera de las proteasas de MT-SP1 modificadas proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, cuando se administra un compuesto *ex vivo*, un fluido corporal o una muestra de tejido de un sujeto puede ponerse en contacto con los polipéptidos de proteasa que se revisten sobre un tubo o un filtro, tal como, por ejemplo, un tubo o filtro en un aparato de derivación. Cuando se administran *in vivo*, los compuestos activos pueden administrarse mediante cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral, nasal, pulmonar, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica, en forma líquida, semilíquida o sólida y se formulan de una manera adecuada para cada vía de administración.

La proteasa modificada y las sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para la administración por inhalación (tanto a través de la boca como a través de la nariz), administración oral, transdérmica, pulmonar, parenteral o rectal. Para la administración por inhalación, la proteasa modificada puede administrarse en forma de una presentación de pulverizador en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En caso de ser un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para su uso en un inhalador o insuflador, pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo de un compuesto terapéutico y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Para la administración pulmonar a los pulmones, la proteasa modificada puede administrarse en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de un nebulizador, turbonebulizador, o un inhalador oral de dosis medida controlada por un microprocesador con el uso de un propulsor adecuado. Generalmente, el tamaño de partícula del aerosol es pequeño, tal como en el intervalo de 0,5 a 5 micrómetros. En el caso de una composición farmacéutica formulada para la administración pulmonar, típicamente no se usan tensioactivos de detergentes. La administración de fármacos por vía pulmonar es un método propicio, no invasivo, de administración sistémica. Los pulmones representan una vía atractiva para la administración de fármacos, principalmente debido a la gran área superficial para la absorción, al fino epitelio alveolar, a la amplia vascularización, a la ausencia de metabolismo hepático de primer paso y a la actividad metabólica relativamente baja.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar forma de, por ejemplo, comprimidos, píldoras, suspensiones líquidas, o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno fosfato cálcico); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tener forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para la constitución con agua u con otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres grasos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, saporíferos, colorantes y agentes edulcorantes, si fuera apropiado.

Las preparaciones para administración oral pueden formularse para la liberación controlada del compuesto activo. Para la administración bucal las composiciones pueden tener forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de una manera convencional.

Los polipéptidos de proteasa modificada pueden formularse como una preparación de liberación prolongada. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implante (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los compuestos terapéuticos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles, por ejemplo, una sal poco soluble.

La proteasa modificada puede formularse para administración parenteral por inyección (por ejemplo, mediante inyección en embolada o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden tener formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo liofilizado para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes del uso.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para la aplicación local o tópica, tal como para aplicación tópica en la piel (transdérmica) y en las membranas mucosas, tal como en el ojo, y en forma de geles, cremas y lociones y para aplicación ocular o para aplicación intracisternal o intraespinal. Dichas soluciones, particularmente las destinadas para el uso oftálmico, pueden formularse como soluciones isotónicas del 0,01% - 10% y un pH de aproximadamente 5-7 con sales apropiadas. Los compuestos pueden formularse como aerosoles para la administración tópica, tal como mediante inhalación (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 4.044.126, 4.414.209 y 4.364.923, que describen aerosoles para la administración de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma).

La concentración del compuesto activo en la composición farmacológica depende de la tasas de absorción, inactivación y excreción del compuesto activo, del régimen de dosificación y de la cantidad administrada así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Como también se describe en el presente documento, las dosificaciones pueden determinarse empíricamente usando comparaciones de propiedades y actividades (por ejemplo, escisión de una o más proteínas del complemento) de la proteasa modificada en comparación con la proteasa nativa y/o no modificada.

Si se desea, las composiciones pueden presentarse en un envase, en un kit o en dispositivo dosificador, que también contiene una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. En algunos ejemplos, la composición puede aplicarse como un recubrimiento sobre un dispositivo, tal como por ejemplo un tubo o un filtro, por ejemplo, en un aparato de derivación. El envase contiene, por ejemplo, una lámina metálica o de plástico, tal como un envase de tipo blíster. En el envase o dispositivo dosificador pueden adjuntarse instrucciones para la administración. Las composiciones que contienen los agentes activos pueden envasarse como artículos de fabricación que contengan material de envasado, un agente proporcionado en su interior y una etiqueta que indique el trastorno para el cual se proporciona el agente.

También se proporcionan composiciones de moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de proteasa y vectores de expresión que los codifican que son adecuados para la terapia génica. En lugar de administrar la proteína, puede administrarse el ácido nucleico *in vivo*, tal como por vía sistémica o por cualquier otra vía, o *ex vivo*, tal como extrayendo células, incluyendo linfocitos, introduciendo en su interior el ácido nucleico y volviéndolos a introducir en el hospedador o en un receptor compatible.

## 2. Administración de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de proteasa modificada (terapia génica)

Los polipéptidos de proteasa pueden administrarse a las células y a los tejidos mediante la expresión de las moléculas de ácido nucleico. Los polipéptidos de proteasa pueden administrarse como moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de proteasa, incluyendo técnicas *ex vivo* y expresión directa *in vivo*. Los ácidos nucleicos pueden administrarse a las células y a los tejidos mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. El ácido nucleico aislado puede incorporarse en vectores para su posterior manipulación. Los ácidos nucleicos ejemplares son cualquiera de los que codifican o se hibridan, en un medio de alta rigurosidad, con un ácido nucleico que codifica una proteasa armazón o modificada, o una parte catalíticamente activa de la misma, que tiene una secuencia de aminoácidos indicada en una cualquiera de las SEC ID N°: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40-69, 404-418, 419-447, 524-533, 552-659 o 663-710. Las moléculas de ácido nucleico ejemplares que codifican proteasas armazón o modificadas, o partes de las mismas catalíticamente activas, tienen una secuencia de nucleótidos como se indica en una cualquiera de las SEC ID N°: 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 451-523 y 534-543.

Los métodos para administrar los polipéptidos de proteasa mediante expresión de moléculas de ácido nucleico codificantes, incluyen la administración de vectores recombinantes. El vector puede diseñarse para que permanezca en el episoma, tal como mediante inclusión de un origen de replicación o puede diseñarse para integrarse en la célula en el interior de un cromosoma. Los polipéptidos de proteasa también pueden usarse en terapia de expresión génica *ex vivo* usando vectores. Por ejemplo, las células pueden modificarse por ingeniería genética para expresar un polipéptido de proteasa, tal como integrando un ácido nucleico que codifique un polipéptido de proteasa en una

localización genómica, unido operativamente a secuencias reguladoras o de tal manera que se coloca unido operativamente a secuencias reguladoras en una localización genómica. Dichas células pueden después administrarse por vía local o sistémica a un sujeto, tal como a un paciente que necesita el tratamiento. Los vectores ejemplares para la terapia génica *in vivo* y *ex vivo* incluyen vectores virales y vectores no virales, tales como, por ejemplo, liposomas o cromosomas artificiales.

También pueden emplearse vectores virales, que incluyan, por ejemplo, adenovirus, herpes virus, retrovirus EBV, virus SV40, citomegalovirus, vectores del virus de la vacuna y otros diseñados para terapia génica. Los vectores pueden permanecer en el episoma o pueden integrarse en los cromosomas del sujeto tratado. A un sujeto que necesita tratamiento se le administra un virus que puede expresar un polipéptido de proteasa. Los vectores virales adecuados para terapia génica incluyen adenovirus, adenovirus asociados, retrovirus, lentivirus y otros indicados anteriormente. Por ejemplo, la tecnología de expresión con adenovirus es bien conocida en la técnica y los métodos de administración y producción de adenovirus son también muy conocidos. Los serotipos de los adenovirus se encuentran disponibles, por ejemplo, en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD). Los adenovirus pueden usarse *ex vivo*, por ejemplo, las células se aíslan de un paciente que necesita el tratamiento y se transducen con un vector adenoviral que exprese el polipéptido de proteasa. Después de un período de cultivo adecuado, las células transducidas se administran a un sujeto, por vía local y/o sistémica. Como alternativa, las partículas adenovirales que expresan el polipéptido de proteasa se aíslan y se formulan en un transportador farmacéuticamente aceptable para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad o afección de un sujeto. En una realización, la enfermedad a tratar se produce por la activación del complemento. Típicamente, las partículas adenovirales se administran a una dosis que varía de 1 partícula a 10<sup>14</sup> partículas por kilogramo de peso del sujeto, generalmente entre 10<sup>6</sup> o 10<sup>8</sup> partículas a 10<sup>12</sup> partículas por kilogramo de peso del sujeto.

Las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en cromosomas artificiales u otros vectores no virales. Por ingeniería genética pueden modificarse cromosomas artificiales, tal como el ACES (véase, Lindenbaum et al. Nucleic Acids Res. 2004 Dec 7; 32(21):e172) para codificar y expresar la proteasa o la proteasa modificada. En resumen, los cromosomas artificiales de mamíferos (MAC) proporcionan un medio para introducir grandes cargas útiles de información genética en la célula en un formato no integrante, que se replica de forma autónoma. Excepcional entre los MAC, el Sistema de Expresión en Cromosomas Artificiales (ACES), basado en ADN satélite de mamífero, puede generarse de manera reproducible *de novo* en líneas celulares de diferentes especies y purificarse fácilmente a partir de los cromosomas de las células hospedadoras. Después, los ACES de mamífero purificados pueden reintroducirse en una diversidad de líneas celulares receptoras que se han conservado de manera estable durante largos períodos en ausencia de presión selectiva usando un Sistema ACE. Utilizando esta estrategia, se han conseguido cargas específicas de uno o dos genes diana en células LMTK(-) y CHO.

Otro método para introducir ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de proteasa modificada es una técnica de sustitución génica en dos etapas en levaduras, que comienza con un genoma de adenovirus completo (Ad2; Ketner et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6186-6190) clonado en un Cromosoma Artificial de Levadura (YAC) y un plásmido que contiene secuencias de adenovirus para dirigir una región específica en un clon YAC, un casete de expresión para el gen de interés y un marcador de selección positivo y negativo. Los YAC son de particular interés porque permiten la incorporación de genes más grandes. Esta estrategia puede usarse para la construcción de vectores basados en adenovirus que llevan ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los polipéptidos de proteasa modificada descritos para la transferencia génica a células de mamífero o a animales completos.

Los ácidos nucleicos pueden encapsularse en un vehículo, tal como un liposoma, o introducirse en una célula, tal como una célula bacteriana, particularmente una bacteria atenuada o introducida en un vector viral. Por ejemplo, cuando se emplean liposomas, pueden usarse proteínas que se unen a proteínas de la membrana de la superficie celular asociadas con endocitos para dirigir y/o facilitar la captación, por ejemplo, proteínas capsidiales o fragmentos de las mismas tróficas para un tipo celular particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en ciclos y proteínas que dirigen la localización intracelular y potencian la semivida intracelular.

En algunas situaciones es deseable proporcionar una fuente de ácido nucleico con un agente que dirija las células, tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de superficie celular o una célula diana, o un ligando para un receptor sobre una célula diana. Los polinucleótidos y vectores de expresión proporcionados en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier método adecuado. Además se proporcionan vectores de ácido nucleico que contienen moléculas de ácido nucleico como se ha descrito anteriormente. Adicionalmente se proporcionan vectores de ácido nucleico que contienen moléculas de ácido nucleico como se ha descrito anteriormente y células que contienen estos vectores.

Para los métodos *ex vivo* e *in vivo*, las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido de proteasa se introducen en células que son de un donante adecuado o del sujeto a tratar. Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico con fines de terapia incluyen, por ejemplo, cualquier tipo de célula deseada, disponible apropiada para tratar la enfermedad o afección incluyendo, pero sin limitación, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos

T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre hematopoyéticas o progenitoras, tales como, por ejemplo, células madre obtenidas de la médula ósea, de sangre de cordón umbilical, de sangre periférica, de hígado fetal y de otras fuentes de las mismas.

- 5 Para el tratamiento *ex vivo*, las células de un donante compatibles con el sujeto a tratar o las células de un sujeto a tratar se extraen, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al sujeto. El tratamiento incluye la administración directa, tal como, por ejemplo, encapsulada dentro de membranas porosas, que se implantan en el paciente (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.892.538 y 5.283.187). Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas y lípidos catiónicos (por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol) electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano y precipitación con fosfato de calcio. Los métodos de administración de ADN pueden usarse para expresar polipéptidos de proteasa *in vivo*. Dichos métodos incluyen administración de ácidos nucleicos en liposomas y administración de ADN desnudo, incluyendo administración local y sistémica, tal como usando electroporación, ultrasonido y administración con fosfato de calcio. Otras técnicas incluyen microinyección, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas y fusión de esferoplastos.

- 20 La expresión *in vitro* de un polipéptido de proteasa puede relacionarse con la expresión de moléculas adicionales. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido de proteasa puede relacionarse con la expresión de un producto citotóxico tal como en un virus modificado genéticamente o expresado en un virus citotóxico. Dichos virus pueden dirigirse a un tipo de célula particular que sea una diana para un efecto terapéutico. El polipéptido de proteasa expresado puede usarse para potenciar la citotoxicidad del virus.

- 25 La expresión *in vitro* de un polipéptido de proteasa puede incluir unir operativamente un polipéptido de proteasa que codifique una molécula de ácido nucleico con secuencias reguladoras específicas, tal como un promotor específico de células o específico de tejidos. Los polipéptidos de proteasa también pueden expresarse a partir de vectores que infectan y/o se replican específicamente en tipos de células y/o tejidos diana. Los promotores inducibles pueden usarse para regular selectivamente la expresión del polipéptido de proteasa.

- 30 Las moléculas de ácido nucleico, como ácidos nucleicos desnudos o en vectores, cromosomas artificiales, liposomas y otros vehículos pueden administrarse al sujeto mediante administración sistémica, tópica, local u otras vías de administración. Cuando es sistémica e *in vivo*, la molécula de ácido nucleico o vehículo que contiene la molécula de ácido nucleico puede dirigirse a una célula.

- 35 La administración también puede ser directa, tal como mediante la administración de un vector o células que típicamente se dirigen a una célula o tejido. Por ejemplo, las células tumorales y proliferativas pueden ser células dirigidas para la expresión *in vivo* de polipéptidos de proteasa. Las células utilizadas para la expresión *in vivo* de un polipéptido de proteasa también incluyen células autólogas al paciente. Dichas células pueden retirarse de un paciente, introducirse ácidos nucleicos para la expresión de un polipéptido de proteasa y después administrarse al paciente tal como mediante inyección o injerto.

## H. Usos terapéuticos

- 45 Las proteasas terapéuticas tienen muchas ventajas posibles con respecto a las estrategias terapéuticas tradicionales. La principal de estas ventajas es la capacidad de inactivar enfermedades diana de una manera catalítica (es decir, una estequiometría de uno a muchos). Las ventajas diferenciadoras adicionales incluyen (1) inactivación irreversible; (2) baja dosificación; (3) pequeño tamaño molecular; (4) la capacidad de dirigir modificaciones post-traduccionales; (5) la capacidad de neutralizar altas concentraciones de diana; y (6) la capacidad de dirigirse fuera del sitio activo. Como un agente terapéutico, una proteasa debe presentar también las siguientes características: (1) acceder a la diana molecular (extracelular) y (2) poseer suficiente especificidad rigurosa por una diana crítica para una patología. Los polipéptidos de proteasa proporcionados en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de enfermedades.

- 55 Los polipéptidos de proteasa y las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento pueden usarse para el tratamiento de cualquier afección en la que está implicada la activación de la ruta del complemento, particularmente afecciones inflamatorias incluyendo afecciones inflamatorias agudas tales como choque séptico, y afecciones inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide (AR). Las afecciones agudas e inflamatorias pueden manifestarse como una enfermedad mediada por el sistema inmunitario tal como, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria o lesión tisular producida por una inflamación mediada por un complejo inmune. Una afección inflamatoria mediada por el complemento también puede manifestarse como una enfermedad neurodegenerativa o cardiovascular que tiene componentes inflamatorios. Esta sección proporciona usos ejemplares de, y métodos de administración para, proteasas. Estas terapias descritas son ejemplares y no limitan la aplicación de las proteasas. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, métodos de tratamiento de afecciones médicas y fisiológicas descritas e indicadas más adelante. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, métodos de tratamiento de septicemia, artritis reumatoide (AR), glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP), lupus eritematoso, esclerosis múltiple (EM), miastenia grave (MG), asma, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome de distrés respiratorio, lesión tisular

inflamatoria aguda mediada por el complejo inmune (CI), disfunción multiorgánica, enfermedad de Alzheimer (EA), lesiones de isquemia/reperusión producidas por acontecimientos o tratamientos tales como infarto de miocardio (IM), ictus, derivación cardiopulmonar (DCP) o injerto de derivación de arteria coronaria, angioplastia o hemodiálisis, o síndrome de Guillan Barre.

5 El tratamiento de enfermedades y afecciones con proteasas puede efectuarse por cualquier vía de administración adecuada usando formulaciones adecuadas como se describe en el presente documento incluyendo, sin limitación, inyección subcutánea, administración oral y transdérmica. Si fuera necesario, puede determinarse empíricamente o extrapolarse una dosificación, duración y protocolo de tratamiento particulares. Por ejemplo, pueden usarse dosis  
10 ejemplares de polipéptidos de proteasa recombinantes y nativos como punto de partida para determinar dosificaciones apropiadas. Las proteasas modificadas que tienen mayor especificidad y/o selectividad en comparación con una proteasa de tipo silvestre o armazón pueden ser eficaces a cantidades de dosificación y/o frecuencias reducidas. Los niveles de dosificación pueden determinarse basándose en diversos factores, tales como el peso corporal del individuo, salud general, edad, la actividad del compuesto específico empleado, sexo, dieta,  
15 momento de administración, tasa de excreción, combinación farmacológica, la gravedad y transcurso de la enfermedad y la disposición del paciente a la enfermedad y el criterio del médico a cargo del caso. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del hospedador tratado y del modo de administración particular.

20 Tras la mejora del estado del paciente, puede administrarse una dosis de mantenimiento de un compuesto o composiciones, si fuera necesario; y puede modificarse la dosificación, la forma de dosificación o la frecuencia de administración, o una combinación de las mismas. En algunos casos, un sujeto puede requerir tratamiento intermitente a largo plazo tras cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

## 25 **1. Enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmunitario**

Las proteasas y proteasas modificadas descritas en el presente documento, incluyendo pero sin limitación proteasas MT-SP1 modificadas, pueden usarse para tratar enfermedades inflamatorias. Las enfermedades inflamatorias que pueden tratarse con proteasas incluyen enfermedades inflamatorias agudas y crónicas. Las enfermedades  
30 inflamatorias ejemplares incluyen enfermedades del sistema nervioso central (SNC), enfermedades autoinmunitarias, afecciones con hipersensibilidad en las vías respiratorias tales como asma, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, y lesión tisular inflamatoria aguda mediada por el complejo inmune (CI).

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) puede servir como un modelo para la esclerosis múltiple (EM) (Piddlesden et al., (1994) J Immunol 152:5477). La EAE puede inducirse en diversas especies genéticamente susceptibles por inmunización con mielina y componentes de la mielina tales como la proteína básica mielínica, proteína proteolípídica y glucoproteína mielínica oligodendrocitaria (PMO). Por ejemplo, la EAE inducida por PMO recapitula características esenciales de la EM humana incluyendo el transcurso crónico de la enfermedad clínica  
40 reincidente, la triada patohistológica de inflamación, gliosis reactiva y la formación de grandes placas desmielinizadas confluentes. Las proteasas y proteasas modificadas pueden evaluarse en modelos animales con EAE. Las proteasas se administran, tal como mediante inyección intraperitoneal diaria, y la evolución y la progresión de los síntomas se controla en comparación con los animales de control. Los niveles de componentes del complemento inflamatorio que pueden agravar la enfermedad también pueden medirse ensayando la actividad del complemento en suero en un ensayo hemolítico y ensayando la deposición de los componentes del complemento, tal como por ejemplo C1, C3 y C9.  
45

La activación del complemento modula la inflamación en enfermedades tales como artritis reumatoide (AR) (Wang et al., (1995) PNAS 92: 8955). Las proteasas y proteasas modificadas, incluyendo polipéptidos de MT-SP1 modificados, pueden usarse para tratar la AR. Por ejemplo, pueden inyectarse proteasas por vía local o sistémica.  
50 Las proteasas pueden dosificarse diaria o semanalmente. Pueden usarse proteasas PEGiladas para reducir la inmunogenicidad. En un ejemplo, puede inducirse artritis inducida por colágeno (AIC) de tipo II en ratones como un modelo de enfermedad articular inflamatoria autoinmunitaria que es histológicamente similar a la AR caracterizada por sinovitis inflamatoria, formación de tejido fibroso (pannus), y erosión de cartílago y hueso. Para inducir la AIC, puede inyectarse por vía intradérmica en la base de la cola colágeno II de tipo bovino (B-CII) en presencia de adyuvante completo de Freund. Después de 21 días, los ratones pueden reinmunizarse usando un protocolo idéntico. Para examinar los efectos de una proteasa o proteasa modificada, incluyendo polipéptidos de MT-SP1, 3  
55 semanas después de la exposición inicial con B-CII, puede administrarse una proteasa o control por vía intraperitoneal dos veces a la semana durante 3 semanas. Los ratones pueden sacrificarse 7 semanas después de la inmunización inicial para realizar análisis histológicos. Para evaluar el efecto terapéutico de una proteasa sobre la enfermedad establecida, puede administrarse una proteasa diariamente durante un total de 10 días después de la aparición de la artritis clínica en una o más extremidades. El grado de inflamación en las articulaciones inicialmente afectadas puede controlarse midiendo el grosor de las patas usando calibradores. En ambos modelos, puede extraerse suero de los ratones para realizar ensayos hemolíticos y la medición de marcadores del complemento de activación tales como, por ejemplo, C5a y C5b-9. En otro ejemplo, se dispone de modelos con primates para  
60 tratamientos de AR. Puede controlarse la respuesta de articulaciones doloridas e inflamadas en sujetos tratados con polipéptidos de proteasa y controles para evaluar el tratamiento con proteasas.  
65

Las proteasas o proteasas modificadas, incluyendo pero sin limitación polipéptidos de MT-SP1, pueden usarse para tratar lesión tisular inflamatoria aguda mediada por el complejo inmune (CI). La lesión mediada por el CI se produce por una respuesta inflamatoria local contra la deposición de CI en un tejido. La respuesta inflamatoria resultante se caracteriza por edema, neutrofilia, hemorragia y finalmente necrosis tisular. La lesión tisular mediada por CI puede estudiarse en una reacción de Arthus (RPA, reacción de Arthus pasiva inversa, por sus siglas en inglés) *in vivo*. En resumen, en la reacción RPA, en la piel de los animales se inyecta un exceso de anticuerpo (tal como, por ejemplo, IgG de conejo anti-albúmina de huevo de pollo), tal como, por ejemplo, en ratas o cobayas, que previamente han recibido una infusión por vía intravenosa del antígeno correspondiente (es decir, albúmina de huevo de pollo) (Szalai et al., (2000) J Immunol 164:463). Inmediatamente antes de iniciar una reacción RPA, puede administrarse una proteasa, o un control en embolada, al mismo tiempo que el antígeno correspondiente mediante inyección intravenosa a través de la vena femoral derecha. Como alternativa, durante la hora inicial de la reacción RPA puede administrarse una proteasa, comenzando inmediatamente después de la inyección del antígeno y justo antes de la inyección dérmica del anticuerpo. Los efectos de una proteasa sobre la generación de lesión tisular mediada por CI dependiente del complemento pueden evaluarse a diversos momentos después del inicio de la RPA extrayendo sangre para determinar la actividad hemolítica en suero, y recogiendo el área infectada de la piel para cuantificar el tamaño de la lesión.

Las proteasas terapéuticas, tales como las descritas en el presente documento, incluyendo polipéptidos de MT-SP1, pueden usarse para tratar septicemia y septicemia grave que puede dar como resultado un choque letal. Puede usarse un modelo de choque letal mediado por el complemento para ensayar los efectos de una proteasa como un agente terapéutico. En un ejemplo de este tipo, las ratas pueden inducirse con una pequeña cantidad de lipopolisacárido (LPS), seguido por la administración de un anticuerpo monoclonal contra un inhibidor de membrana del complemento (anti-Crry) (Mizuno M et al., (2002) Int Arch Allergy Immunol 127: 55). Puede administrarse una proteasa o control en cualquier momento durante el transcurso del inicio del choque letal, tal como antes de la inducción con LPS, después de la inducción con LPS o después de la administración anti-Crry, y puede evaluarse la recuperación de las ratas del choque letal.

## 2. Enfermedad neurodegenerativa

La activación del complemento agrava la progresión de la enfermedad de Alzheimer (EA) y contribuye a la pérdida de neuritas en cerebros con EA. Las proteasas y proteasas modificadas descritas en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, los polipéptidos MP-SP1 modificados, pueden usarse para tratar la EA. Pueden usarse modelos de ratón que imitan algunas de las características neuropatológicas y conductuales de la EA para evaluar los efectos terapéuticos de las proteasas. Los ejemplos de modelos de ratón transgénicos incluyen la introducción de la proteína precursora amiloidea humana (APP) o la proteína presenilina 1 (PS1) con mutaciones productoras de enfermedades en ratones, bajo el control de un promotor agresivo. Estos ratones desarrollan características de EA incluyendo aumentos en las placas beta-amiloideas y neuritas distróficas. Los ratones dobles transgénicos para proteínas APP y SP1 mutantes desarrollan grandes cantidades de placas beta-amiloideas fibrilares y muestran glía activada y factores del complemento asociados con las placas. Las proteasas pueden administrarse, tal como mediante inyecciones intraperitoneales o intravenosas diarias y, se controla la evolución y progresión de los síntomas en comparación con animales de control.

## 3. Enfermedad cardiovascular

Las proteasas y proteasas modificadas descritas en el presente documento, incluyendo pero sin limitación proteasas MT-SP1 modificadas, pueden usarse para tratar enfermedades cardiovasculares. Las proteasas pueden usarse en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares incluyendo lesión de isquemia-reperusión debida a ictus, infarto de miocardio, derivación cardiopulmonar, injerto de derivación de arteria coronaria, angioplastia o hemodiálisis. Las proteasas también pueden usarse en el tratamiento de la respuesta inflamatoria asociada con una derivación cardiopulmonar que contribuye a la lesión de los tejidos. (Generalmente, una proteasa puede administrarse antes, simultáneamente con o después de un tratamiento o suceso que induce una lesión de isquemia-reperusión mediada por el complemento. En un ejemplo, una proteasa puede administrarse a un sujeto antes del tratamiento del sujeto mediante un suceso de inducción de lesión isquémica mediada por el complemento tal como, por ejemplo, injerto de derivación de arteria coronaria de angioplastia.

Los efectos de una proteasa sobre el tratamiento de lesión de isquemia-reperusión pueden evaluarse en modelos animales de la lesión. En uno de estos modelos, se induce isquemia miocárdica en conejos a los que se había realizado una incisión en su pericardio anterior colocando una sutura de seda de 3-0 alrededor de la arteria coronaria descendiente anterior izquierda (DAI) a una distancia de 5-8 mm desde su origen y apretando la ligadura de forma que el vaso quede completamente ocluido (Buerke et al., (2001) J Immunol 167: 5375). Puede administrarse una proteasa, tal como por ejemplo un polipéptido MT-SP1 modificado, o un vehículo con control tal como solución salina, por vía intravenosa en dosis crecientes como una embolada de 55 minutos después de la oclusión coronaria (es decir, 5 minutos antes de la reperusión). Cinco minutos después (es decir después de un total de 60 minutos de isquemia), puede aflojarse la ligadura DAI y el miocardio isquémico puede reperfundirse durante 3 horas. Al final del periodo de reperusión, la ligadura alrededor de DAI se vuelve a apretar. Los efectos de una proteasa sobre lesión isquémica pueden analizarse evaluando los efectos sobre necrosis miocárdica, niveles de

creatina quinasa en plasma y marcadores de activación de neutrófilos tales como, por ejemplo, actividad mieloperoxidasa y liberación de radicales superóxido.

5 En otro modelo de lesión miocárdica mediada por el complemento basada en perfusión de corazones de ratón aislados con tampón de Krebs-Henseleit que contiene plasma humano al 6%, puede usarse el tratamiento con proteasas o proteasas modificadas para limitar el daño tisular en el corazón. En dicho ejemplo, el tampón usado para perfundir los corazones puede complementarse con dosis diversas de proteasas, tales como, pero sin limitación, proteasas modificadas incluyendo polipéptidos de MT-SP1. Los corazones perfundidos pueden someterse a ensayo para detectar la deposición de C3 y C5b-9 humano, presión de perfusión de arteria coronaria, presión diastólica final y frecuencia cardíaca.

15 Las proteasas y proteasas modificadas tales como, por ejemplo, polipéptidos de MT-SP1 modificados, pueden usarse como agentes terapéuticos antes o después de derivación cardiopulmonar (DCP) o injerto de derivación de arteria coronaria para inhibir la respuesta inmunitaria inflamatoria que a menudo sigue a una derivación y que puede contribuir a la lesión tisular. Puede usarse una recirculación de sangre completa *in vitro* en un circuito de derivación extracorpóreo para estimular cambios plaquetarios y leucocitarios y la activación del complemento inducida por DCP (Rinder et al. (1995) J. Clin. Invest. 96: 1564). En dicho modelo, puede realizarse la adición de una proteasa o proteasa modificada o tampón de control, en diversas dosis, a un envase de transferencia que ya contiene sangre de un donante sano y heparina porcina, justo antes de la adición de la sangre al circuito extracorpóreo. Pueden extraerse muestras de sangre 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos después de la recirculación y someterse a ensayo para realizar estudios del complemento tales como, por ejemplo, ensayos hemolíticos y/o ensayos de activación del complemento para medir C5a, C3a y/o sC5b-9. Como control puede usarse una muestra previa al tratamiento de sangre extraída antes de su adición al circuito extracorpóreo. Puede realizarse citometría de flujo de muestras de sangre para determinar los niveles de moléculas de adhesión en poblaciones de leucocitos circulantes (es decir, neutrófilos) en la sangre, tales como, por ejemplo, niveles de CD11b y P-selectina.

### I. Terapias de combinación

30 Las proteasas de tipo silvestre modificadas pueden usarse en combinación entre sí y con otros fármacos y agentes terapéuticos existentes para tratar enfermedades y afecciones. Por ejemplo, como se describe en el presente documento, varias proteasas pueden usarse para tratar afecciones y enfermedades inflamatorias crónicas y agudas. Dichos tratamientos pueden realizarse junto con otros fármacos antiinflamatorios y/o agentes terapéuticos. Los ejemplos de fármacos antiinflamatorios y agentes útiles para las terapias de combinación incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) incluyendo salicilatos, tales como aspirina, AINE tradicionales tales como ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, nabumetona, piroxicam, diclofenaco o indometacina, e inhibidores selectivos de Cox-2 tales como celecoxib (Celebrex<sup>®</sup>) o Rofecoxin (Vioxx<sup>®</sup>). Otros compuestos útiles en terapias de combinación incluyen antimetabolitos tales como metotrexato y leflunomida, corticosteroides u otros esteroides tales como cortisona, dexametasona o prednisona, analgésicos tales como acetaminofeno, aminosalicilatos tales como mesalamina y agentes citotóxicos tales como azatioprina (Imuran<sup>®</sup>), ciclofosfamida (Cytoxan<sup>®</sup>) y ciclosporina A. Otros agentes que pueden usarse en terapias de combinación incluyen modificadores de la respuesta biológica. Los modificadores de la respuesta biológica pueden incluir inhibidores de citocinas pro-inflamatorias incluyendo inhibidores de TNF-alfa tales como etanercept (Enbrel<sup>®</sup>), infliximab (Remicade<sup>®</sup>) o adalimumab (Humira<sup>®</sup>) e inhibidores de IL-1 tal como anakinra (Kineret<sup>®</sup>). Los modificadores de la respuesta biológica también pueden incluir citocinas antiinflamatorias tales como IL-10, agentes de dirección a las células B tales como anticuerpos anti-CD20 (Rituxmab<sup>®</sup>), compuestos que se dirigen a antígenos T, bloqueadores de moléculas de adhesión, antagonistas de receptores de quimiocinas, inhibidores de quinasa tales como inhibidores de MAP Quinasa, JNK o NFκB y ligandos de PPAR-γ.

50 Las proteasas de tipo silvestre y modificadas también pueden usarse en combinación con agentes que se administran para tratar enfermedades cardiovasculares y/o administrarse durante procedimientos para tratar enfermedades cardiovasculares tales como, por ejemplo, las descritas en el presente documento que contribuyen a afecciones inflamatorias asociadas con lesión de isquemia-reperusión mediada por el complemento. Por ejemplo, las proteasas proporcionadas en el presente documento, tales como proteasas armazón o proteasas modificadas, pueden administrarse en combinación con anticoagulantes. Los ejemplos de anticoagulantes ejemplares incluyen, pero sin limitación, heparina, warfarina, acenocoumarol, fenindiona, EDTA, citrato, oxalato e inhibidores directos de trombina tales como argatrobán, lepirudín, bivalirudín, ximelagatrán.

60 Otros agentes, tales como otros inhibidores del complemento, pueden usarse como fármacos antiinflamatorios en terapia de combinación con las proteasas y proteasas modificadas descritas en el presente documento. Los ejemplos de dichos otros inhibidores del complemento incluyen factor de veneno de cobra (FVC), moléculas polianiónicas tales como heparina, sulfato de dextrano, polivinil sulfato, polilisina o suramina, moléculas naturales tales como K-76COOH, ácido rosmarínico o extracto de la hierba medicinal china *Ephedra*, moléculas sintéticas tales como mesilato de afamastat (FUT-175), un inhibidor sintético de C1s (C1s-INH-248) o un inhibidor contra C1s y fD (BCX-1470), inhibidores peptídicos tales como compstatina, anticuerpos inhibidores del complemento tales como anticuerpos anti-C5 (N19-8), anti-C5 humanizado (h5G1.1), anti-C6 o anti-C8, y formas solubles de reguladores del complemento de membrana tales como CR1 soluble (sCR1), DAF soluble (sDAF), MCP soluble (sMCP) o CD59

soluble (sCD59) (Morgan et al., (2003) Mol Immunol. 40: 159).

Las composiciones farmacéuticas que contienen una proteasa o proteasa modificada descrita en el presente documento pueden usarse para tratar una cualquiera o más enfermedades o afecciones inflamatorias mediadas por la activación del complemento. También se proporcionan combinaciones de una proteasa o proteasa modificada y otro tratamiento o compuesto para el tratamiento de una enfermedad o afección inflamatoria. La proteasa o proteasa modificada y el agente antiinflamatorio pueden envasarse como composiciones individuales para la administración conjunta o secuencial o intermitente. Como alternativa, pueden proporcionarse como una sola composición para la administración o como dos composiciones para la administración como una sola composición. Las combinaciones pueden envasarse como kits, opcionalmente con reactivos adicionales, instrucciones para su uso, viales y otros envases, jeringas y otros elementos para el uso de la proteasa modificada.

## J. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de las realizaciones proporcionadas en el presente documento.

### Ejemplo 1

#### 20 Clonación y mutagénesis de MT-SP1

Se clonó MT-SP1 de tipo silvestre en el vector de expresión bacteriano pQE32 (Qiagen, SEC ID N°: 345) en posición C terminal con respecto al marcador de 6 histidinas usando los sitios de restricción BamB1 y HindIII. La construcción incluía la pro-región, secuencia de activación y dominio proteasa, y contenía los restos 598 hasta el extremo C de la secuencia publicada por Takeuchi et al. (1999) PNAS 96: 11054 y la SEC ID N°: 2 (es decir, correspondiente a los restos 598 a 855 de la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 2). Se generaron mutantes mediante mutagénesis dirigida con Quikchange (Stratagene). En resumen, se estableció una reacción de muestra con PCR que contenía la MT-SP1 de tipo silvestre como molde y cebadores oligonucleotídicos diseñados para contener la mutación deseada (véase la Tabla 21). La reacción PCR fue como se indica a continuación en un volumen de reacción total de 50 µl: 5 µl de tampón de reacción bajo, 1 µl de molde de ADN de MT-SP1 (100 ng/µl), 0,5 µl de cebador directo 50 µM, 0,5 µl de cebador inverso 50 µM, 1,0 µl de dNTP, 41,0 µl de H<sub>2</sub>O y 1,0 µl de ultra Pfu (2,5 unidades/µl). También se realizó una reacción de control en ausencia de cebadores directo o inverso. Las condiciones de la reacción PCR fueron las siguientes: 95 °C durante 30 s, seguido de 18 ciclos a 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 60 s y 72 °C durante 8 min, 24 s. La reacción concluyó con una etapa de elongación a 72 °C durante 10 min seguido por una incubación a 4 °C. Cada producto de la reacción se digirió con DpnI durante 1-2 horas a 37 °C. Para transformar células supercompetentes XL-1 Blue, se utilizaron 1,0 ml de los productos y se sembraron en placas a 2,0 µl y 20,0 µl sobre agar selectivo que contenía carbenicilina 50 µg/ml.

Tabla 21: cebadores de mutagénesis

40

Cebador	Secuencia	SEC ID N°
F97D directo	5'-CACCCCTTCTTCAATGACCACACCTTCGACTATGACATCG-3'	346
F97D inverso	5'-CGATGTCATAGTCTGAAGGTGTCGTCATTGAAGAAGGGGTG-3'	347
F97E directo	5'-CCACCCCTTCTTCAATGAC <b>GAG</b> ACCTTCGACTATGACATCGC-3'	348
F97E inverso	5'-GCGATGTCATAGTCTGAAGGT <b>CT</b> CGTCATTGAAGAAGGGGTGG-3'	349
F97A directo	5'-CACCCCTTCTTCAATGAC <b>GCC</b> ACCTTGGACTATGACATC-3'	350
F97A inverso	5'-GATGTCATAGTCTGAAGGT <b>GG</b> CTCATTGAAGAAGGGGTG-3'	351
F97W directo	5'-CACCCCTTCTTCAATGACT <b>GG</b> ACCTTCGACTATGACATC-3'	352
F97W inverso	5'-GATGTCATAGTCTGAAGGT <b>CC</b> AGTCATTGAAGAAGGGGTG-3'	353
Y146N directo	5'-GGACACACCCAGA <b>AAC</b> GGAGGCACTGGC-3'	354
Y146N inverso	5'-GCCAGTGCCTCC <b>GT</b> TCTGGGTGTGTCC-3'	355
Y146D directo	5'-GGACACACCCAGA <b>GAC</b> GGAGGCACTGGC-3'	356
Y146D inverso	5'-GCCAGTGCCTCC <b>GT</b> CCTGGGTGTGTCC-3'	357
Y146E directo	5'-GGGACACACCCAGA <b>GAG</b> GGAGGCACTGGCG-3'	358
Y146E inverso	5'-CGCCAGTGCCTCC <b>CT</b> CCTGGGTGTGTCCC-3'	359
Y146A directo	5'-GGGACACACCCAGA <b>GCC</b> GGAGGCACTGGCG-3'	360
Y146A inverso	5'-CGCCAGTGCCTCC <b>GG</b> CCTGGGTGTGTCCC-3'	361
Y146W directo	5'-GGGACACACCCAGA <b>TGG</b> GGAGGCACTGGCG-3'	362



Cebador	Secuencia	SEC ID N°
Y146W inverso	5'-CGCCAGTGCCTCCCC <b>ACT</b> GGGTGTGTCCC-3'	363
Y146R directo	5'-GGGGACACACCCAG <b>AGGGG</b> AGGCACTGGCGC-3'	364
Y146R inverso	5'-GCGCCAGTGCCTCCCC <b>CT</b> TGGGTGTGTCCC-3'	365
Q192R directo	5'-TGGACTCCTGCC <b>CGGGG</b> TGATTCCGG-3'	366
Q192R inverso	5'-CCGGAATCACCC <b>CGG</b> CAGGAGTCCA-3'	367
K224A directo	5'-CGCTCAGAGGAAC <b>CGC</b> CCAGGCGTGTACA-3'	368
K224A inverso	5'-TGTACACGCCTGG <b>CGC</b> GTTCTCTGAGCG-3'	369
K224F directo	5'-GCTGCGCTCAGAGGAAC <b>TTCC</b> CAGGCGTGTACACAAG-3'	370
K224F inverso	5'-CTTGTGTACACGCCTGG <b>GAAG</b> TTCCTCTGAGCGCAGC-3'	371

Las secuencias de cada uno de los mutantes de MT-SP1 de dominio proteasa clonados denominados por numeración CB se establecen en cualquiera de las SEC ID N°: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 552-605 o 672-680.

5

### Ejemplo 2

#### Expresión y purificación de MT-SP1

10 Se clonaron la MT-SP1 de tipo silvestre y modificada en el vector de expresión bacteriano pQE32 (Qiagen, SEC ID N°: 345) que contenía un marcador de 6 histidinas en el extremo N, un prodominio y un dominio proteasa como se ha indicado en el Ejemplo 1 anterior y las construcciones resultantes se utilizaron para transformar células *E. coli* BL-21. Las células se cultivaron en cultivos de 100 ml a una DO de 0,6 y la expresión de la proteasa en cuerpos de inclusión se indujo añadiendo IPTG a una concentración final de 1 mM. Después de 4-6 horas, las bacterias se sedimentaron por centrifugación y el sedimento se resuspendió en Tris pH 8 50 mM, KCl 500 mM y glicerol al 10% (tampón A). Las células se lisaron por ultrasonidos y se sedimentaron por centrifugación a 6.000x g. Los sedimentos se resuspendieron en Tris pH 8 50 mM, urea 6 M, NaCl 100 mM y 2-mercaptoetanol al 1% (tampón B). La membrana y los orgánulos se sedimentaron por centrifugación a 10.000x g y el sobrenadante se pasó sobre una columna níquel-NTA (Qiagen). La columna se lavó con Tris pH 8 50 mM, urea 6 M, NaCl 100 mM, imidazol 20 mM, 2-mercaptoetanol al 1% y Tween 20 al 0,01% (tampón D). La columna se lavó de nuevo con tampón D sin Tween 20. Después, la proteasa se eluyó de la columna con Tris pH 8 50 mM, urea 6 M, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol al 1% e imidazol 250 mM (tampón E). Después, la proteasa se concentró a un volumen de ~1 ml y después se dializó a 4 °C durante una noche en 1 l de Tris pH 8 50 mM, urea 3 M, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol al 1% y glicerol al 10%. Finalmente, la proteasa se dializó en Tris pH 8 50 mM, NaCl 100 mM y glicerol al 10% a 4 °C durante una noche. Durante la última etapa de diálisis, la proteasa comenzó a autoactivarse por auto-escisión en la unión entre el prodominio y el dominio proteasa en la secuencia RQAR/VVGG, dando como resultado la retirada del marcador de 6 histidinas y el prodominio.

30

### Ejemplo 3

#### Expresión y purificación de MT-SP1 modificada CB155 en matraces de agitación

35 Se clonaron CB155 y mutantes de serina proteasa humana recombinantes relacionados, así como la proteasa MT-SP1 de tipo silvestre, y se expresaron en *E. coli* como cuerpos de inclusión como se describe en los Ejemplos 1 y 2 anteriores. La producción de MT-SP1 o mutantes se adaptó a escala de laboratorio agrupando hasta 30 matraces de agitación de 1 l para el aislamiento posterior de los sedimentos de los cuerpos de inclusión para solubilización y replegamiento. En resumen, la construcción del plásmido CB155 mutante de MT-SP1 se utilizó para transformar células supercompetentes XL-1 Blue y se recogió una sola colonia nueva y se cultivó en 25 ml de caldo luria (LB; Difco LB Broth, Lennox, formulación aproximada por litro: triptona 10,0 g, extracto de levadura 10,0 g, cloruro de sodio 5,0 g) que contenía carbenicilina 50 µg/ml a 37 °C durante una noche. Se diluyeron diez mililitros del cultivo de una noche en 1 l de LB en un matraz Ultra Yield (2,5 l) y se agitaron a 37 °C a una DO600 de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 0,7 (es decir, se agitaron a 37 °C durante aproximadamente 2 horas). Se añadió IPTG (sin dioxano; Calbiochem) a 1,0 M al cultivo a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteasa en cuerpos de inclusión y el cultivo se agitó durante 4 horas más a 37 °C. El cultivo se recogió por centrifugación a 45 6.000 rpm en un rotor Sorvall n° SLC4000 durante 20 minutos.

50

El sedimento celular del cultivo de 1 l se resuspendió en 50 ml de Tampón de Lavado II (cloruro sódico 300 mM, fosfato potásico 50 mM pH 7,4) y se transfirió a una célula en roseta para el tratamiento con ultrasonidos. Las células se lisaron por ultrasonidos de la siguiente manera: 20 - 50 ml de solución durante 2 minutos, coeficiente de utilización del 30%, rendimiento = 5-6, en hielo, repetido tres veces; +100 ml de solución durante 2 minutos, coeficiente de utilización del 60%, rendimiento = 8, en hielo, repetido seis veces. El lisado sometido a ultrasonidos se

centrifugó a 7.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y los sedimentos se resuspendieron en 40 ml de Tampón de Lavado I (cloruro sódico 300 mM, fosfato potásico 50 mM, pH 7,4, LDAO al 0,5%) por aproximadamente 2,0 gramos de cuerpos de inclusión usando una espátula y agitación vorticial. Los cuerpos de inclusión se centrifugaron a 9.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se lavaron un total de tres veces en Tampón de Lavado I. Las etapas de centrifugación y lavado se repitieron dos veces más en Tampón de Lavado II. Los cuerpos de inclusión lavados se suspendieron en 20 ml de tampón desnaturalizante (clorhidrato de guanidina 6 M, Tris HCl pH 8,0 100 mM, ditiotreitól 20 mM) por aproximadamente 2,0 gramos de cuerpos de inclusión usando una espátula para fragmentar el sedimento y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta que el sedimento se disolvió totalmente o en su mayor parte. Todo el material insoluble se retiró por centrifugación a 9.000 rpm en un rotor Sorvall SLA600TC seguido por resuspensión en tampón 20 ml. La muestra se escurrió lentamente en un vaso de precipitados que contenía un volumen 100X de tampón de replegamiento (Tris HCl pH 8,0 100 mM, NaCl 150 mM, glutatión reducido 5 mM, glutatión oxidado 0,05 M, monoclóhidrato de L-arginina 1,5 M) y se agitó lentamente a 4 °C durante 72 horas. La muestra se diluyó a una concentración final 1 M de arginina/HCl en Tris pH 8,0 50 mM/NaCl 50 mM y después se concentró a aproximadamente 700 ml usando una filtración de flujo cruzado. Después, la muestra se transfirió al VivaFlow (Sartorius, Edgewood NY) y se concentró adicionalmente a un volumen final de aproximadamente 300 ml. La muestra se dializó en Tris pH 8,0 50 mM/NaCl 50 mM (8 l) durante una noche. Se produjo alguna precipitación de la muestra. La muestra se centrifugó a 9.000 rpm para eliminar la precipitación.

La muestra se incubó a temperatura ambiente hasta que se produjo la autoactivación de la proteasa por escisión de la pro-región para liberar la encima madura. La autoactivación se produce durante el proceso de purificación. La actividad se controló mediante SDS-PAGE (un cambio de 3 kilodalton). La actividad también se controló mediante actividad enzimática según se evalúa por escisión de un sustrato fluorogénico. Para medir la actividad enzimática, la proteasa se diluyó de 1:20 veces a 1:100 veces en tampón de ensayo que contenía Tris pH 8,0 50 mM, NaCl 50 mM y Tween-20 al 0,01%. Se mezclaron 5 µl de la proteasa diluida con 50 µl de sustrato Ac-RQAR-AMC 100 µM, y la fluorescencia se midió en un espectrofotómetro de fluorescencia (Molecular Devices Gemini XPS) a una longitud de onda de situación de 380 nm, una longitud de onda de emisión de 450 nm y usando un filtro con un límite ajustado a 435 nm. La actividad se evaluó a lo largo del tiempo a medida que la muestra se dejaba incubar a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 a 72 horas hasta que la actividad se estabilizó. Cuanto más diluidas están las muestras, más tiempo puede necesitarse. Típicamente, se dejó que la proteasa consiguiese una activación >75% antes de la purificación mediante intercambio aniónico.

Una vez estabilizada la actividad, la muestra se dializó en Hepes 50 mM pH 6,5 (8 l) durante una noche. La muestra se filtró y se cargó en una columna SourceQ. Después de cargar sobre la columna SourceQ, la muestra se lavó con 3 volúmenes de columna de tampón A (Hepes 50 mM pH 6,5) y se eluyó con un gradiente de tampón B 0-20% (Hepes 50 mM pH 6,5/NaCl 1 M) sobre 10 volúmenes de columna. Se midió la actividad de cada fracción y las fracciones activas se combinaron y dializaron en PBS durante una noche. La muestra de proteínas se concentró a aproximadamente 5 ml y se añadió benzamidina a una concentración final de 20 mM para inhibir la autólisis de CB155. El rendimiento global de CB155 es típicamente de aproximadamente 15 a 20 mg de CB155/1 l de cultivo celular. Se consiguió un rendimiento de 22 mg/litro de cultivo celular por producción de CB155 a la escala del matraz de agitación. El rendimiento global desde los cuerpos de inclusión a la proteína nativa fue típicamente menor del 10%. En los matraces agitadores, se han conseguido títulos de fermentación de hasta 3 g/l.

La proteína purificada se sometió a ensayo para determinar la actividad específica, pureza y niveles de endotoxina. La actividad específica o cantidad de proteasa activa en cada preparación se determinó mediante titulación del sitio activo por incubación con un inhibidor que se une en el sitio activo de la proteasa funcional a diversas concentraciones seguido por la adición a un sustrato fluorogénico para medir la proteólisis del sustrato. La cantidad de enzima activa se calculó a partir de una representación de la actividad proteasa residual frente a la concentración de inhibidor, en la que el valor de origen corresponde a la concentración de la proteasa activa. En resumen, la proteasa purificada se tituló con ecotin M84R usando el método de Harris et al. (JBC, 1988, 273: 27354-73) titulando una solución madre de tripsina con p-guandino benzoato de 4-metilumbeliferilo (MUGB), y después se tituló una solución madre de ecotin M84R con la tripsina. Finalmente, la proteasa purificada se tituló con solución madre de ecotin M84R. En todos los casos, la proteasa se incubó durante 30 minutos a 30 °C con concentraciones de inhibidor entre 0,1 y 2 veces la concentración esperada de la proteasa. Para representar gráficamente los datos se usaron actividades residuales entre el 30% y el 90% de la actividad proteasa no inhibida. La actividad enzimática se controló a 30 °C en presencia de Ac-RQAR-AMC 40 µM en tampón de ensayo que contenía Tris pH 8,0 50 mM, NaCl 50 mM y Tween-20 al 0,01% (para la actividad de la tripsina, se añadió CaCl<sub>2</sub> 10 mM) en un espectrofluorímetro Gemini XPS (excitación: 380 nm; emisión: 450 nm; límite: 435 nm). La pureza de la preparación de la proteína se evaluó por resolución del producto de la proteína sobre SDS-PAGE seguido por tinción con colorante azul Coomassie. La proteasa madura produjo una sola banda a 25 kD. El nivel de endotoxina en cada preparación se determinó mediante ensayo Chromo-LAL de lisado de amebocitos de Limulus (Associated of Cape Cod) de acuerdo con el protocolo del fabricante con las siguientes modificaciones. La proteasa se diluyó 100 veces en agua de reactivo de LAL (LRW) y se dividió en dos tubos. Se añadió una exposición de 100 unidades de endotoxina (EU)/ml a un tubo y LRW al otro. Después, la muestra se diluyó dos veces en soluciones madre de tal manera que la reacción contenía una concentración final de tosil-lisil-clorometilcetona (TLCK) 5 mM y Tris pH 8,0 10 mM. Cada muestra se incubó dos horas a 37 °C para inactivar la actividad de la proteasa. Las muestras se diluyeron adicionalmente 50 veces y se

sometieron a ensayo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se consideraron válidos si la recuperación de la exposición a la endotoxina estaba entre el 50 y el 150% del valor teórico. La CB155 purificada final típicamente tuvo una pureza >95% mediante SDS-PAGE, una actividad específica >90%, y contenía aproximadamente de 50 a 500 EU/ml de endotoxina.

5

#### Ejemplo 4

##### Fermentación a gran escala de MT-SP1 y mutantes

10 Se ha realizado la fermentación a gran escala de mutantes de MT-SP1 basándose en el protocolo descrito en el Ejemplo 3. Se cultivó durante una noche en medio LB (Difco) un cultivo de 2 litros de colonias de *E. coli* transformadas con MT-SP1 mutante. El cultivo de una noche se sembró en 50 l de fermentación y se cultivó durante aproximadamente 5 horas con agitación a 37 °C hasta que la absorbancia a DO600 alcanzó la fase logarítmica. La expresión de la proteasa en cuerpos de inclusión se indujo con la adición de IPTG a una concentración final de 700

15  $\mu\text{M}$  y la fermentación se continuó durante 4 horas más en un modo semicontinuo. El cultivo se recogió por centrifugación para proporcionar un sedimento celular de peso húmedo de aproximadamente 750 gramos a 1680 gramos. El sedimento celular se resuspendió y se sometió a ultrasonidos en Tris pH 8,0 50 mM, KCl 0,5 M, glicerol al 10%, beta-mercaptoetanol 1 mM a 10 ml de tampón por 1 gramo de sedimento celular. Las condiciones del tratamiento con ultrasonidos fueron pulso: 4s, ausencia de pulso: 6s, 700 W, 30 minutos. El lisado sometido a

20 ultrasonidos se centrifugó a 7.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y los sedimentos se resuspendieron en Tampón de Lavado I (Tris pH 8,0 50 mM, KCl 0,5 M, glicerol al 10%, beta-mercaptoetanol 1 mM, Tween-20 al 0,01%) a 10 ml de tampón por 1 g de cuerpos de inclusión usando una espátula y agitación vorticial. Los cuerpos de inclusión se centrifugaron y se lavaron dos veces. El rendimiento de cuerpos de inclusión fue de aproximadamente 176 a 506 gramos.

25

#### Ejemplo 5

##### Producción de MT-SP1 en *Pichia pastoris*

30 La producción de cantidades de múltiples miligramos del dominio proteasa de MT-SP1 se realizó por fermentación en un fermentador BioFlo 3000 (New Brunswick Scientific, NJ) equipado con un bio-reactor de una capacidad de 3,3 l usando un clon SMD1168/pPIC9K:MTSP1 Sac SCI (Friedrich et al. (2002) J. Biol. Chem., 277: 2160-2168). El medio complejo ZA001 (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, glicerol 40 g/l, sulfato amónico 5 g/l, sulfato cálcico deshidratado 0,2 g/l, sulfato magnésico heptahidrato 2 g/l, sulfato potásico 2 g/l, hexametáfosfato sódico 25

35 g/l, PTM1 4,35 ml/l) se inoculó con 100 ml de un cultivo de una noche del transformante *P. pastoris*. El cultivo se complementó con glicerol al 50% mediante una fase semicontinua y se indujo durante 18-24 horas con metanol controlado al 0,025%.

40 Para purificar la MT-SP1 recombinante secretada en el medio de cultivo, las células y los desechos celulares se eliminaron por centrifugación a 5.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante resultante se decantó, se ajustó a pH 8,0 con NaOH 10 N, y se filtró a través de un cápsula Sartobran 300 0,45 + 0,2  $\mu\text{M}$  (Sartorius). El sobrenadante se concentró a 1 l mediante ultrafiltración usando un cartucho de ultrafiltración de 10 kDa (sistema NC SRT UF con filtro AG/Technologies UFP-10-C-5A), y el tampón se cambió por filtración de flujo cruzado a tampón A (Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, Tween-80 al 0,05%, pH 8,0). La unidad de filtración se aclaró una vez con 1 l de tampón de lavado A, que se combinó con el concentrado.

50 La solución que contenía MT-SP1 concentrada se aplicó sobre una columna de 150 ml de benzamidina que se había equilibrado con tampón A, a un caudal de 8 ml/min. La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de tampón B (Tris-HCl 50 mM, NaCl 1,0 M, Tween-80 al 0,05%, pH 8,0) y se eluyó con 3 volúmenes de columna de tampón C (Tris-HCl 50 mM, L-arginina 1,0 M, Tween-80 al 0,05%, pH 8,0). Las fracciones que contenían actividad MT-SP1 se agruparon y se concentraron a 10 ml usando un concentrador JumboSep (Pall Gelman) y una membrana con un límite de 10 kDa. Una vez concentradas a 10 ml, el tampón se cambió por tampón D ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 125 mM, pH 5,5) y el volumen se ajustó a 5-10 ml. La fracción retenida se retiró y el concentrador se lavó con tampón D, que se añadió al concentrado. El volumen de la muestra total se ajustó a 15 ml.

55

60 La MT-SP1 parcialmente purificada de la columna de benzamidina se hizo pasar a través de una columna de 5 ml Q-sepharose Fast Flow HiTrap (Amersham-Pharmacia Biotech) previamente equilibrada con 15 ml de tampón D. Se recogió el flujo que pasó a través de la columna y se determinó la concentración de la proteína midiendo la DO280 (usando un coeficiente de extinción de 2,012 mg/DO280). Después, la MT-SP1 purificada se desglucosiló añadiendo 0,1  $\mu\text{l}$  de endoglicosilasa H (ProZyme, 5 U/ml) por mg de proteína e incubando durante una noche a 4 °C con una agitación suave seguida por una etapa de purificación de intercambio aniónico posterior (no necesaria para el mutante CB155 de MT-SP1).

65 La conductividad del conjunto desglucosilado se ajustó a 2,0-3,0 mS/cm con  $\text{H}_2\text{O}$  Nanopure y el pH se ajustó a 6,5 (volúmenes finales de aproximadamente 200 a 300 ml). Después, la MT-SP1 se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico cargando directamente sobre un sistema Pharmacia Akta Explorer usando

una columna de intercambio aniónico Source 150 de 7 ml (Amersham-Pharmacia Biotech). La proteína se eluyó en un tampón que contenía HEPES 50 mM, pH 6,5 con un gradiente de NaCl 0-0,33 M sobre 10 volúmenes de columna a un caudal de 6 ml/min. Las fracciones que contenían la proteína se agruparon y se añadió benzamidina a una concentración final determinada por medición de la DO280 y el uso de un coeficiente de extinción teórico de 2,012 mg/DO280.

## Ejemplo 6

### Evaluación de la actividad en plasma

La actividad en plasma de las proteasas de tipo silvestre o modificadas se determinó por escisión del sustrato peptídico Ac-RQAR-AMC, que incluye el sitio de autoactivación de MT-SP1. Se diluyó un microlitro de una solución madre de proteasa 10  $\mu$ M en 9  $\mu$ l de PBST o 9  $\mu$ l de plasma citrado humano reunido (Innovative Research; Sarasota, Florida) (concentración final 1  $\mu$ M). La reacción se incubó durante 5 minutos a 37 °C. Al final de la incubación, se diluyó 1  $\mu$ l de la mezcla de proteasa incubada en 250  $\mu$ l de tampón de ensayo (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM, Tween-20 al 0,01%). A cada pocillo de una placa de microtitulación negra de tipo Nunc se le añadió 1  $\mu$ l del sustrato Ac-RQAR-AMC (6,25 mM en DMSO) y se añadieron 50  $\mu$ l de la mezcla de proteasa incubada diluida. La escisión del sustrato se controló usando un lector de placas de fluorescencia Spectromax tomando mediciones cinéticas con la longitud de onda de excitación a 380 nm y la longitud de onda de emisión a 450 nm. La actividad fraccional de la proteasa se calculó como una proporción de la actividad de la proteasa en plasma dividida entre la actividad en PBST.

Se determinó en paralelo la actividad en plasma de la MT-SP1 de tipo silvestre o un panel de mutantes de MT-SP1 con una evaluación de las proteasas en ensayos hemolíticos (véase el Ejemplo 7 más adelante). Los resultados se indican en la Tabla 23 mostrada más adelante.

## Ejemplo 7

### Ensayos hemolíticos para explorar y titular la actividad proteasa por detección de hemolisis de eritrocitos inducida por el complemento

La actividad funcional del sistema del complemento puede evaluarse usando ensayos hemolíticos tradicionales, que exploran la función de la ruta del complemento total determinando la capacidad de la muestra para lisar eritrocitos. Se incubaron diluciones en serie de la muestra a analizar con eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpos a una temperatura definida. El número de eritrocitos lisados se determina mediante absorbancia espectrofotométrica de la hemoglobina liberada, que tiene una relación lineal con los niveles de proteínas del complemento en el intervalo de lisis del 50%. Los resultados normalmente se expresan como diluciones recíprocas de la muestra necesaria para producir una lisis del 50%. Por tanto, cuando se evalúa la actividad de los componentes de la ruta clásica, puede determinarse un valor de HC<sub>50</sub>. Los ensayos que evalúan la actividad funcional de la ruta alternativa para determinar la HA<sub>50</sub> (la titulación a la cual se produce un 50% de hemolisis) utilizan eritrocitos de cobaya, conejo o pollo como células diana. La activación de la ruta clásica se bloquea por la adición de EGTA y Mg al ensayo hemolítico de la ruta alternativa.

Los ensayos hemolíticos pueden modificarse para determinar el efecto de una proteasa determinada sobre la activación del complemento. La proteasa se incubó con el plasma antes de la coincubación con los eritrocitos. La escisión de los productos del complemento por las proteasas dará como resultado una actividad del complemento disminuida. Incubando el plasma con diluciones en serie de las proteasas, puede determinarse una CI<sub>50</sub>, que es la concentración de proteasa a la cual se consigue la inhibición del 50% de la actividad del complemento.

#### A. Ensayos hemolíticos clásicos

##### 1. Ensayo hemolítico clásico: preincubación con plasma al 20%

a. Para evaluar la activación del complemento después del tratamiento con proteasas, se diluyó plasma humano con citrato sódico como anticoagulante (Innovative Research, Inc.) en PBST a una concentración final del 20% (10  $\mu$ l de plasma en 40  $\mu$ l de PBST) antes de añadir MT-SP1 de tipo silvestre, CB155 o CB42 diluido a una concentración final de 0-1  $\mu$ M. La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. La solución plasmática se diluyó adicionalmente a una concentración final del 0,5% en una solución de eritrocitos de oveja activados con IgG (6,25  $\mu$ l de solución plasmática en 250  $\mu$ l de solución de eritrocitos de oveja, Diamedix (Miami, FL)). La solución se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 minutos y se retiraron 100  $\mu$ l del sobrenadante y se pusieron en una placa de microtitulación transparente de 96 pocillos. La liberación de la hemoglobina de los eritrocitos lisados se controló mediante la lectura de la densidad óptica (DO) a 415 nm. La CI<sub>50</sub>(nM) de hemolisis por la MT-SP1 de tipo silvestre, CB155 y CB42 fue respectivamente de 131 nM, 94 nM y 67 nM.

Se sometió a ensayo un panel de proteasas MT-SP1 modificadas para determinar la inhibición de la hemolisis. Se incubó plasma humano diluido que contenía citrato sódico como anticoagulante con 200 nM de MT-SP1 de tipo silvestre, CB12, CB13, CB31, CB32, CB40, CB41, CB42, CB43, CB44, CB45, CB64, CB66, CB67 y CB155. La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. La solución plasmática se diluyó posteriormente hasta una concentración final del 0,5% en una solución de eritrocitos de oveja activados con IgG y se ensayó la hemolisis como se ha descrito anteriormente. Se determinó el valor HC50. La fracción de hemolisis se determinó comparando el valor CH50 de las proteasas de tipo silvestre o modificadas en comparación con una muestra que no contenía proteasa añadida (control positivo), estableciendo un valor de 1,00 para el factor de hemolisis del control positivo. La Tabla 22 representa la fracción de partida de los valores de hemolisis. Los datos muestran que todas las proteasas ensayadas inhibieron la hemolisis al menos en un 50% en comparación con el control positivo con una hemolisis completamente inhibida en presencia de CB42.

**Tabla 22: Inhibición de Hemolisis por un Panel de Variantes de MT-SP1**

Proteasa	Fracción de Hemolisis
Tipo silvestre	0,14
CB12	0,22
CB13	0,50
CB31	0,51
CB32	0,38
CB40	0,48
CB41	0,32
CB42	0,00
CB43	0,23
CB44	0,48
CB45	0,27
CB64	0,34
CB66	0,44
CB67	0,33
CB155	0,09
Control negativo	0,00
Control positivo	1,00

b. En otro experimento, para evaluar la activación del complemento clásica después del tratamiento con proteasas, se diluyeron inicialmente proteasas en PBST a una concentración de 5,0  $\mu$ M para protocolos de exploración, al mismo tiempo que se usaron diluciones en serie de las proteasas de 50  $\mu$ M a 0,390  $\mu$ M en protocolos para determinar la  $CI_{50}$ . Las proteasas MT-SP1 o modificadas se preincubaron con una concentración final de plasma al 20% en un tubo de 0,2 ml combinando 2  $\mu$ l de la solución de proteasa diluida, 10  $\mu$ l de plasma humano (con citrato sódico como anticoagulante; Innovative Research, Inc.) y 38  $\mu$ l de PBST. Esto dio como resultado una dilución adicional de la proteasa para dar una concentración final de 200 nM de proteasa para el protocolo de exploración y de 2,0  $\mu$ M a 0,0156  $\mu$ M de proteasa para el protocolo  $CI_{50}$ . En los ensayos también se incluyeron un control sin proteasa (10  $\mu$ l de plasma y 40  $\mu$ l de PBST) y un control de fondo (50  $\mu$ l de PBST solamente). La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se añadieron eritrocitos de oveja sensibilizados (Diamedix, Miami, FL) a placas de 96 pocillos de polipropileno a un volumen de 120  $\mu$ l por pocillo, y se mezclaron 3  $\mu$ l de solución de plasma/proteasa en cada pocillo proporcionando una concentración final de plasma del 0,5%. La solución se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos en una centrifugadora de mesa Sorvall para sedimentar las células no fragmentadas y se retiraron 100  $\mu$ l del sobrenadante y se pusieron en una placa de microtitulación transparente de 96 pocillos. La liberación de hemoglobina de los eritrocitos lisados se controló mediante la lectura de la densidad óptica (DO) a 415 nm. La fracción de hemolisis se calculó restando el control de fondo de todos los pocillos, y dividiendo después las muestras experimentales entre el control sin proteasa (control positivo), estableciendo un valor de 1,00 para la fracción de hemolisis del control positivo. La  $CI_{50}$  (nM) de hemolisis por las proteasas se midió representando gráficamente la fracción de hemolisis frente a la concentración de proteasa con un ajuste de curvas logístico de 4 parámetros (software SoftMax Pro,

Molecular Devices, CA).

Se sometió a ensayo un panel de proteasas MT-SP1 modificadas con respecto a la inhibición de la hemólisis mediante la escisión de uno o más de componentes de la ruta clásica del complemento. Se incubó plasma humano diluido que contenía citrato sódico como anticoagulante con una concentración 200 nM o diluciones en serie de 2,0  $\mu\text{M}$  a 0,0156  $\mu\text{M}$  de MT-SP1 de tipo silvestre (CB200), CB12, CB16, CB17, CB20, CB21, CB42, CB43, CB44, CB45, CB66, CB80, CB82, CB155, CB212, CB213, CB214, CB216, CB218, CB219, CB232, CB235, CB238, CB244, CB245, CB251, CB252, CB255, CB257, CB268, CB274, CB331, CB332, CB349, CB350, CB351, CB353, CB357, CB367, CB373, CB377, CB381, CB383, CB385, CB387, CB388, CB403, CB409, CB412, CB413, CB421, CB422, CB423, CB450, CB451, CB458, CB464, CB486, CB487, CB488, CB489 y CB490. La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. La solución de proteasa/plasma se diluyó adicionalmente en eritrocitos de oveja sensibilizados y la hemólisis se sometió a ensayo como se ha descrito anteriormente. Se determinaron la fracción de hemólisis y la  $\text{Cl}_{50}$ . La Tabla 23 representa la fracción de hemólisis a 200 nM (hemólisis Clásica 20 nM) y el valor  $\text{Cl}_{50}$  para cada proteasa (preincubación en plasma al 20%).

## 2. Ensayo hemolítico clásico: preincubación con plasma al 90%

El ensayo hemolítico clásico modificado puede adaptarse adicionalmente para medir la actividad inhibitoria de las proteasas en condiciones más fisiológicas ajustando las concentraciones de plasma y proteasa. Inicialmente, las proteasas se diluyeron en PBST a una concentración de 5,0  $\mu\text{M}$  para protocolos de exploración, mientras que se usaron diluciones en serie de las proteasas de 200  $\mu\text{M}$  a 1,56  $\mu\text{M}$  para protocolos para determinar el valor  $\text{Cl}_{50}$ . Las proteasas MT-SP1 o modificadas se preincubaron con una concentración final de plasma al 90% en un tubo de 0,2 ml combinando 2  $\mu\text{l}$  de la solución proteasa diluida, 18  $\mu\text{l}$  de plasma humano (con citrato sódico como anticoagulante; Innovative Research, Inc.). Esto dio como resultado una dilución adicional de la proteasa para dar una concentración final de 0,5  $\mu\text{M}$  de proteasa para el protocolo de exploración, y de 20  $\mu\text{M}$  a 0,156  $\mu\text{M}$  de proteasa para el protocolo de  $\text{Cl}_{50}$ . En los ensayos también se incluyeron un control sin proteasa (18  $\mu\text{l}$  de plasma y 2  $\mu\text{l}$  de PBST) y un control de fondo (solo 20  $\mu\text{l}$  de PBST). La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. Las mezclas de reacción se diluyeron adicionalmente en plasma al 20% con la adición de 70  $\mu\text{l}$  de PBST. Los eritrocitos de oveja sensibilizados (Diamedix, Miami, FL) se concentraron a 10X sedimentando una alícuota de 3,0 ml, retirando 2,7 ml de tampón y resuspendiendo el sedimento celular en los 0,3 ml de tampón restante. Los eritrocitos sensibilizados concentrados se añadieron a placas de polipropileno de 96 pocillos a un volumen de 12  $\mu\text{l}$  por pocillo. Se añadieron mezclas preincubadas de proteasa/plasma a 6  $\mu\text{l}$  o 60  $\mu\text{l}$  a los eritrocitos para dar una concentración final de plasma del 1% o del 10%, respectivamente, en un volumen final de 120  $\mu\text{l}$  (PBST añadido a un volumen final). La solución se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células no lisadas y se retiraron 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se pusieron en una placa de microtitulación transparente de 96 pocillos. La liberación de hemoglobina de los glóbulos lisados se controló mediante lectura de la densidad óptica (DO) a 415 nm. La fracción de hemólisis se calculó restando el control de fondo de todos los pocillos, y después dividiendo las muestras experimentales entre el control sin proteasa (control positivo), estableciendo un valor de 1,00 para la fracción de hemólisis del control positivo. El valor de  $\text{Cl}_{50}$ (nM) de hemólisis por las proteasas se midió representando gráficamente la fracción de hemólisis frente a la concentración de proteasa con un ajuste de curvas logístico de 4 parámetros (software SoftMax Pro, Molecular Devices, CA).

La MT-SP 1 de tipo silvestre (CB200) y los mutantes de MT-SP1 CB252 y CB377 se sometieron a ensayo para determinar la inhibición de la hemólisis después de la preincubación con plasma al 90%. Las mezclas preincubadas de proteasa/plasma (a una concentración final de proteasa de 20 nM a 2000 nM) se incubaron con eritrocitos sensibilizados a una concentración de plasma final del 1% y del 10% y la hemólisis se evaluó como se ha descrito anteriormente. El valor de  $\text{Cl}_{50}$  de hemólisis se determinó como se ha descrito anteriormente. El valor de  $\text{Cl}_{50}$  de CB200, CB252 y CB377 fue respectivamente de 967 nM, 379 nM y 205 nM.

También se ensayó la MT-SP1 modificada CB450 para determinar la hemólisis inducida por la ruta clásica *in vitro* después de la preincubación con plasma al 90%. Se incubaron mezclas de proteasa/plasma previamente incubadas (a una concentración final de proteasa de 20 nM a 2000 nM) con eritrocitos sensibilizados a una concentración de plasma final del 1% y del 10% y la hemólisis se evaluó como se ha descrito anteriormente. Los resultados muestran que la hemólisis disminuía dependientemente de la dosis de CB450 inducida por plasma al 1% o al 10%, observándose una inhibición de la hemólisis ligeramente mayor después de la inducción por plasma al 1%. Por ejemplo, no se observó hemólisis detectable después de la inducción en plasma al 1% en presencia de una concentración 100 nM o mayor de CB450, mientras que la inducción en plasma al 10% requería una mayor producción de proteasa para conseguir la inhibición completa de la hemólisis (es decir, una concentración de aproximadamente 750 nM o mayor de proteasa CB450).

## B. Ensayo hemolítico alternativo

### 1. Ensayo hemolítico alternativo: preincubación con plasma al 20%

Para evaluar la activación del complemento alternativa después del tratamiento con proteasas, las proteasas se

diluyeron inicialmente en tampón GVB/Mg/EGTA que contenía tampón de gelatina veronal (GVB; Comptech) con  $MgCl_2$  10 mM y EGTA 8 mM. Las proteasas se diluyeron a una concentración de 7,5  $\mu M$  para los protocolos de exploración, mientras que se usaron diluciones en serie de las proteasas de 30  $\mu M$  a 0,2344  $\mu M$  para protocolos para determinar la  $CI_{50}$ . Se preincubaron proteasas MT-SP1 o modificadas con una concentración final de plasma al 20% en un pocillo de una placa de propileno de 96 pocillos combinando 5  $\mu l$  de la solución de proteasa diluida, 15  $\mu l$  de plasma humano (con citrato sódico como anticoagulante; Innovative Research, Inc.) y 55  $\mu l$  de tampón GVB/Mg/EGTA. Esto dio como resultado una dilución adicional de la proteasa para dar una concentración final de proteasa 500 nM para el protocolo de exploración, y una concentración de proteasa de 2,0  $\mu M$  a 0,0156  $\mu M$  para el protocolo de  $CI_{50}$ . En estos ensayos también se incluyeron un control sin proteasa (15  $\mu l$  de plasma y 60  $\mu l$  de GVB/Mg/EGTA) y un control de fondo (solo 75  $\mu l$  de GVB/Mg/EGTA). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, se añadieron 5  $\mu l$  de GVB/Mg/EGTA a la mezcla incubada, seguido por 20  $\mu l$  de solución Alsever con células de pollo lavadas (mezcla al 50% de sangre completa de pollo y solución de Alsever, que contiene anticoagulantes; Colorado Serum Company, CO) proporcionando una concentración plasmática final del 15%. Antes de la adición, la solución de Alsever de pollo se sensibilizó como se describe en el Ejemplo 19 proporcionado más adelante y las células se centrifugaron y lavaron 3 veces en TBS enfriado y se resuspendieron en 10  $\mu l$  de GVB/Mg/EGTA, y se almacenaron en hielo hasta su uso. Las placas se agitaron a 37 °C durante 1 hora. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células no lisadas, y se retiraron 100  $\mu l$  de sobrenadante y se pusieron en una placa de microtitulación transparente 96 pocillos. La liberación de la hemoglobina de los eritrocitos lisados se controló leyendo la densidad óptica (DO) a 415 nm. La fracción de hemolisis se calculó restando el control de fondo de todos los pocillos, y después dividiendo las muestras experimentales entre el control sin proteasa (control positivo), estableciendo un valor de 1,00 para la fracción de hemolisis del control positivo. La  $CI_{50}$  (nM) de hemolisis por las proteasas se midió representando gráficamente la fracción de hemolisis frente a la concentración de proteasa en un ajuste de curvas logístico de 4 parámetros (Software SoftMax Pro, Molecular Devices, CA).

Se sometió a ensayo un panel de proteasas MT-SP1 modificadas para determinar la inhibición de la hemolisis mediante la escisión de uno o más componentes de la ruta del complemento alternativa. Se incubó plasma humano que contenía citrato sódico como anticoagulante con una concentración 500 nM o diluciones en serie de 2,0  $\mu M$  a 0,0156  $\mu M$  de MT-SP1 de tipo silvestre (CB200), CB12, CB16, CB17, CB20, CB21, CB42, CB43, CB44, CB45, CB66, CB80, CB82, CB155, CB212, CB213, CB214, CB216, CB218, CB219, CB232, CB235, CB238, CB244, CB245, CB251, CB252, CB255, CB257, CB268, CB274, CB331, CB332, CB349, CB350, CB351, CB353, CB0357, CB367, CB373, CB377, CB381, CB383, CB385, CB387, CB388, CB403, CB409, CB412, CB413, CB421, CB422, CB423, CB450, CB451, CB458, CB464, CB486, CB487, CB488, CB489 y CB490. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de proteasa/plasma se diluyó adicionalmente en eritrocitos de pollo y la hemolisis se evaluó como se ha descrito anteriormente. Se determinaron la fracción de hemolisis y la  $DI_{50}$ . La Tabla 23 representa la fracción de hemolisis a 500 nM (hemolisis Alternativa 500nM) y la  $CI_{50}$  para cada proteasa (preincubación en plasma al 20%).

**Tabla 23: Evaluación de Hemolisis y Actividad Plasmática por un Panel de Mutantes de MT-SP1**

CB N°	Mutaciones	Hemolisis Clásica 200 nM	Hemolisis Alternativa 500 nM	Hemolisis Clásica $CI_{50}$ (nM)	Hemolisis Alternativa $CI_{50}$ (nM)	Actividad Plasmática
<b>CB200</b>	<b>ts</b>	<b>0,14</b>	<b>0,14</b>	<b>131</b>	<b>545</b>	<b>0,2</b>
CB12	F97D	0,109	0,229	127,15		0,2
CB16	Y146F	0,058	0,049	182,6	204,95	0,23
CB17	L172N	0,198	0,044	211,7	180	0,19
CB20	Q175D	0,106	0,071	125,4	138,4	0,13
CB21	Q175E	0,156	0,047	123,7	81,7	0,16
CB42	Y146E	0,072	0,088	91,6	117,5	0,19
CB43	Y146A	0,195	0,226	160,2		0,07
CB44	Y146W	0,229	0,114	157,33		0,14
CB45	Y146R	0,195	0,297	170,42		0,07
CB66	K224A	0,236	0,097	166,3	102,2	0,24
CB80	R60cD	0,085	0,463	82	367	0,23
CB82	R60cW	0,147	0,48	74,8	283	0,29
CB155	Y146D/K224F	0,09	0,29	94	221	0,36
CB212	Y146N/K224F	0,477	0,538	371,5		0,47
CB213	Y146E/K224F	0,188	0,21	168,5		0,29

<b>CB N°</b>	<b>Mutaciones</b>	<b>Hemólisis Clásica 200 nM</b>	<b>Hemólisis Alternativa 500 nM</b>	<b>Hemólisis Clásica CI<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>Hemólisis Alternativa CI<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>Actividad Plasmática</b>
CB214	Y146A/K224F	0,197	0,32	171,25		0,42
CB216	Q192V/K224F	0,892	0,866	1200		0,47
CB0218	Q192F/K224F	0,975	0,947	1000		0,09
CB219	Y146D/Q192A/K224F	0,929	0,887	1100		0,63
CB232	Y146E/K224L	0,024	0,082	74,8	94,2	0,23
CB235	Y146E/K224A	0,035	0,126	96,7	89,8	0,26
CB238	Y146D/K224L	0,023	0,105	91,4	149,3	0,53
CB244	Y146D/K224R	0,046	0,562	66,08	617,5	0,18
CB245	Y146D/K224N	0,05	0,51	127,84	421,5	0,32
CB251	Y146E/K224R	0,052	0,47	57,57	625	0,19
CB252	Y146E/K224N	0,025	0,405	38,98	451,5	0,27
CB255	Y146E/K224T	0,115	0,84	179,46	580,1	0,55
CB257	Y146E/K224Y	0,032	0,548	118,65	158	0,44
CB268	Q221aD	0,049	0,359	55,3	512	0,2
CB274	G147E	0,102	0,441	80,7	311,5	0,23
CB331	I41D/Y146D/K224L	0,8	0,19	325,15	76,4	0,34
CB332	141E/Y146D/K224L	0,254	0,124	150,05	52,3	0,53
CB349	I41D/Y146D/K224F	0,775	0,188	359,28	110,17	0,61
CB350	I41E/Y146D/K224F	0,729	0,24	284,14	177,07	0,69
CB351	I41T/Y146D/K224F	0,144	0,245	50,31	71,25	0,71
CB353	H143V/Y146D/K224F	0,278	0,193	160,85	461,4	0,26
CB357	141T/Y146D/K224L	0,068	0,203	88,58	126,26	0,41
CB367	Y146D/Q175D/K224R	0,1	0,219	86	146,92	0,31
CB373	Y146F/Q175D/K224R	0,093	0,268	73,48	123,2	0,34
B377	Y146F/Q175D/K224N	0,052	0,284	58,7	102,87	0,61
CB381	Y146D/Q175H/K224L	0,169	0,219	111,55	291,86	0,25
CB383	Y146D/Q1751L/K224L	0,153	0,137	88,03	266,25	0,14
CB385	Y146D/Q175F/K224L	0,184	0,207	123,13	472,11	0,18
CB387	Y146D/Q175W/K224L	0,147	0,115	91,2	224,69	0,25
CB388	Y146D/Q175Y/K224L	0,272	0,194	114,83	317,21	0,23
CB403	Y146D/D217F/K224L	0,262	0,406	152,37	221,09	0,054
CB409	I41A/Y146D/K224F	0,22	0,174	281,2		0,498
CB412	141L/Y146D/K224F	0,165	0,247	262,5		0,547
CB413	I41F/Y146D/K224F	0,222	0,215	251,11		0,446
CB421	I41T/Y14D/Q175D/K224F	0,714	0,271	478,9		0,585
CB422	141T/Y146E/Q175D/K224N	0,05	0,15	50,35		0,511
CB423	I41T/Y146E/K224L	0,061	0,176	180,19		0,221
CB450	I41T/Y146D/G151L/K224F	0,255	0,223	269,14		0,287
CB451	Y146D/Q221aI/K224S	0,147	0,416	130,46	173,07	0,12
CB458	Y146E/Q221aE/K224R	0,136	0,58	93,25	332,95	0,21
CB464	Y146E/Q221aE/K224F	0,02	0,124	52,3	91,15	0,54
CB486	I41T/Y146E/Q175D/K224R	0,014	0,128	43,36		
CB487	I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224N	0,026	0,173	52,87		0
CB488	I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224F	0,086	0,195	72,61		
CB489	I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224L	0,038	0,143	50,56		



CB N°	Mutaciones	Hemolisis Clásica 200 nM	Hemolisis Alternativa 500 nM	Hemolisis Clásica CI <sub>50</sub> (nM)	Hemolisis Alternativa CI <sub>50</sub> (nM)	Actividad Plasmática
CB490	I41T/Y146E/G151L/Q17D/K224R	0,031	0,125	52,63		

## 2. Ensayo hemolítico alternativo: preincubación con plasma al 90%

El ensayo hemolítico alternativo modificado también puede adaptarse para medir la actividad inhibidora de proteasas, tal como, por ejemplo, las que tienen baja actividad, ajustando las concentraciones de plasma y proteasa. Las proteasas se diluyeron inicialmente en GVB/Mg/EGTA a una concentración de 50 µg para los protocolos de exploración, mientras que se usaron diluciones en serie de las proteasas de 200 µM a 1,56 µM para protocolos para determinar la CI<sub>50</sub>. Se preincubaron proteasas MT-SP1 o modificadas con una concentración final de plasma al 90% en un pocillo de una placa de polipropileno de 96 pocillos combinando 2 µl de la solución de proteasa diluida con 18 µl de plasma humano (con citrato sódico como anticoagulante; Innovative Research, Inc.). Esto dio como resultado una dilución adicional de la proteasa para dar una concentración final de proteasa 5,0 µM para el protocolo de exploración y de 20 µM a 0,156 µM para el protocolo de CI<sub>50</sub>. En estos ensayos también se incluyeron un control sin proteasa (18 µl plasma y 2 µl de GVB/Mg/EGTA) y un control de fondo (solo 20 µl de GVB/Mg/EGTA). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, se añadieron 80 µl de GVB/Mg/EGTA a la mezcla de plasma/proteasa incubada seguido por la adición de 20 µl de células de pollo lavadas (descrito anteriormente), para proporcionar una concentración plasmática final del 15%. Las placas se agitaron a 37 °C durante 1 hora. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células no lisadas, y se retiraron 100 µl del sobrenadante y se pusieron en una placa de microtitulación transparente de 96 pocillos. La liberación de la hemoglobina de los eritrocitos lisados se controló leyendo la densidad óptica (DO) a 415 nm. La fracción de hemolisis se calculó restando el control de fondo de todos los pocillos, y dividiendo después las muestras experimentales entre el control sin proteasa, estableciendo un valor de 1,00 para la fracción de hemolisis del control positivo. La CI<sub>50</sub> (nM) de hemolisis por las proteasas se midió representando gráficamente la fracción de hemolisis frente a la concentración de proteasa con un ajuste de curvas logístico de 4 parámetros (software SoftMax Pro, Molecular Devices, CA).

La MT-SP1 modificada CB450 se evaluó con respecto a la hemolisis inducida por la ruta alternativa *in vitro* después de preincubación con plasma al 90%. Se incubaron mezclas de proteasa/plasma preincubadas (a una concentración final de proteasa de 20 nM a 2000 nM) con células de pollo a una concentración plasmática final del 15% y la hemolisis se evaluó como se ha descrito anteriormente. Los resultados muestran que la hemolisis inducida por plasma al 15% disminuía la hemolisis de una manera dependiente de la dosis de CB450, sin observarse hemolisis detectable de los eritrocitos a una concentración de proteasa CB450 500 nM o mayor.

### Ejemplo 8

#### 35 **Detección de hemolisis de eritrocitos inducida por el complemento usando suero empobrecido en complemento**

a. Para evaluar la activación del complemento por factores del complemento purificados tratados en presencia o ausencia de proteasa MT-SP1 de tipo silvestre, CB155 o CB42, se adquirieron factores del complemento C2, C3, C4 y C5 purificados y medio empobrecidos en los factores del complemento C2, C3, C4 y C5 en Quidel. Las proteínas del complemento purificadas (C2, C3, C4 o C5) se incubaron con una concentración 10 nM de proteasa MT-SP1 de tipo silvestre, CB155 o CB42 a 37° C durante 3 horas. La concentración de la proteína purificada usada en la reacción fue de 5 µM. Se midió un microlitro de la reacción junto con un 1 µl del suero empobrecido en complemento apropiado a 100 µl de eritrocitos de oveja sensibilizados y se ensayó para determinar la actividad hemolítica como se describe en el Ejemplo 7 anterior. Se determinaron los valores HC50 de hemolisis. La fracción de hemolisis de las muestras se determinó comparando el valor HC50 de la muestra con las muestras que contenían suero C2 que no contenía proteasa añadida, al que se le asignó un valor de 1,00. La Tabla 24 representa la fracción de partida de los valores de hemolisis. Las proteasas MT-SP1 de tipo silvestre, CB155 y CB42 inactivan C2 y C3, pero no C4 ni C5 según se determina mediante la inhibición de la hemolisis.

**Tabla 24: Hemolisis por Proteínas del Complemento Incubadas con Proteasa Añadidas de Nuevo a Suero Empobrecido en Complemento**

Proteasa	Fracción de Hemolisis
C2	1
C2 + WT	0
C2 + CB155	-0,00104

Proteasa	Fracción de Hemolisis
C2 + CB42	0,071429
C3	1,032325
C3 + WT	0,008342
C3 + CB155	0,07195
C3 + CB42	0,122449
C4	0,957766
C4 + WT	0,970027
C4 + CB155	0,944142
C4 + CB42	1,040816
C5	0,983651
C5 + WT	0,888283
C5 + CB155	0,942779
CB + CB42	1,020408

- b. En otro experimento, se trató un panel de proteínas del complemento en presencia o ausencia de MT-SP1 (CB200), CB252 y CB377 para evaluar las consecuencias de la inactivación de proteínas de complemento purificadas por las proteasas. Se incubaron proteínas del complemento purificadas (todas de Quidel; San Diego, CA) a sus concentraciones en suero fisiológicas (Clq: 180 µg/ml; C2: 25 µg/ml; C3: 1000 µg/ml; C4: 500 µg/ml; C5: 75 µg/ml; C6: 70 µg/ml; C8: 80 µg/ml; C9: 60 µg/ml) en PBST con una concentración 25 nM de proteasa CB200, CB252 o CB377. Se añadió un µl de la reacción a 100 µl de eritrocitos de oveja sensibilizados en presencia de 1 µl de suero que se empobreció para el factor del complemento correspondiente (todos los sueros empobrecidos se adquirieron en Quidel). Como controles, se incluyeron en las reacciones un control sin proteasa, solamente suero empobrecido, y solamente suero normal. Las muestras se incubaron en pocillos de una placa de 96 pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las células se centrifugaron para sedimentar las células no lisadas, y se retiraron 80 µl de sobrenadante y se transfirieron a una placa de microtitulación transparente de 96 pocillos. La liberación de hemoglobina de los eritrocitos lisados se controló leyendo la densidad óptica (DO) a 415 nm.
- Los resultados demostraron que los sueros empobrecidos de control en ausencia de la proteína del complemento purificada correspondiente añadida mostraron una escasa o ninguna hemolisis según la evaluación por la lectura de la DO415, mientras que los sueros normales de control presentaron hemolisis según se evaluó mediante una DO415 de aproximadamente 0,4. Para cada una de las reacciones en las que se añadió de nuevo la proteína del complemento purificado correspondiente a los sueros empobrecidos (control sin proteasa), la lectura de DO415 fue comparable a la observada con los sueros normales. La preincubación de las proteínas del complemento C1q, C3, C4, C5, C6, C7, C8 o C9 con CB200, CB252 o CB377 no mostró hemolisis en comparación con los sueros normales o el control sin proteasa. Por otro lado, la preincubación de C2 con CB200, CB252 o CB377 dio como resultado la inhibición de la hemolisis según se evalúa por una absorbancia DO415 reducida a niveles comparables con el control de sueros empobrecidos.

### Ejemplo 9

#### Visualización de la escisión proteolítica del componente C2 del complemento en plasma humano por transferencia de Western

- a. Para visualizar los productos de escisión proteolíticos, se diluyó plasma humano al 5% en 40 µl de PBST y se añadió CB155, CB200 o CB42 purificadas a una concentración final entre 0 y 500 nM. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se separaron veinte microlitros de la reacción, o C2 del complemento purificado como control (CompTech), mediante SDS-PAGE en un gel de Tris-Glicina al 4-12% a 200 V durante 35 minutos usando un aparato Novex Mini-Cell Surelock (Invitrogen), y después se transfirió a una membrana de PVDF (Invitrogen) usando una celda de transferencia semiseca Transblot SD de Bio-Rad. La membrana se bloqueó durante 1 hora con leche deshidratada al 5% en TBST (solución salina tamponada con Tris con Tween 20 al 1%) seguido de lavado e incubación con una dilución 1:3000 de antisuero de cabra anti-C2 humano (Quidel) en leche deshidratada/TBST al 5% durante una noche a 4 °C. La membrana se lavó de nuevo tres veces en TBST durante 10 minutos en cada lavado y se incubó con de anticuerpo de conejo anti-cabra conjugado con HRP 1:10.000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) en leche deshidratada al 5%/TBST durante una hora a temperatura ambiente. El filtro se lavó tres veces en TBST durante 10 minutos en cada lavado, y el C2 en plasma y los productos de escisión se revelaron con un Sistema de Detección de Transferencia de Western ECL Plus (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La densitometría se realizó en un sistema de formación de imágenes FluorChem (Alpha Innotech Corp.) usando un programa informático AlphaEase FC Fluorchem 8800, versión 3.1.2 (Alpha Innotech Corp.). La

densitometría se uso para determinar la proporción de producto no escindido con respecto al producto escindido. Se determinó que la  $CI_{50}$  de las proteasas para la escisión de C2 era la siguiente: CB200: 15,7 nM; CB155: 18,4 nM; y CB42: 11,9 nM. b. En otro experimento, se comparó la escisión de C2 y C3 por MT-SP1 de tipo silvestre (CB200) y MT-SP1 mutante CB252 y CB377. Se incubaron nueve microlitros de plasma humano citrado (Innovative Research) con 1  $\mu$ l de proteasa para dar una concentración final de proteasa que variaba de 0 a 2000 nM. Las incubaciones se realizaron durante 1 hora a 37 °C. Un microlitro de la reacción proteasa/plasma preincubada se combinó con 10  $\mu$ l (para la evaluación de C2) o 1000  $\mu$ l (para la evaluación de C3) del mismo tampón NuPAGE LDS y reactivo reductor de muestra (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se hirvió durante 5 minutos. En paralelo, se cargaron 10  $\mu$ l de las muestras hervidas en geles en gradiente Bis-Tris NuPAGE del 4-12% (Invitrogen) y se procesaron a 200 V durante 35 minutos usando el aparato Novex Mini-Cell Surelock (Invitrogen) para la separación de las proteínas, seguido por la transferencia a un filtro de membrana de PVDF (Invitrogen) usando una celda de transferencia semiseca Transblot SD de Bio-Rad. Las membranas se bloquearon con leche deshidratada al 5% (Bio-Rad, Hercules, CA) en TBST (solución salina tamponada con fosfato con Tween 20 al 1%) durante 1 hora. Después, las membranas se incubaron con anti-C2 humano de cabra (Quidel) o anti-C3 humano de cabra a 1:2000 en leche deshidratada/TBST al 5% durante una noche a 4 °C. Las membranas se lavaron tres veces en TBST durante 10 minutos y después se incubaron con anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con HRP (Zymed; San Francisco, CA) a 1:2000 en leche deshidratada al 5%/TBST durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron tres veces en TBST durante 10 minutos y se revelaron con el Sistema de Detección de Transferencia de Western ECL Plus (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ). La densitometría se realizó con un sistema de formación de imágenes FluorChem (Alpha Innotech Corp; San Leandro, CA) usando un programa informático Alpha Ease FC Fluorchem 8800, versión 3.1.2 (Alpha Innotech Corp). Los resultados muestran que cada una de CB200, CB252, y CB377 escindía C2 en plasma humano de una manera dependiente de la dosis, mientras que ninguna de las proteasas ensayadas escindía C3 en plasma humano en comparación con control sin proteasa incluso a la concentración de proteasa más elevada (2000 nM). No se observó degradación de C2 mediante transferencia de Western a 500 nM de cada una de las proteasas ensayadas, observándose poco o nada de C2 detectable a una concentración 1000 nM y una degradación completa de C2 evidente a una concentración 2000 nM de las proteasas ensayadas.

### Ejemplo 10

#### 30 Evaluación de hemólisis alternativa y clásica y correlación con la escisión proteolítica del componente del complemento C3 en plasma humano

Se exploró un panel de proteasas a una concentración final de 200 nM (clásica) o 500 nM (alternativa) para determinar sus efectos sobre la hemólisis clásica o la hemólisis alternativa, respectivamente, después de la preincubación con plasma humano como se indica en el Ejemplo 7, A.1 y B.1 como se ha descrito anteriormente. El panel de proteasas que se ensayó incluía la proteasa de tipo silvestre (CB200), CB238, CB331, CB349, CB357, CB367, CB377 y CB387. CB200, CB357, CB367 y CB387 inhibían tanto la hemólisis clásica como la alternativa en diversos grados. CB238 y CB377 mostraron una pequeña inhibición de hemólisis alternativa, pero mostraron una inhibición sustancial de la hemólisis clásica. CB331 y CB349 mostraron poca inhibición de hemólisis clásica, pero mostraron inhibición de la hemólisis alternativa. Los resultados mostraron que CB331, CB349 y CB387 eran selectivos para la escisión de la ruta alternativa en comparación con la ruta clásica.

Los resultados de la hemólisis se correlacionaron con la escisión de C3 en plasma según se evalúa por la visualización de C3 en presencia o ausencia de proteasa. Las muestras de ensayo de hemólisis alternativa también se examinaron mediante transferencia de Western para C3 como se describe en el Ejemplo 9 anterior. De forma coherente con los resultados de hemólisis alternativa, los resultados demuestran que CB331, CB349 y CB387 escinden C3 según se evalúa por la menor cantidad de producto C3 en comparación con la muestra de plasma no tratado con proteasa.

### 50 Ejemplo 11

#### Escisión de componentes del complemento purificados e identificación de sitios de escisión

Para determinar la mayor especificidad de proteasas modificadas por una proteína diana en comparación con una proteasa armazón o de tipo silvestre, se adquirieron factores del complemento C2, iC3 e iC4 purificados de Quidel Corporation (San Diego, CA). Se diluyeron 5  $\mu$ g de cada proteína a una concentración final de 5  $\mu$ M en PBST. Se añadió MT-SP1, CB155 o Factor I a una concentración final de 100 nM y la reacción se incubó a 37 °C durante 5 horas. Se retiró la N-glucosilación por desnaturalización de la proteína y tratamiento con PNGasaF de acuerdo con el protocolo del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA). Las proteínas diana se separaron por SDS-PAGE en un gel de Tris-Glicina en gradiente del 4-12% (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguido por transferencia a una membrana de PVDF. La membrana resultante se tiñó con tinción Azul Brillante de Coomassie R-250 (TekNova, Hollister, CA), se aclaró con metanol al 50% hasta que se resolvió la banda de la proteína y se secó al aire. Los fragmentos proteolíticos se secuenciaron de acuerdo con el protocolo de Edmans por el servicio de estructura molecular de UC Davis para determinar las secuencias de escisión. La Tabla 25 mostrada a continuación representa las secuencias de escisión de proteasa de C2, C3 y C4 humanas. Cuando se produce escisión, se muestran los

sitios de escisión respectivos en C2, C3 y C4, identificados por secuenciación de los productos de escisión, para la proteasa natural Factor I, catepsina K, MT-SP1, y MT-SP1 modificada (CB155). La SEC ID N° respectivas se indican entre paréntesis después de la secuencia.

5 **Tabla 25: Secuencias de Escisión de Proteasa**

		MT-SP1	CB155	Catepsina K	Factor I
<b>C2 Humana</b>		GATR (391) SLGR (392) VFAK (393)	GATR (391) SLGR (392)		
<b>C3 Human</b>	<b>Cadena beta</b>		REFK (394)		
	<b>Cadena alfa</b>	GLAR (395) RLGR (396) AEGK (397)	QHAR (398)	LGLA (399) LSVV (400)	LPSR (388) SLLR (389)
<b>C4 Humana</b>	<b>Cadena beta</b>				
	<b>Cadena alfa</b>	HRGR (390)			HRGR (390)
	<b>Cadena gamma</b>				

### Ejemplo 12

#### 10 **Correlación de la escisión de C2 con la inactivación del complemento: evaluación de la formación de C3 convertasa y hemolisis**

La C3 convertasa se forma por la interacción del complejo C1 con C4 y C2. La activación de la proteasa C1r en el complejo C1 escinde C1s produciendo una proteasa C1s activa. C4 es un sustrato sensible para C1s, por lo tanto se produce como resultado la escisión de C4 en C4a y C4b. La generación de un C4b activo proporciona un sitio de unión para C2, un segundo sustrato para C1s. La escisión de C2 da como resultado la formación de fragmentos C2a y C2b. Después de la escisión por C1s, los fragmentos C4b y C2b se asocian, formando juntos la C3 convertasa de la ruta clásica. El sitio de escisión SLGR presente en C2 es el sitio de activación natural para la escisión de C2 que produce C2a y C2b, mientras que la secuencia de escisión VFAK en C2 está presente dentro del dominio proteasa de C2 en la parte C2a de la molécula. Para evaluar si la escisión de las secuencias de escisión en C2 por MT-SP1 de tipo silvestre o modificada afecta a la activación de C2 y a la formación de C3 convertasa, se evaluó la escisión y se determinaron las consecuencias funcionales de la escisión en un modelo de hemolisis de superficie celular reconstituido *in vitro*.

#### 25 **A. Escisión de C2**

La presencia de los productos de escisión C2a y C2b se evaluó después de la escisión de C2 purificado por MT-SP1 de tipo silvestre (CB200), CB252 o CB377. Para evaluar los productos de escisión después de la incubación de C2 purificado con proteasas, se incubaron 5 µg de C2 purificado (Quidel) solo o con una concentración final 100 nM de CB200, CB252 o CB377 durante 1 hora a 37 °C. Toda la reacción se separó mediante SDS-PAGE en un gel de Tris-Glicina en gradiente del 4-12% (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguido por transferencia a una membrana de PVDF. La membrana resultante se tiñó con tinción Azul Brillante de Coomassie R-250 (TekNova, Hollister, CA), se aclaró con metanol al 50% hasta que se resolvió la banda de la proteína y se secó al aire. Los resultados muestran que en presencia de CB200, CB252 o CB377 100 nM, C2 casi se degradó por completo para producir productos de escisión de aproximadamente 70 kD y 23 kD correspondientes a C2a y C2b, respectivamente. Además, en presencia de CB200 se observó un tercer producto de escisión de aproximadamente 35 kD.

#### **B. Modelo de hemolisis en la superficie de la célula**

La actividad de la proteasa MT-SP1 o modificada sobre la proteína C2 se sometió a ensayo específicamente aislando células en las etapas intermedias de la activación del complemento y exponiéndolas a plasma o proteína tratada con la proteasa. En resumen, los eritrocitos activados se detuvieron en la etapa del complejo C1/C4b usando el método de Nagaki et al (1974, A New Method for the Preparation of EAC14 cell with Human or Guinea-Pig Serum. Journal of Immunological Methods 5: 307-317). Los eritrocitos activados adquiridos (Diamedix Corp) se lavaron tres veces sedimentando las células a 2000 rpm seguido por resuspensión en GGVB-TTHA (GVB<sup>0</sup> al 50% (Diamedix Corp.) + glucosa al 5% + Ca-TTHA 5 mM (partes iguales de CaCl<sub>2</sub> 100 mM con TTHA 100 mM (Sigma)), y después del lavado final se resuspendieron a 5 X 10<sup>8</sup> células/ml y se conservaron en hielo. Las células se mezclaron con 2,5 volúmenes de suero humano normal al 10% (NHS; preparado en GGVB-TTHA e incubado durante 15 minutos a 30 °C para asegurar la quelación de Mg<sup>2+</sup>) y se incubaron durante 5 minutos a 30 °C. La mezcla se lavó dos veces con GGVB-TTHA, se lavó dos veces con GGVB-Ca (GVB<sup>0</sup> al 50% + glucosa al 5% + CaCl<sub>2</sub> 0,3 mM) y se lavó dos veces

con GGVB++ (GVB<sup>0</sup> al 50% + glucosa al 5% + MgCl<sub>2</sub> 1 mM + CaCl<sub>2</sub> 0,15 mM). Después del lavado final, la mezcla celular se incubó durante 2 horas a 37 °C mezclando cada 30 minutos para evitar el exceso de sedimentación de las células. La mezcla celular incubada se lavó una vez en GGVB++, y se resuspendió a 1,5 X 10<sup>8</sup> células/ml. La suspensión se conservó hasta 1 semana a 4 °C.

5 Durante la activación del complemento, el complejo C1/C4b es necesario para escindir C2 que genera C3 convertasa y la activación resultante del resto de la cascada del complemento dando como resultado la formación del complejo de ataque a membrana (CAM) y la lisis celular. Para evaluar las consecuencias de la escisión de C2 por proteasas, se diluyó en serie una solución de proteasa 2X de cualquiera de CB200, CB252, CB377 diluyendo una solución madre de la proteasa a 2 µM en GGVB++ y diluyendo en serie esta solución madre 1:2 a lo largo de 11 pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos opaca (Nunc) para obtener concentraciones finales de proteasa de 0,2 nM a 2000 nM. Se añadió tampón GGVB++ solo al 12º pocillo como control de fondo. Se preparó una solución al 40% de suero empobrecido en C3 (Sigma) por dilución con GGVB++. Se mezclaron cinco microlitros de proteasa 2X diluida en serie (de lo anterior) con 5 µl de suero empobrecido en C3 diluido y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. 10 La reacción se diluyó a 50 µl con GGVB++ y se añadieron 50 µl de células EAC14b (a 1,5 X 10<sup>8</sup> células/ml). La mezcla se incubó durante 6 minutos a 30 °C para preformar el complejo C2. Se añadieron 150 µl de suero empobrecido en C2, diluido 1:10 en GGVB-EDTA (GVB<sup>0</sup> al 50% + glucosa al 5% + EDTA 10 mM) a cada pocillo. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C con agitación suave. La placa se centrifugó a 2000 rpm para sedimentar las células y 100 µl del sobrenadante se transfirieron a una placa de ensayo transparente de 96 pocillos. 15 La liberación de la hemoglobina de los eritrocitos lisados se controló leyendo la densidad óptica (DO) a 415 nm. 20

Los resultados muestran que el suero empobrecido en C3 preincubado con concentraciones en aumento de proteasas (CB200, CB252 o CB377) confería una hemólisis reducida de los eritrocitos que contenían C1/C4b preformado cuando se añadían a suero empobrecido en C2. Los efectos de cada una de las proteasas ensayadas fueron dependientes de la dosis con escasa o ninguna inhibición clara a concentraciones que variaban de 0,2 nM a 10 nM de proteasa, produciéndose una inhibición sucesiva a concentraciones en aumento de proteasa y observándose una hemólisis escasa o nula a concentraciones de proteasa de 800 nM o mayores. Estos resultados sugieren que la preincubación de suero que contiene C2 en presencia de proteasas no imita la escisión de C2 por C1/C4b necesaria para la activación del complemento y la lisis celular. 25 30

### Ejemplo 13

#### Determinación del sitio de escisión inhibitor mediante SDS-PAGE y ensayos hemolíticos emparejados

35 Para correlacionar la escisión de los componentes del complemento por proteasas con inhibición de activación del complemento, se adquirieron factores del complemento purificados de Quidel y CompTech. Se diluyeron 5 µg de cada proteína a una concentración final de 5 µM en PBST. Se diluyó una proteasa armazón o modificada a una concentración final entre 0 y 500 nM. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se retiraron de 0,5 a 1 µg del componente del complemento tratado y se diluyeron a un volumen total de 10 µl con PBST. Esta reacción se 40 mezcló con 250 µl de eritrocitos de oveja activados con IgG y 5 µl de medio empobrecido en el correspondiente factor del complemento a ensayar. La solución se dejó incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 minutos y se transfirieron 200 µl del sobrenadante a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 415 nm para determinar la liberación de la hemoglobina de los eritrocitos lisados. 45

Los 4 a 4,5 µg restantes de la muestra de reacción se desglucosilaron de acuerdo con el protocolo del fabricante para PNGasaF (New England BioLabs). Las muestras se separaron por SDS-PAGE en un gel de Tris-Glicina en gradiente del 4-12% seguido por tinción con azul Brillante de Coomassie. Usando la característica de densitometría en un formador de imágenes Alpha Innotech, se determinó el área de cada banda y se usó para calcular el porcentaje del componente del complemento de longitud completa escindido a lo largo del ensayo y la aparición de todos los productos de degradación principales. 50

### Ejemplo 14

#### 55 Correlación de la escisión de C2 con la inactivación del complemento según se evalúa por hemólisis en suero empobrecido en C2

Se evaluó la consecuencia funcional de la escisión de C2 de la hemólisis mediada por el complemento en SDS-PAGE y en ensayo hemolítico, emparejados, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 13. Para evaluar la 60 activación del complemento por factores del complemento purificados, se adquirieron medios de C2 purificado y empobrecido en C2 de Quidel. Se incubaron de 0,5 a 1 µg de C2 purificado con proteasa CB155 de 10 a 500 nM en un total de 10 µl de PBST durante 1 hora a 37 °C. La reacción entera se añadió a 250 µl de eritrocitos de oveja activados con IgG junto con 5 µl de plasma empobrecido en el factor del complemento C2 a ensayar. La solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 65 minutos y se transfirieron 200 µl del sobrenadante a una placa de microtitulación de 96 pocillos, y se midió la

absorbancia a 415 nm para determinar la liberación de hemoglobina de los eritrocitos lisados.

Para visualizar los productos de escisión proteolíticos, veinte microlitros de la reacción, o complemento C2 purificado como control (CompTech), se separaron por SDS-PAGE en un gel de Tris-Glicina al 4-12% y la proteína total se visualizó mediante tinción del gel con Azul de Coomassie de acuerdo con el protocolo del fabricante. La escisión de C2 se comparó usando densitometría en gel. La escisión de C2 se produjo de una manera dependiente de la dosis, produciéndose una escisión casi completa de C2 a 500 nM de proteasa. Además, el porcentaje de hemólisis disminuyó con concentraciones en aumento de proteasa. La  $CI_{50}$  de CB 155 basada en densitometría de gel de los productos de escisión de C2 fue de 2,2 nM. La  $CI_{50}$  de CB 155 para la hemólisis en suero empobrecido en C2 complementado con C2 tratado con proteasa fue de 17 nM. *In vitro*, se requiere la degradación completa de C2 purificado para la disminución funcional de la hemólisis.

### Ejemplo 15

#### 15 **Detección de C5b-9 (complejo de ataque a la membrana) por ELISA y efectos de MT-SP1 o mutantes sobre la activación del complemento**

##### A. ELISA para C5b-9

Se realizaron ensayos ELISA para C5b-9 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Quidel). En resumen, se rehidrataron placas de microtitulación recubiertas con anticuerpo de captura con SuperBlock (Pierce, Rockford, IL) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron en PBST y se añadieron 20  $\mu$ l de la solución anterior de suero estimulado con complemento, tratado con proteasa, diluida con 80  $\mu$ l de SuperBlock, a los pocillos de una placa de microtitulación. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavaron en PBST. Se añadieron 100  $\mu$ l de la solución de anticuerpo de detección conjugado con HRP y las placas se incubaron durante 1 hora y después se lavaron con PBST. Finalmente, se añadieron 100  $\mu$ l de solución de sustrato y las placas se incubaron durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente para su revelado. Para detener la reacción de revelado, se añadieron 100  $\mu$ l de solución de detención a cada pocillo y la absorbancia se midió a 450/650 nm de acuerdo con el protocolo del fabricante.

##### B. Efectos de la MT-SP1 de tipo silvestre (CB200), CB155 o CB42 sobre la activación del complemento

Para detectar la activación del complemento, se diluyó plasma humano con citrato sódico como anticoagulante (Innovative Research, Inc., Southfield, MI) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a una concentración final del 20% (10  $\mu$ l de suero en 40  $\mu$ l de PBST), a lo que se añadió MT-SP1 de tipo silvestre, CB155 o CB42 a una concentración final de 0-5  $\mu$ M. La solución se incubó a 37 °C durante 15 minutos. La activación de la ruta clásica y la activación de la ruta alternativa se iniciaron mediante la adición de lipopolisacárido (IgG o LPS, respectivamente a una concentración final de 1 mg/ml, Sigma). La reacción se incubó a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se inactivó añadiendo Pefabloc (Roche) a una concentración final de 1 mg/ml y EDTA a una concentración final de 50 mM. Se usaron 20  $\mu$ l de la solución final para el ELISA posterior. El ELISA se realizó como se ha descrito en la parte A anterior.

Se determinó la  $CI_{50}$  de la generación de C5b-9 para cada una de las proteasas. Se determinó que la  $CI_{50}$  después de la activación de la ruta clásica para MT-SP1 de tipo silvestre, CB155 y CB42 era 103 nm, 47 nm y 23 nm, respectivamente. Se determinó que la  $CI_{50}$  después de la activación de la ruta alternativa para MT-SP1 de tipo silvestre, CB155 y CB42 era 195 nm, 84 nm y 41 nm, respectivamente.

### Ejemplo 16

#### 50 **Efectos de MT-SP1 de tipo silvestre (CB200), CB252 o CB377 sobre la activación del complemento en una exploración del sistema del complemento total**

Para evaluar el efecto de las proteasas MT-SP1 o MT-SP1 mutantes en las rutas del complemento clásica, de la MBL o alternativa, se incubaron 9  $\mu$ l de plasma humano citrado (Innovative Research) con 1  $\mu$ l de las proteasas CB200, CB252 o CB377 para proporcionar una concentración final de 1  $\mu$ M de proteasa durante 1 hora a 37 °C. Se evaluó cada una de las reacciones para detectar la activación del complemento usando las rutas clásica, de la lectina, alternativa de exploración del sistema del complemento total de acuerdo con el protocolo del fabricante (WiesLab; Suecia). En este ensayo, los pocillos de las tiras de microtitulación proporcionadas por el fabricante se recubrieron con activadores específicos de las rutas clásica, alternativa o de la MBL (lectina). La reacción se diluyó en el tampón apropiado suministrado por el fabricante para proporcionar la concentración de plasma para cada ruta y la reacción se incubó como define el fabricante. Para la ruta clásica, la muestra de plasma se diluyó en diluyente CP y se dejó a temperatura ambiente durante un máximo de 60 minutos antes del análisis. Para la ruta de la lectina la muestra de plasma se diluyó en diluyente LP y se incubó a temperatura ambiente durante más de 15 minutos pero menos de 60 minutos antes del análisis. Para la ruta alternativa, la muestra de plasma se incubó en Diluyente AP y se dejó a temperatura ambiente durante un máximo de 60 minutos antes del análisis. A las placas de microtitulación,

las muestras se añadieron a 100  $\mu$ l/pocillo por duplicado. La placa se incubó durante 60-70 minutos a 37 °C. Después de la incubación del suero, los pocillos de la placa de microtitulación se lavaron tres veces con 300  $\mu$ l de solución de lavado. Después del lavado final, el exceso de tampón se retiró golpeando ligeramente placa sobre un tejido absorbente. La activación de complemento se evaluó en cada muestra mediante la detección de C5b-9. A cada pocillo se añadieron 100  $\mu$ l del conjugado que contenía anticuerpos contra C5b-9 marcados con fosfatasa alcalina y la placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para desarrollar la reacción, se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l de solución de sustrato y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se detuvo añadiendo EDTA 5 mM a 100  $\mu$ l/pocillo. La observancia se leyó a 405 nm usando un lector de microplaca. La fracción de sC5b-9 generada se determinó comparando el valor de la DO405 de la muestra con el de una muestra de control sin proteasa.

Los resultados demuestran que la fracción C5b-9, generada después de la activación del complemento inducida por las rutas clásica y la de la MBL, se inhibía casi completamente en presencia de cada una de las proteasas ensayadas (CB200, CB252 o CB377). Por otro lado, se observó una escasa o ninguna inhibición de la generación de C5b-9 por cualquiera de las proteasas ensayadas cuando se indujo la activación del complemento por la ruta alternativa. Ya que las rutas clásica y la de la MBL requieren C2, pero no la ruta alternativa, estos resultados sugieren que la inhibición de las rutas clásica y la de la MBL se debe a la escisión de C2. Este resultado coincide con la observación de que cada una de las proteasas ensayadas (CB200, CB252 y CB377) inhiben la hemólisis cuando se preincuban con C2 (véase el Ejemplo 8.b anterior).

### Ejemplo 17

#### Exploración de la escisión preferencial de sustratos SLGR o GLAR frente a RQAR

Las proteasas modificadas que coincidían con los perfiles especificidad deseados, como se determina mediante bibliotecas de sustrato, se sometieron a ensayo usando sustratos peptídicos individuales correspondientes a una secuencia de escisión deseada para determinar la magnitud del cambio en cuanto a especificidad. Se diseñó un sustrato diana nativo: Ac-RQAR-AMC, que incluía el sitio de autoactivación de MT-SP1; y se diseñaron dos secuencias de escisión de sustrato deseadas: Ac-SLGR-AMC (sitio de escisión de C2) y Ac-GLAR-AMC (sitio de escisión de C3).

Los sustratos se diluyeron en una serie de 12 concentraciones entre 1 mM y 2  $\mu$ M en un volumen total de 50  $\mu$ l de tampón de actividad de MT-SP1 en los pocillos de una placa de ensayo de medio área negra de 96 pocillos Costar. La solución se calentó a 30 °C durante 5 minutos y se añadieron 50  $\mu$ l de una solución de proteasa (MT-SP1, CB42 o CB155 de tipo silvestre,) 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 límite establecido a 435 nm. La tasa de aumento en fluorescencia se midió durante 30 minutos tomando lecturas a intervalos de 30 segundos. Se calcularon las constantes cinéticas  $k_{cat}$ ,  $K_m$  y  $k_{cat}/K_m$  (constante de especificidad) representando gráficamente la inversa de la concentración de sustrato frente a la inversa de la velocidad de escisión del sustrato y ajustando a la ecuación de Lineweaver-Burk ( $1/velocidad = (K_m/V_{max})(1/[S]) + 1/V_{max}$ ; en la que  $V_{max} = [E] \cdot k_{cat}$ ). Las proteasas MT-SP1 (CB200), CB42 y CB155 de tipo silvestre escindieron el sustrato Ac-RQAR-AMC a  $1,9 \times 10^6$ ,  $1,8 \times 10^6$  y  $9,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , respectivamente. Las proteasas MT-SP1 (CB200), CB42 y CB155 de tipo silvestre escindieron el sustrato Ac-SLGR-AMC a  $2,0 \times 10^4$ ,  $5,9 \times 10^4$ ,  $3,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , respectivamente. Las proteasas MT-SP1 (CB200), CB42 y CB155 de tipo silvestre escindieron el sustrato Ac-GLAR-AMC a  $6,4 \times 10^4$ ,  $6,3 \times 10^4$  y  $3,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , respectivamente.

### Ejemplo 18

#### Exploración de la escisión de sustratos individuales frente a una proteína de longitud completa

La especificidad de una proteasa de tipo silvestre o modificada por una secuencia de escisión de sustrato frente a una proteína del complemento de longitud completa se determinó comparando la constante de especificidad ( $k_{cat}/K_m$ ) para medir como una proteína particular escinde de bien un sustrato. Se diseñó una secuencia peptídica de escisión de sustrato que contenía una secuencia de escisión de C2: Ac-SLGR-AMC. La constante de especificidad ( $k_{cat}/K_m$ ) de la escisión se determinó como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 17 incubando la secuencia de escisión de sustrato con una proteasa (MT-SP1 (CB200), CB42 o CB155 de tipo silvestre) y se determinó la tasa de aumento en fluorescencia.

Se usaron parámetros cinéticos en gel para determinar la constante de especificidad de la proteína del complemento diana C2. La cinética de escisión de la proteína diana C2 se sometió a ensayo siguiendo por SDS-PAGE el empobrecimiento de la diana en presencia de una pequeña cantidad de proteasa a lo largo de la evolución. Para este ensayo, C2 5 mM se incubó con proteasa (MT-SP1 (CB200), CB42 o CB155 de tipo silvestre) 10 nM en tampón de actividad MTSP a 37 °C durante 5 horas. Se extrajeron alícuotas a los 0, 10, 20, 40, 60, 100, 200 y 300 minutos e inmediatamente se diluyeron y se hirvieron en agente reductor. Las muestras se trataron con PNGasa F (New England BioLabs), se separaron por SDS-PAGE y se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie. Se determinó la

densidad de la banda de la proteína de longitud completa usando el Formador de Imágenes en gel Alpha Innotech. La constante de especificidad,  $k_{cat}/K_m$  se determinó mediante ajuste no lineal de la curva producida representando gráficamente el valor de la densidad integrada frente al tiempo con la siguiente ecuación:

$$5 \quad \text{densidad} = \exp(-1 * \text{tiempo} * [\text{enzima}] * k_{cat}/K_m).$$

Los resultados demuestran que la constante de especificidad de la escisión de una secuencia peptídica de sustrato frente a una proteína de longitud completa por las proteasas siguió un patrón similar. La MT-SP1 de tipo silvestre CB200 mostró constantes de especificidad casi idénticas para la escisión de la secuencia peptídica de sustrato frente a la proteína de longitud completa C2, mientras que CD42 y CB155 mostraron una ligera variación en sus constantes de especificidad. La constante de especificidad de la escisión de la secuencia del sustrato Ac-SLGR-AMC por CB200, CB42 y CB155 fue de  $2,0 \times 10^4$ ,  $5,9 \times 10^4$  y  $3,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , respectivamente. La constante de especificidad de la escisión de la proteína C2 por CB200, CB42 y CB155 fue de  $1,95 \times 10^4$ ,  $3,60 \times 10^4$  y  $7,20 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , respectivamente.

### 15 Ejemplo 19

#### Protocolo de hemolisis en cinomolgo

20 La actividad funcional del sistema de complemento del mono Cinomolgo después de tratamiento con proteasa también puede ensayarse usando ensayos hemolíticos modificados.

##### A. Sensibilización de eritrocitos de pollo

25 Se aislaron eritrocitos de pollo de Alsevers de Pollo (mezcla al 50% de sangre completa de pollo y solución de Alsevers, que contiene anticoagulantes; Colorado Serum Company, CO). Las células se resuspendieron pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo hasta no haber ningún sedimento celular visible y 50  $\mu\text{l}$  de las células se diluyeron en tampón GVB++ 1 ml. El volumen de las células se graduó, según fuera necesario, para cada experimento suponiendo que 10  $\mu\text{l}$  por pocillo de la suspensión final de 1 ml se añadiría a cada pocillo de manera que una dilución de 50  $\mu\text{l}$  de células era suficiente para una placa. Las células se lavaron sedimentando las células a 2500 rpm en una centrifugadora de mesa a 4 °C durante 1 minuto, el sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en GVB++ 1 ml pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo. Las etapas de lavado se repitieron dos veces más o hasta que el sobrenadante fue totalmente transparente tras el último centrifugado. Se añadió 1  $\mu\text{l}$  de anticuerpo anti-eritrocito de pollo (industrias Fitzgerald) para sensibilizar las células. Después de mezclar la suspensión anticuerpo-célula, la solución se incubó en hielo durante un mínimo de 15 minutos, después se centrifugó a 2000 rpm en una centrifugadora de mesa a 4 °C durante 2 minutos. El sobrenadante se desechó y las células sensibilizadas se resuspendieron en GVB++ 1 ml y se lavaron 2 veces más por centrifugación a 2000 rpm durante un minuto hasta que el sobrenadante fue transparente. Después del lavado final, el sedimento celular se resuspendió en un volumen final de GVB++ 1 ml y las células se diluyeron 10:50 en GVB++ (es decir, 1 ml de células sensibilizadas resuspendidas 5 ml GVB++ para un volumen total de 6 ml). La sensibilización de las células de pollo con anticuerpo se realizó de nuevo el día del experimento. Las células sensibilizadas no se conservaron durante una noche.

##### 45 B. Ensayo de hemolisis de experimentos farmacodinámicos (PD) *in vivo*

Las reacciones de hemolisis se prepararon a una concentración final de plasma al 1%, 2,5% y 10% para cada muestra de plasma obtenida de animales tratados con proteasa o con control con vehículo (sin proteasa) en presencia de eritrocitos sensibilizados. Para cada muestra también se prepararon en paralelo controles de absorbancia que no contenían eritrocitos sensibilizados concentrados añadidos. Todas las reacciones se prepararon en placas opacas con huecos señalados. Para las muestras de plasma al 1%, las muestras de hemolisis (por duplicado) se prepararon con 10  $\mu\text{l}$  de eritrocitos sensibilizados, 89  $\mu\text{l}$  de GVB++ y 1  $\mu\text{l}$  de plasma de animales tratados o no con proteasa; y los controles de absorbancia correspondientes se prepararon con 99  $\mu\text{l}$  de GVB++ y 1  $\mu\text{l}$  de plasma de animales tratados con proteasa. Para las muestras de plasma al 2,5%, las muestras de hemolisis (por duplicado) se prepararon con 10  $\mu\text{l}$  de eritrocitos sensibilizados, 87  $\mu\text{l}$  de GVB++ y 2,5  $\mu\text{l}$  de plasma de animales tratados o no con proteasa y los controles de absorbancia correspondientes se realizaron con 97  $\mu\text{l}$  de GVB++ y 2,5  $\mu\text{l}$  de plasma de animales tratados con proteasa. Para las muestras de plasma al 10%, las muestras de hemolisis (por duplicado) se prepararon con 10  $\mu\text{l}$  de eritrocitos sensibilizados, 80  $\mu\text{l}$  de GVB++ y 10  $\mu\text{l}$  de plasma de animales tratados con o sin proteasa; y los controles de absorbancia correspondientes se prepararon con 90  $\mu\text{l}$  de GVB++ y 10  $\mu\text{l}$  de plasma de animales tratados con plasma. Las placas se incubaron con agitación a 37 °C durante 30 minutos. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células no fragmentadas y se extrajeron 80  $\mu\text{l}$  de sobrenadante y se colocaron en una placa de microtitulación de fondo redondo transparente de 96 pocillos. Esto se realizó con cuidado de que las muestras a veces eran gelatinosas. Las muestras que eran gelatinosas se percibían. Las placas a las que se había transferido sobrenadante se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos para eliminar las burbujas. La centrifugación se repitió hasta que desaparecieron las burbujas o, como alternativa, las burbujas que quedaban se pinchaban con una aguja de 18G. La liberación de hemoglobina de



los eritrocitos lisados se controló fotométricamente leyendo la absorbancia a 415 nm sobre un Lector Bio-Rad Microplate Modelo 680. Si la absorbancia era mayor de 1, las placas se diluían 1:3 en GVB++ y se leían de nuevo (es decir 20 µl de muestra en 40 µl de GVB++). La fracción de hemolisis se calculó restando la absorbancia de las muestras de control de la absorbancia de los pocillos de hemolisis correspondientes, dividiendo después las muestras experimentales entre la muestra de control con vehículo sin proteasa. Los valores DE50 se determinaron representando gráficamente el valor de la DO415 nm en función de la concentración de la proteasa.

### C. Ensayo de titulación de hemolisis *in vitro*

Para una titulación *in vitro* de las proteasas usando plasma de mono cinomolgo, se incubaron proteasas al 10% del volumen de reacción final con plasma de mono cinomolgo adquirido (es decir, en placas de polipropileno de 96 pocillos, a 18 µl de plasma de mono cinomolgo se añadieron 2 µl de la solución de proteasa) para proporcionar concentraciones finales de proteasa que variaban de 20 µM a 0,156 µM para el protocolo de titulación de CI<sub>50</sub> y una concentración plasmática del 90%. En los ensayos también se incluyeron controles sin proteasa (18 µl de plasma y 2 µl de GVB/Mg/EGTA) y de fondo (solo 20 µl de GVB/Mg/EGTA). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la preincubación de la proteasa con plasma al 90%, la hemolisis se realizó como se describe en la parte B anterior. No se incluyeron controles de absorbancia en la titulación de hemolisis *in vitro*.

#### Ejemplo 20

20

#### Protocolo de hemolisis en ratón

### A. Ensayo de hemolisis de experimentos farmacodinámicos (PD) *in vivo*

La actividad funcional del sistema del complemento de ratón después de tratamiento con proteasa también puede evaluarse usando ensayos hemolíticos modificados. Los eritrocitos usados en los protocolos de hemolisis de ratón también eran eritrocitos de pollo que se sensibilizaron como se ha descrito en el Ejemplo 19, parte A anterior. Las reacciones de hemolisis se prepararon a una concentración final de plasma al 40% para cada muestra de plasma obtenida de los animales tratados con plasma o animales tratados con control con vehículo (sin proteasa) en presencia de eritrocitos sensibilizados. También se prepararon controles de absorbancia que no contenían eritrocitos sensibilizados concentrados añadidos en paralelo para cada muestra a la mitad de la concentración plasmática (plasma al 20%), de tal manera que los valores del control de absorbancia se restaban dos veces de los valores de hemolisis durante el análisis como se indicado más adelante. Las muestras de hemolisis se prepararon por duplicado (si había suficiente plasma) en placas opacas con huecos añadiendo a cada pocillo 60 µl de eritrocitos sensibilizados concentrados y 40 µl de plasma de animales tratados o no con proteasa. El control de absorbancia correspondiente se preparó añadiendo a cada pocillo 80 µl de GVB++ y 20 µl de plasma de ratón de animales tratados o no con proteasa. Las placas se incubaron con agitación a 37 °C durante 1 hora. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células no fragmentadas y se extrajeron 50 µl del sobrenadante y se colocaron en una placa de microtitulación de fondo redondo transparente de 96 pocillos. Esto se realizó cuidadosamente ya que las muestras a veces eran gelatinosas. Las muestras que eran gelatinosas se percibían. Las placas transferidas con sobrenadante se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos para eliminar las burbujas. Las placas a las que se había transferido el sobrenadante se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos para eliminar las burbujas. La centrifugación se repitió hasta que desaparecieron las burbujas o, como alternativa, las burbujas que quedaban se pinchaban con una aguja de 18G. La liberación de hemoglobina de los eritrocitos lisados se controló fotométricamente leyendo la absorbancia a 415 nm. Si la absorbancia era mayor de 1, las placas se diluían 1:3 en GVB++ y se leían de nuevo (es decir 20 µl de muestra en 40 µl de GVB++). La fracción de hemolisis se calculó restando la absorbancia 2X de la absorbancia de las muestras de control de los pocillos de hemolisis correspondientes, dividiendo después las muestras experimentales entre la muestra de control con vehículo sin proteasa. Los valores DE50 se determinaron representando gráficamente el valor de la DO415 nm en función de la concentración de la proteasa.

### B. Ensayo de titulación de hemolisis *in vitro*

Para una titulación *in vitro* de las proteasas usando plasma de ratón, se incubaron proteasas al 10% del volumen de reacción final con plasma de ratón adquirido o plasma de control interno (es decir, en placas de polipropileno 96 pocillos, a 18 µl de plasma se añadieron 2 µl de la solución de proteasa) para proporcionar concentraciones finales de proteasa que variaban de 20 µM a 0,156 µM para el protocolo de titulación de CI<sub>50</sub> y una concentración plasmática del 90%. En los ensayos también se incluyeron controles sin proteasa (18 µl de plasma y 2 µl de GVB/Mg/EGTA) y de fondo (solo 20 µl de GVB/Mg/EGTA). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la preincubación de la proteasa con plasma al 90%, la hemolisis se realizó como se describe en la parte A anterior. No se incluyeron controles de absorbancia en la titulación de hemolisis *in vitro*.

**Ejemplo 21****Ensayo ELISA para detectar la deposición de C3b de la ruta clásica**

Para detectar y cuantificar la deposición de C3b, placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) se revistieron con 100  $\mu$ l/pocillos de ovoalbúmina al 0,5% durante 2 horas a 37 °C o durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron 3 veces con PBST 250  $\mu$ l usando SkanWasher 300 de Molecular Devices SkanWasher Versión B. Las placas se revistieron con 100  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo de conejo anti albúmina de huevo de pollo (MP Biomedicals) diluido 1:1000 en PBS. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C antes de lavarse tres veces con PBST. Las placas se bloquearon con Tampón de Bloqueo 200  $\mu$ l (Solución de BSA al 30%; Serologicals), y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar 3 veces con PBST, a cada pocillo se añadieron 100  $\mu$ l de muestra de plasma, diluida al porcentaje deseado (es decir, 1%, 10%) en GVB++ (solución salina-Veronal (barbital), pH 7,4, que contenía NaCl 142 mM, solución Veronal 4,9 mM, gelatina al 0,1%, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM; Comptech), y las placas se agitaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST. A los pocillos se añadió anticuerpo de cabra anti- C3b humano (Quidel) diluido 1:4000 en tampón de bloqueo a un volumen de 100  $\mu$ l y las placas se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBST, a los pocillos se añadieron 100  $\mu$ l de anticuerpo de conejo anti-cabra conjugado con HRP (Zymed) diluido 1:8000 en tampón de bloqueo y se dejó incubar durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con PBST y el ensayo ELISA se reveló, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, por adición de sustrato TMB 100  $\mu$ l (Pierce). La reacción se detuvo por adición de 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M y la absorbancia se leyó a 405 nm en un lector de placa SpectraMax M5 (Molecular Devices).

**Ejemplo 22****Análisis farmacodinámico (PD) de proteasa de ratón****A. Farmacodinámica de CB450**

Por vía intravenosa, a los ratones (n=6 por cada dosis), se les inyectó una dosis en embolada de CB450 a diversos intervalos de dosificaciones (0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg y 15 mg/kg). Se extrajo plasma de los ratones tratados 5 minutos después de la inyección por punción cardiaca. La actividad del complemento de las muestras de plasma de los diferentes grupos de tratamiento se sometió a ensayo utilizando el ensayo de hemolisis descrito en el Ejemplo 20 o el ensayo de deposición de C3b determinado por ELISA para C3b descrito en el Ejemplo 21.

Los resultados del experimento de hemolisis mostraron que hubo una disminución, dependiente de la dosis, de eritrocitos inducida por plasma de ratón de los ratones tratados con CB450 según los niveles de absorbancia a 415 nm. sometidos a ensayo. En este ensayo, las muestras de plasma de los ratones tratados sin proteasa indujeron una hemolisis, según evaluación de absorbancia a 415 nm, de aproximadamente 0,23, que disminuyó a aproximadamente 0,1 en el grupo de tratamiento con 2,5 mg/kg de CB450, con escasa o ninguna señal de absorbancia detectable medida en las muestras de los ratones tratados con 5, 20 o 15 mg/kg de CB450.

Utilizando plasma al 1% o al 10% de cada uno de los grupos de tratamiento, se realizó un ensayo ELISA para C3b. La fracción de hemolisis de las muestras tratadas sin proteasa se estableció a 1,0 y la fracción de hemolisis de todas las muestras experimentales se determinó de acuerdo con esto. Por tanto, para ambas muestras de plasma del 1% y 10% de los ratones tratados sin proteasa, la fracción de la deposición de C3b que se midió fue de 1. Los resultados del ensayo ELISA para C3b en las muestras de plasma al 10% mostraron que el plasma de los ratones tratados con dosis en aumento de CB450 no mostraban diferencias medibles en los niveles de C3b a dosis de CB450 de 2,5, 5 o 10 mg/kg en comparación con la muestra tratada sin proteasa, sin embargo, los ratones tratados con 15 mg/kg mostraron una fracción disminuida de la deposición de C3b que se midió que era de 0,40. Los resultados del ensayo ELISA para C3b en muestras de plasma al 1% mostraron que el plasma de los ratones tratados con CB450 tenía una disminución, dependiente de la dosis, en la fracción de la deposición de C3b en comparación con la muestra de plasma tratada sin proteasa, lo que era coherente con los resultados observados en el experimento de hemolisis. Las muestras de plasma de los ratones tratados con 2,5 mg/kg de CB450 mostraron una deposición de C3b disminuida que se midió que era de 0,40, mientras que el plasma de los ratones tratados con 5, 20 o 15 mg/kg de CB450 mostraron escasa o ninguna señal detectable de C3b.

**B. Farmacodinámica de un panel de mutantes de proteasa MT-SP1**

Por vía intravenosa se inyectó a los ratones una dosis en embolada de concentraciones en aumento de un panel de mutantes de MT-SP1 incluyendo CB200 (tipo silvestre), CB235, CB245, CB252, CB255, CB257, CB268, CB351, CB377, CB409, CB422, CB450, CB464 y CB473. El plasma se extrajo de los ratones tratados 5 minutos después de la inyección por punción cardiaca. La actividad del complemento de las muestras de plasma de los diferentes grupos de tratamiento se sometieron a ensayo mediante ensayo de hemolisis como se ha descrito en el Ejemplo 19 o mediante deposición de C3b como se determina mediante un ensayo ELISA de C3b (ensayado en plasma al 1% y 10%) como se describe en el Ejemplo 20. Los resultados se representaron gráficamente en función de la

concentración de proteasa para determinar los valores de DE50. En la siguiente Tabla 26 se representa un resumen de los resultados. La Tabla también indica la dosis máxima tolerada (DMT) de proteasa y el índice terapéutico (IT) calculado como la proporción de DMT con respecto al valor de DE50. Los resultados muestran diferencias en la eficacia *in vivo* de algunas de las proteasas sometidas a ensayo.

PROTEASA	DMT (mg/kg)	Hemolisis (DE50; mg/kg)	IT de Hemolisis	C3b en plasma al 1% (DE50; mg/kg)	IT de C3b (plasma al 1%)	C3b en plasma al 10% (DE50; mg/kg)	IT de C3b (plasma al 10%)
CB200	10	6,4	1,56	2,7	3,7	13,5	0,74
CB238	15	9,4	1,6	6,1	2,46	16,2	0,92
CB245	10	2,4	4,1	2,63	3,8	>10	0
CB252	12,5	5,7	2,19	3,8	3,29	9,9	1,26
CB255	7	5	1,4	2,78	2,52	>7	0
CB257	5	3,1	1,6	4,86	1,03	>5	0
CB268	10	9,9	1	5,45	1,8	>10	0
CB351	10	6,6	1,52	5,8	1,72	10,8	0,93
CB377	15	8,6	1,75	2,6	5,77	6,2	2,42
CB409	15	8,2	1,8	3,2	4,65	17,99	0,83
CB422	12,5	10,25	1,22	3,82	3,27	20,36	0,61
CB450	15	1,8	8,5	3,5	4,3	15,9	0,9
CB464	15	7,72	1,94	5,07	2,96	33,1	0,45
CB473	12,5	14,25	0,86	1,95	6,41	8,01	1,56

5

### Ejemplo 23

#### Análisis farmacodinámico (PD) de proteasas en la rata

##### 10 A. CB252 y CB377

Por vía intravenosa se inyectó a las ratas una dosis en embolada de CB252 (23 mg/kg) seguido de infusión durante 1 hora a 3,3 mg/kg/h o una dosis en embolada de CB377 (18 mg/kg) seguido de infusión durante 1 hora a 1,8 mg/kg/h. En el estudio también se incluyeron ratas tratadas con un control con vehículo. Después de la inyección se extrajo el plasma a diversos momentos (siendo t=0 pre-inyección; es decir 0, 5, 15, 30, 60 o 120 minutos) y se analizó para determinar la actividad del complemento sometiendo a ensayo la escisión de C2 por Transferencia de Western como se indica en el Ejemplo 9 (excepto que solo se usaron 1,5  $\mu$  de plasma) y la hemolisis usando el protocolo de hemolisis para el mono *Cinomolgo* indicado en el Ejemplo 19 usando plasma de rata al 1% o al 10%.

20 Los resultados mostraron un escisión aumentada de C2 en plasma de las ratas tratadas con CB252 y CB377. CB252 mostró una mayor escisión de C2 ya que se detectó poco C2 en las muestras de plasma ensayadas por Transferencia de Western incluso solo 5 minutos después de la inyección, sin detectarse la presencia de C2 a los 60 o 120 minutos después de la inyección. CB377 también mostró niveles de C2 disminuidos en comparación con el control con vehículo en los primeros momentos, sin embargo, a los 60 y 120 minutos los niveles de C2 fueron comparables con los de las muestras de control con vehículo.

30 Los resultados de la hemolisis inducida por el plasma al 10% de las ratas tratadas mostraron que el plasma de CB377 no tenía efecto sobre la inhibición de la hemolisis en comparación con el control con vehículo, mientras que el plasma de CB252 mostró una notable inhibición de la hemolisis. Las muestras de plasma de las ratas tratadas con CB252 recogidas 5, 15, 30 y 60 minutos después de la inyección, mostraron una hemolisis de escasa a no detectable. La hemolisis aumentó a niveles comparables a los del control con vehículo en el plasma de los ratones tratados con CB252 en los últimos momentos (es decir 90 y 120 minutos). Los efectos de CB252 y CB377 fueron más pronunciados cuando el plasma al 1% de cada una de las ratas tratadas indujo la hemolisis. La fracción de hemolisis (establecida a 1,0 para la muestra de control con vehículo en el momento t=0) inducida por el plasma al

1% de las ratas tratadas con control con vehículo no cambió entre los momentos ensayados y siempre fue de aproximadamente 1,0. El plasma de las ratas tratadas con CB252 no indujo hemolisis detectable en ninguno de los momentos recogidos. El plasma de las ratas tratadas con CB377 también mostró hemolisis reducida en comparación con el plasma de los animales tratados con control con vehículo en todos los momentos, aunque a un menor grado en comparación con el plasma de las ratas tratadas con CB252. La hemolisis se redujo a un mayor grado en el plasma extraído 15 minutos después inyección de CB377 con una fracción de hemolisis indicada de aproximadamente 0,2 en comparación con el plasma de los ratones tratados con control y 120 minutos después de la inyección aumentó, de manera constante, hasta momentos más prolongados.

## 10 B. Comparación de CB200, CB155 y CB42

Por vía intravenosa se inyectó a las ratas una dosis en embolada de CB200 (tipo silvestre), CB155 y CB42 a 2 mg/kg, 10 mg/kg y 25 mg/kg. El plasma se extrajo a diversos momentos después de la inyección (siendo t=0 preinyección) hasta aproximadamente 1380 minutos después de la inyección y se analizó para determinar la actividad del complemento realizando un ensayo de hemolisis usando el protocolo de hemolisis del mono Cinomolgo indicado en el Ejemplo 19 usando plasma al 1%. Los resultados muestran que el plasma de las ratas tratadas con CB200 o CB42 a 2 mg/kg y 10 mg/kg mostraron niveles de hemolisis comparables con los de los niveles observados a t=0 antes de la preinyección con la proteasa. El plasma de las ratas tratadas con 25 mg/kg de CB200 o CB42 indujo una hemolisis reducida de los eritrocitos en los primeros momentos observándose una escasa hemolisis o ninguna en momentos de hasta aproximadamente 60 minutos después de la inyección de la proteasa. La hemolisis aumentó a niveles comparables a los de la hemolisis a t=0 antes de la preinyección de la proteasa de las muestras de plasma extraídas 1380 minutos antes de la inyección de CB200 o CB42. Sin embargo, el plasma de las ratas tratadas con CB155, mostró hemolisis disminuida en todas las dosis sometidas a ensayo. El tratamiento de las ratas con 2 mg/kg o 10 mg/kg mostró una ligera disminución de hemolisis, aunque reproducible, inducida por el plasma extraído en los primeros momentos en comparación con t=0 antes de la preinyección de la proteasa. Las muestras de plasma recogidas aproximadamente 30 minutos después de que las ratas recibieran una dosificación de 2 mg/kg o 10 mg/kg de CB155 dieron como resultado una DO415 de hemolisis observada de aproximadamente 0,3 o aproximadamente 0,25, respectivamente, en comparación con aproximadamente 0,45 para muestras de plasma a t=0 (sin proteasa). El plasma extraído 240 minutos o más después de la preinyección de CB155 a 2 mg/kg y 10 mg/kg indujo hemolisis a niveles comparables a los observados de los animales tratados a t=0. El plasma de las ratas tratadas con 25 mg/kg de CB155 indujo hemolisis de eritrocitos reducida en momentos iniciales, observándose una escasa hemolisis o ninguna en momentos de hasta 240 minutos después de inyección de la proteasa. La hemolisis aumentó a niveles comparables con los de la hemolisis a t=0 antes de la preinyección de la proteasa de las muestras de plasma extraídas 1380 minutos después de la inyección de CB155. Estos resultados demuestran que CB155 tiene una mayor eficacia farmacodinámica *in vivo* sobre la inactivación del complemento que CB200 y CB42 según los resultados del ensayo en este experimento.

### Ejemplo 24

## 40 Análisis farmacodinámico (PD) de proteasas en mono Cinomolgo

### A. Inhibición del complemento *ex vivo* de CB252 en Cinomolgo

Dos machos y dos hembras de mono cinomolgo sin tratar (DE aproximadamente 2,2- 4,4 kg y de 2-4 años de vida al inicio del tratamiento) se asignaron a un solo grupo de tratamiento. Antes de la dosificación, a cada animal se le realizó un tatuaje permanente con un número de identificación exclusivo y se aclimató durante un periodo de 14 días. A los animales del estudio se les administró por vía intravenosa una dosis de 1 y 3 mg/ml de CB252 a volúmenes de 5 mg/kg. Para los análisis farmacodinámicos *ex vivo* se extrajeron muestras de sangre a momentos programados (pre-inyección, es decir, t=0; 5 minutos, 30 minutos y 60 minutos después de la inyección). La sangre de los animales, los cuales estaban conscientes y confinados, se extrajo mediante venipunción de una vena periférica. Para usar como valores basales, se extrajeron muestras de sangre de animales de reserva. Se transfirió aproximadamente 1 ml de sangre a un tubo tratado con heparina litiada, se puso en hielo y después se centrifugó a 2000 g durante 15 minutos a 4 °C a los 30 minutos de la extracción. El plasma obtenido se dividió en dos alícuotas aproximadamente iguales y después se transfirió a crioviales que se habían congelado en hielo seco. Las muestras se conservaron a una temperatura de aproximadamente -60 °C o inferior, antes de descongelar y realizar el análisis. Las muestras de plasma se sometieron a ensayo para detectar los efectos sobre la activación del complemento mediante ensayo de escisión de C2 por Transferencia de Western, deposición de C3b por ELISA a una concentración en plasma del 1% y 10% y mediante hemolisis de eritrocitos de pollo sensibilizados a una concentración de plasma del 1%, 2,5% y 10%.

### 60 1. Escisión de C2

La escisión de C2 en las muestras de plasma se sometió a ensayo mediante Transferencia de Western como se describe en el Ejemplo 9 con las siguientes modificaciones: en el análisis se usó 1 µl de plasma, hervido con tampón de muestra LDS de NuPAGE y agente reductor de muestra (Invitrogen) durante 5 minutos, el anti C2 humano de cabra se diluyó a 1:2000 en leche deshidratada al 5%/TBST; y el anticuerpo secundario de cabra conjugado con

HRP se diluyó a 1:4000 en leche deshidratada al 5%/TBST. Los resultados mostraron que el plasma *ex vivo* de monos cinomolgos dosificados con una inyección IV en embolada de 1 o 3 mg/kg de CB252 demostró escisión parcial de C2 solo a 3 mg/kg. En el plasma de los monos tratados con 1 mg/kg de CB252 no se observó escisión de C2. El plasma extraído de monos tratados con 3 mg/kg de CB252, tuvo una escisión de C2 significativa observada en los tres animales de los que se disponía de muestras de plasma. El nivel de degradación promedio de C2, determinado por densitometría de C2 por transferencia de Western, fue del 60% a los 5 minutos, del 50% a los 30 minutos y del 40% a los 60 minutos. En la siguiente Tabla 27 se resume el porcentaje de inhibición del complemento según ensayo por escisión de C2 en el plasma de todos los animales tratados con 3 mg/kg de CB252.

Tabla 27: inhibición del Complemento *Ex Vivo* de CB252: escisión de C2

Momento	Animal		
	2	4	5
5 minutos	62%	55%	65%
30 minutos	55%	45%	50%
60 minutos	50%	37%	38%

## 2. Deposición de C3b

La deposición de C3b en las muestras de plasma se ensayó por ELISA como se describe en el Ejemplo 21. En el ensayo de deposición de C3b no se observó ninguna inhibición significativa del complemento en las muestras de plasma de monos a los que se les había administrado 1 mg/kg de CB252 administrado a cualquier animal en cualquier momento del ensayo. A la dosis de 3 mg/kg de CD252, a una concentración de plasma al 10%, la deposición de C3b se inhibió en un promedio de aproximadamente 50% a los 5 minutos, 30% a los 30 minutos y 15% a los 60 minutos. Se observó que el nivel de inhibición por CB252 era mayor cuando se media en plasma al 1%. Para la dosis de 3 mg/kg de CB252, al 1% en plasma, la deposición de C3b se inhibió en un promedio de aproximadamente 70% a los 5 minutos, 55% a los 30 minutos y 50% a los 60 minutos. En la siguiente Tabla 28 se resume el porcentaje de inhibición del complemento, ensayado por deposición de C3b, en el plasma de todos los animales tratados con 3 mg/kg CB252.

Tabla 28: inhibición del Complemento *Ex Vivo* de CB252: deposición de C3b

Momento	10% plasma			1 % plasma		
	Animal			Animal		
	2	4	5	2	4	5
5 minutos	52%	45%	50%	50%	74%	77%
30 minutos	37%	38%	13%	25%	60%	40%
60 minutos	40%	10%	3%	82%	16%	78%

## 3. Hemolisis

La hemolisis se evaluó en el ensayo de hemolisis con células sanguíneas de pollo (RBC, *Red Blood Cell*) sensibilizadas como se describe en el Ejemplo 19. Los resultados demuestran que el plasma de los monos tratados con una dosis de 1 mg/kg de CB252 no presenta efectos observables sobre la hemolisis de las RBS de pollo sensibilizadas en ningún animal en cualquier momento ensayado. Las muestras de plasma de los monos tratados con 3 mg/kg de CB252 mostraron una inhibición significativa de hemolisis a los diversos momentos ensayados y la inhibición se observó en plasma al 1%, 2,5% y 10%. En plasma al 10%, el plasma de monos tratados con 3 mg/kg de CB252 mostró un promedio de inhibición de hemolisis del 80% a los 5 minutos, 45% de inhibición a los 30 minutos y 25% de inhibición a los 60 minutos. En plasma al 2,5%, el plasma de los monos tratados con 3 mg/kg de CB252 mostró un promedio de inhibición de hemolisis del 92% a los 5 minutos, 80% de inhibición a los 30 minutos y 65% de inhibición a los 60 minutos. En plasma al 1%, el plasma de los monos tratados con 3 mg/kg de CB252 mostró un promedio de inhibición de hemolisis del 92% a los 5 minutos, 98% de inhibición a los 30 minutos y 99% de inhibición a los 60 minutos. El porcentaje de inhibición del complemento, según se ensaya por hemolisis de RBC de pollo, del plasma de todos los animales tratados con 3 mg/kg de CB252 se resumen en la siguiente Tabla 29.

Tabla 29: inhibición del Complemento *Ex Vivo* de CB252: Hemolisis

	Plasma al 10%			Plasma al 2,5%			Plasma al 1%		
	Animales			Animales			Animales		
Momento (minutos)	2	4	5	2	4	5	2	4	5
5	55%	90%	80%	90%	95%	91%	96%	95%	97%
30	43%	65%	30%	85%	91%	62%	96%	95%	91%
60	ND	40%	10%	98%	78%	21%	96%	91%	79%

ND: no determinado

En resumen, el plasma de mono cinomolgo de los monos tratados con una sola inyección intravenosa en embolada de 1 mg/kg de CB252 no mostró inhibición significativa del complemento, medido por degradación de C2, deposición de C3b por ELISA, o hemolisis de células sanguíneas de pollo sensibilizadas. El plasma de cinomolgo de monos tratados con una sola inyección intravenosa en embolada de 3 mg/kg de CB252 no mostró inhibición significativa en todos los ensayos del complemento *ex vivo* a los 5 minutos y 30 minutos. A niveles de ensayo menos riguroso, con plasma al 1% en deposición C3b por ELISA y hemolisis al 1%, persiste una inhibición significativa a los 60 minutos.

**B. Eficacia farmacodinámica de CB252 en comparación con otros mutantes de MT-SP1 en mono Cinomolgo**

Se inyectó a los monos por vía intravenosa una dosis en embolada de CB252 o CB377 de 1 mg/kg y 3 mg/kg de proteasa. Se extrajo el plasma en diversos momentos después de la inyección (siendo t=0 es preinyección; es decir 0, 5, 30 y 60 minutos) y se analizó para determinar la actividad del complemento ensayando la escisión de C2 por Transferencia de Western como se indica en el Ejemplo 9 y por hemolisis usando el protocolo de hemolisis en mono cinomolgo como se indica en el Ejemplo 19 usando plasma de mono al 1%, 2,5% o 10%.

Los resultados mostraron una escisión aumentada de C2 en el plasma de los monos tratados con CB252 y CB377 después del tratamiento con 3 mg/kg de proteasa pero no después del tratamiento con 1 mg/kg de proteasa. El plasma extraído de los monos tratados con 3 mg/kg de proteasa CB252 y CB377 mostró una escisión de C2 dependiente del tiempo, produciéndose una mayor escisión de C2 en el plasma extraído de los monos 5 minutos después del tratamiento con proteasa y produciéndose una menor escisión en momentos más prolongados. Los resultados también demuestran que, en todos los momentos ensayados, se produce una mayor escisión de C2 en el plasma extraído de los monos tratados con CB252 en comparación con los monos tratados con CB377.

Los resultados del experimento de hemolisis se correlacionan con los resultados de escisión de C2 ya que no se observó ninguna diferencia en la hemolisis inducida por plasma al 2,5% o plasma al 10% de los monos tratados con 1 mg/kg de proteasa CB252 o CB377 en ninguno de los momentos recogidos en comparación con la hemolisis inducida por el plasma de los monos no tratados con proteasa (es decir t=0). Los resultados también muestran que la hemolisis observada usando plasma al 2,5% o al 10% de los monos tratados con CB252 o CB377 3 mg/kg fue similar. En ambas condiciones de ensayo, el plasma de los monos tratados con 3 mg/kg de CB377 solo mostró una ligera disminución en la hemolisis de eritrocitos en comparación con el plasma de t=0. La fracción de hemolisis a t=0 se estableció a 1,0 y la fracción de hemolisis observada del plasma de los monos tratados con CB377 fue de aproximadamente 0,7 en todos los momentos ensayados. En este experimento CB252 fue notablemente más fuerte que CB377. El plasma de los monos tratados con 3 mg/kg de CB252, recogido 5 minutos después de la inyección, no indujo una hemolisis de eritrocitos detectable observándose una fracción de hemolisis de 0 o próxima a 0. Los efectos de CB252 sobre la hemolisis fueron dependientes del tiempo ya que la fracción de hemolisis inducida del plasma de los monos tratados con 3 mg/kg de CB252 aumentó a aproximadamente 0,4 y a aproximadamente 0,7 en el plasma extraído 30 minutos y 60 minutos, respectivamente, de los monos tratados con CB252.

En otro experimento, la eficacia farmacodinámica de las proteasas CB238, CB252 y CB377 se comparó después de la administración a cinomolgos. A los monos se les inyectó por vía intravenosa una dosis en embolada de CB238, CB252 o CB377 a la dosis máxima tolerada (DMT) para cada proteasa (es decir 2 mg/kg, 3 mg/kg y 3 mg/kg, respectivamente). Después de la inyección se extrajo plasma a diversos momentos (siendo t=0 preinyección, es decir 0, 5, 30 y 60 minutos) y se analizó para detectar la actividad del complemento ensayando la capacidad de mantener la hemolisis de las células sanguíneas de pollo usando el protocolo de hemolisis de Cinomolgo indicado en el Ejemplo 19 usando plasma de mono al 2,5% o al 10%. El % de inhibición de la hemolisis se determinó en comparación con la hemolisis inducida por plasma al 2,5% o al 10% extraído de los monos a t=0. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 30.

Proteasa	DMT de Mono (mg/kg)	% de inhibición de hemol (plasma al 2,5%) a los 5 minutos	% de inhibición de hemol (plasma al 2,5%) a los 30 minutos	% de inhibición de hemol (plasma al 10%) a los 5 minutos	% de inhibición de hemol (plasma al 10%) a los 30 minutos
CB238	2	24	15	20	11
CB252	3	92	79	75	46
CB377	3	18	8	14	7

### Ejemplo 25

#### 5 Examen Ex Vivo de los efectos cardiovasculares mediados por el complemento de las proteasas en corazones de conejo

Los efectos de las proteasas sobre lesiones mediadas por el complemento se ensayó *ex vivo* utilizando el Ensayo de Langendorff para examinar daños cardíacos en corazones de conejos. Los estudios realizados en corazones aislados permiten realizar observaciones simultáneas de los efectos hemodinámico, electrocardiográfico y electrofísico de los compuestos. En este estudio se utilizaron conejos Blancos de Nueva Zelanda porque la secuencia de aminoácidos del canal  $I_{Kr}$  de los conejos comparte una homología del 99% con la secuencia del canal  $I_{Kr}$  de seres humanos (Wymore et al. (1997) *Circ Res.*, 80: 261-268). Los conejos se han utilizado ampliamente para realizar estudios cardiovasculares y es una especie apropiada para realizar modelos de los posibles efectos sobre el corazón humano, ya que el potencial de acción cardíaco del conejo (similar al potencial de acción cardíaco de seres humanos) parece estar fuertemente dirigido por  $I_{Kr}$  (Weirich et al. (1998) *Basic Res Cardiol.*, 93: 125-132; Carmeliet et al. (1992) *J Pharmacol Exp Ther.*, 262: 809-817). Además, la interacción entre el plasma humano y el tejido cardíaco del conejo se ha caracterizado previamente y se ha demostrado que está principalmente mediada por el complemento (Kilgore et al. (1998) *J Pharmacol Exp. Ther.*, 285: 987-94). Por ejemplo, el contacto del plasma humano y la superficie extraña del corazón del conejo activa el complemento, lo que después media los daños al miocardio dando finalmente como resultado una asístole. Por lo tanto, este modelo es apropiado para determinar la eficacia de los inhibidores del complemento, tales como proteasas o proteasas modificadas, que se dirigen a uno o más de los componentes del complemento.

#### 25 A. Diseño experimental y métodos

Los conejos se sometieron a eutanasia mediante aturdimiento seguido de cardiectomía. Los corazones se extirparon rápidamente, se colocaron en un aparato Langendorff y se perfundieron con tampón de Krebs-Henseleit oxigenado modificado (37 °C; tampón Krebs-Henseleit: NaCl 118,1 mM, KCl 4,7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,17 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 mM, d-glucosa 11,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24,8 mM y piruvato 2,0 mM; modificado con la adición de 2,5 g de albúmina de suero bovino/1000 ml de medio de perfusión; y se oxigenó mediante oxígeno/dióxido de carbono presurizados (95%/5%). Se sujetó un drenaje ventricular y un balón de látex cargado con líquido en el ventrículo izquierdo con una sutura de hilo fruncida en el apéndice auricular. En la arteria pulmonar se sujetó un drenaje. Los corazones se bombeaban artificialmente mediante electrodos de bombeo colocados en la aurícula derecha. Se consideró que los corazones eran aceptables para este estudio si durante el periodo de equilibrio presentaban parámetros hemodinámicos aceptables (por ejemplo dP/dT > 1000 mm Hg/s).

El compuesto de ensayo con proteasas (a una concentración final de 1 μM) se incubó con medio de incubación (que contenía plasma humano diluido al 5% en tampón de perfusión; es decir, suero humano 12 ml diluido en medio de perfusión 12 ml) durante 1 hora a 37 °C. Después de la incubación, la mezcla del compuesto de ensayo se añadió al medio de perfusión experimental, se recirculó, para proporcionar una concentración de suero final de aproximadamente 4-6% en un volumen total de 300 ml. Los corazones aislados de los conejos, que previamente se habían equilibrado con medio de perfusión durante 10-15 minutos seguido de la toma de muestras de mediciones basales durante 10 minutos, se expusieron al medio de perfusión que contenía la mezcla del compuesto de ensayo incubado durante aproximadamente 1 hora tomando de manera continuada mediciones como se describe más adelante. El experimento finalizaba si se producía fibrilación ventricular irreversible. Se consideró que la fibrilación ventricular era irreversible si el corazón no revertía espontáneamente a los 90 segundos del inicio. Después de la exposición a los compuestos del ensayo, los corazones se fijaron en O.C.T., se congelaron en hielo seco y después se conservaron en un refrigerador a -80 °C para realizar la evaluación inmunohistoquímica.

#### 1. Mediciones hemodinámicas

El globo de látex en el ventrículo izquierdo (VI) se dilató con agua para conseguir una presión diastólica final del VI (PDFVI) de aproximadamente 5 mmHg. El globo se conectó con un entubado a un transductor de presión para medir la PDFI, la presión diastólica del VI (PDVI) y la presión sistólica del VI (PSVI). La perfusión coronaria se midió con un

transductor de presión conectado a un puerto con brazo lateral de la cánula aórtica. Las mediciones hemodinámicas se controlaron de manera continuada con el sistema de captura de datos Notocord HEM (Kalamazoo, MI) v3.5. Se usaron marcadores digitales para indicar los periodos de exposición del compuesto de ensayo. La PDVI se definió como la diferencia entre la PDFVI y la PSVI. Tanto la tasa máxima de aumento en la presión del VI (+dP/dt) como la tasa mínima de disminución en la presión del VI (-dP/dt) se midieron como la primera derivada del tiempo de la PDFVI con respecto a la PSVI y la PSVI con respecto a la PDFVI, respectivamente. También se midió la presión de perfusión coronaria (PPC).

Se evaluaron las mediciones hemodinámicas desde el minuto final del periodo de equilibrio (0 minutos) y durante el último minuto de cada periodo de 15 minutos (es decir, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos) en la hora del periodo de exposición del compuesto de ensayo y se utilizaron para determinar los efectos del compuesto de ensayo. Para el análisis de los parámetros hemodinámicos se utilizaron los valores promedio tomados de cinco ciclos cardiacos consecutivos ininterrumpidos por interferencia de latidos ectópicos. Se agruparon los valores de cada corazón individual para determinar un promedio para cada variable a concentraciones individuales. También se determinó el promedio del cambio de porcentaje de cada variable entre la concentración inicial y cada concentración. Se examinó el efecto de cada compuesto de ensayo sobre los parámetros hemodinámicos para determinar el significado estadístico usando análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido de un ensayo de correlación coincidente (*post-hoc*) para garantizar comparaciones entre grupos. Se consideró que un valor de  $p < 0,05$  era estadísticamente significativo. Los datos se presentaron como media  $\pm$  ETM o porcentaje de cambio desde la línea basal cuando fuera apropiado.

## 2. Análisis de concentración de creatina quinasa

Del drenaje de la arteria pulmonar se recogieron aproximadamente 2,0 ml de medio de perfusión antes del final de cada periodo de ensayo de 15 minutos. Antes de finalizar precozmente el experimento (por ejemplo, debido a fibrilación ventricular), se tomó una muestra para el análisis. Las muestras se congelaron en hielo seco y después se conservaron en un refrigerador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el análisis.

## B. Resultados experimentales

Un micromolar de CB200, CB155 o CB42 se preincubó con plasma humano diluido al 50% en medio de perfusión durante 1 hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después, la mezcla del compuesto de ensayo con proteasa se diluyó a una concentración final de plasma al 6% y se perfundió sobre los corazones de conejo aislados para inducir la activación del complemento y el efecto de las proteasas sobre la activación del complemento se determinó basándose en mediciones hemodinámicas. La perfusión de los corazones con plasma cardiaco inactivado se usó como control negativo. La tasa máxima de aumento en la presión del VI (+dP/dt) se determinó al inicio (0 min), y 15, 30, 45 y 60 minutos después de la perfusión con las proteasas del compuesto de ensayo. Los resultados muestran que el plasma en solitario induce una tasa de aumento reducida en la presión del VI lo que indica lesión en el miocardio. El valor +dP/dt disminuyó aproximadamente 5 veces desde el valor inicial y fue similar entre todos los momentos ensayados. En cambio, el plasma que primero inactivó el corazón no mostró cambios en el valor +dP/dt en comparación con el observado al inicio lo que indica que no hay activación del complemento. La perfusión de los corazones de conejo con los compuestos de ensayo con proteasa protegió a los corazones de las lesiones mediadas por complemento. Tanto CB42 como CB155 proporcionaron protección completa de las funciones cardiacas, según indican los valores de +dP/dt comparables a los de los niveles iniciales en todos los momentos medidos. Sin embargo, en este modelo, CB200 (tipo silvestre) solo proporcionó protección parcial de la función cardiaca. Quince minutos después de la perfusión con CB200, la función cardiaca observada indicó una protección casi completa con un valor +dP/dt comparable con el de los niveles iniciales. A los 30 minutos, CB200 mostró de escasa a ninguna protección de la función cardiaca observándose valores disminuidos de +dP/dt mayores de 3 veces, aproximándose a los niveles observados mediante el tratamiento de los corazones de conejo solo con plasma. La tasa de aumento en los niveles de presión del VI en conejos perfundidos en presencia de CB200 permaneció baja a los 45 y 60 minutos lo que indica lesión cardiaca en estos momentos.

## Ejemplo 26

### Expresión y purificación de CB238, MT-SP1 modificada, en matraces agitadores

Se clonaron CB238 y mutantes de MT-SP1 recombinantes o MT-SP1 de tipo silvestre relacionados y se expresaron en *E. coli* como cuerpos de inclusión como se describe en los Ejemplos 1 y 2 anteriores. La producción de MT-SP1 o mutantes se adaptó a escala de laboratorio optimizando la producción de la MT-SP1 mutante, CB238, agrupando hasta aproximadamente 44 X matraces agitadores de 1 l para aislamiento posterior de los sedimentos de los cuerpos de inclusión para su solubilización y replegamiento. Resumiendo, 1  $\mu\text{l}$  de ADN plasmídico (de purificación miniprep de ADN) se mezcló con 50  $\mu\text{l}$  de células BL-21. Las células y el ADN plasmídico se incubaron en hielo durante 30 minutos y después se sometieron a choque térmico a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 45 segundos. Después, las células se incubaron en hielo durante 2 minutos para la recuperación. A las células se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de LB (LB; Caldo LB de Difco Lennox, formulación aproximada por litro: 10,0 g de Triptona, 10,0 g de Extracto de Levadura, , 5,0 g de



Cloruro de Sodio) y el cultivo se incubó a 37 °C con agitación durante 1 hora. Después, 50 µl de las células se sembraron en placas de agar que contenían 50 µg/ml de carbenicilina para la selección. La placa se incubó a 37 °C durante 16-18 horas.

5 Desde una colonia sencilla, se inocularon 25 ml de LB que contenía 50 µg/ml de carbenicilina y se cultivaron hasta alcanzar por completo la confluencia. Se añadieron 0,5 ml del cultivo sembrado a 800 ml de 2XYT que contenía 10 µg/ml de carbenicilina y se cultivó durante una noche (~12-16 horas; aproximadamente 44 matraces). Las células se recogieron por centrifugación a 6.000 x g en un rotor Sorvall N° SLC4000. Los sedimentos celulares se agruparon y se pesaron. De 35,2 l de cultivo de *E. coli*, se obtuvieron 320 g de sedimento celular húmedo. Al sedimento celular se añadieron 600 ml de un tampón que contenía Fosfato Potásico (KPO<sub>4</sub>) 50 mM pH 7,4 y Cloruro Sódico (NaCl) 300 mM. Después de que las células estuviesen completamente resuspendidas, el lote se dividió en dos y cada parte se sometió a ultrasonido en un frasco de vidrio sobre hielo. El aparato de ultrasonidos se ajustó a un nivel de rendimiento de 8, ciclo de trabajo de 60% durante 4 minutos. El procedimiento de ultrasonidos se repitió dos veces para cada muestra. La muestra resultante sometida a ultrasonidos se centrifugó a 16.900 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se vació y se reemplazó por ~300 ml de tampón recién preparado que contenía KPO<sub>4</sub> 500 mM pH 7,4, NaCl 300 mM y óxido de laurildimetilamina (LDAO) al 0,5% volumen/volumen. Los cuerpos de inclusión se resuspendieron usando una espátula y la solución se agitó hasta ser homogénea. Después, la muestra agitada se centrifugó de nuevo y se decantó el sobrenadante. El lavado con LDAO se realizó un total de tres veces seguido de tres rondas de lavado con tampón que contenía KPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,4, NaCl 300 mM sin LDAO.

20 A los 70 g de cuerpos de inclusión húmedos purificados, se añadieron 700 ml de tampón desnaturizante (HCl Guanidina 6 M en Tris 100 mM, pH 8,0, ditiotretol (DTT) 20 mM) y la proteína se disolvió. Después, la muestra se centrifugó a 20.400 x g durante 30 minutos a 22 °C y el sobrenadante se recogió. Después, la solución con la proteína se escurrió lentamente en 35 l de solución de plegamiento (Tris 100 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Arginina 1,5 M, glutatión reducido 5 mM, glutatión oxidado 0,05 mM) agitando intensamente. La solución con la proteína se dejó a 4 °C durante 72 horas.

30 La solución con la proteína resultante se concentró por filtración con fibra hueca a ~1-2 l y después se dializó en 16 l de tampón que contenía Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM a 4 °C durante una noche. Al día siguiente, el tampón se cambió por un tampón recién preparado y la muestra se dializó durante 8 horas más. Después, la muestra con proteasa se eliminó del entubado de diálisis y se incubó a temperatura ambiente hasta que se produjo la autoactivación de la proteasa por escisión de la proregión para liberar la enzima madura. La actividad se controló como se describe en el Ejemplo 3 anterior usando un sustrato RQAR-AMC fluorogénico y SDS-PAGE. Después de la activación completa, la muestra se dializó en tampón que contenía HEPES 50 mM, pH 6,5 a 4 °C durante una noche.

40 La solución con la proteína se cargó después en una columna Source 15S (Amersham) y se eluyó usando un gradiente de tampón de HEPES 50 mM pH 6,5 a HEPES 50 mM pH 6,5 que contenía NaCl 0,15 M. Antes de realizar todas las etapas cromatográficas, cada columna se lavó en sentido inverso con NaOH 0,5 N y después se aclaró con agua. Las fracciones activas se agruparon. Se añadió un volumen de tampón equivalente que contenía (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M en PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7,0 y la solución resultante se cargó en una columna de Fenil Sefarose HP previamente equilibrada con tampón que contenía PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. La proteína activa se eluyó con un gradiente de tampón de PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M a PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,0. Las fracciones activas se agruparon y se cambió el tampón en HEPES 50 mM pH 6,5. Después, como en la primera etapa cromatográfica la muestra se volvió a cargar y se purificó en Source 15Q. Después, las fracciones activas se agruparon, el tampón se cambió en PBS usando un agitador de células y se concentró a ~10 mg/ml. Se extrajo una muestra para medir la concentración de proteína A280. Después, se añadió benzamida a una concentración final de 20 mM a la muestra restante antes de la filtración de la muestra de la proteína a través de un filtro con jeringa de 0,2 µM. La solución con la proteína se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80 °C. El rendimiento final fue de ~800 mg de proteína pura (~20 mg de proteasa/l de cultivo). La proteína purificada se sometió a ensayo para determinar la actividad pureza y niveles de endotoxina específicos como se describe en el Ejemplo 3 anterior.

55 Para el resto de mutantes de MT-SP1 o MT-SP1 de tipo silvestre se empleó una estrategia similar. El protocolo se modificaba dependiendo del mutante específico. Para los mutantes que no se purificaban bien en Fenil Sefarose, en lugar de esta se utilizó Benzamidin Sefarose. Por ejemplo, el mutante de MT-SP1, CB450, se purificó en una columna de Benzamida.

### Ejemplo 27

#### 60 Evaluación de hemolisis y actividad plasmática por un panel de mutantes de MT-SP1

Se sometió a ensayo un panel de proteasas para determinar su capacidad para soportar la hemolisis clásica o alternativa después de preincubación con plasma al 20% como se describe en el Ejemplo 7, parte A.1b y Ejemplo 7, parte B.1 anterior. Además, las proteasas se sometieron a ensayo para determinar la actividad plasmática como se describe en el Ejemplo 6. La Tabla 31 representa la fracción de hemolisis clásica a 200 nm, la fracción de hemolisis

alternativa a 500 mM y el valor de CI50 para cada proteasa tanto para la hemolisis Clásica como Alternativa.

Además, también se determinó el porcentaje de proteasa no unida por la alfa-2 macroglobulina (a2M). La inactivación de una proteasa por la alfa-2 macroglobulina atrapa a la proteasa en un complejo en el que aún es capaz de renovar pequeños sustratos fluorescentes aunque incapaz de acceder a grandes sustratos de proteína. Esta propiedad de la alfa-2 macroglobulina complica la evaluación de la actividad de las proteasas en plasma. Para determinar la actividad real de la proteasa libre, que no está formando complejos en plasma, se requiere una medición en dos etapas. En primer lugar, se mide la actividad de la muestra sobre sustratos fluorescentes. Después, se añade un inhibidor macromolecular que se une a todas las proteasas libres (ATIII o ecotina M84R) y se mide la actividad de la proteasa atrapada (y por tanto protegida de la inhibición) en la alfa-2 macroglobulina. El porcentaje no unido por la actividad de alfa-2-macroglobulina es el porcentaje de la actividad residual plasmática que se inhibe por la adición de ecotina. Resumiendo, en un tubo para PCR de 0,2 ml, se mezcló 1 µl de proteasa 10X con 9 µl de plasma humano en citrato (Innovative Research). También se preparó un control no inhibido que contenía 1 µl de proteasa 10X mezclado con 9 µl de PBST. Las mezclas se incubaron durante 5 minutos a 37 °C. Las muestras se diluyeron 250 veces en PBST y se conservaron en hielo. Dos alícuotas de 50 µl de cada muestra se transfirieron a una placa de ensayo opaca (Costar N° 3694) que contenía 2 µl de PBST o 2 µl de ecotina M84R 520 nM. Las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron cinco microlitros de sustrato Ac-RQAR-AMC 0,4 mM y se midió la fluorescencia a lo largo del tiempo con un espectrofluorómetro SpectraMax M5 (Molecular Devices) preparado para realizar lecturas cada 20 segundos durante 30 minutos a 30 °C (Ex: 380 nm, EM: 450 nm, Límite: 435 nm). El porcentaje no unido por la alfa-2 macroglobulina se calculó con la siguiente fórmula:  $(1 - ((\text{Proteasa en plasma} / \text{Proteasa en PBST}) - (\text{Proteasa en plasma} + \text{ecotina} / \text{Proteasa en PBST})) / (\text{Proteasa en plasma} / \text{Proteasa en PBST})) * 100$ . A continuación, en la Tabla 31 se indican los resultados del % de la alfa-2 macroglobulina no unida para el panel de proteasas sometido a ensayo.

Tabla 31: Evaluación de Hemolisis y Actividad de un Panel de Proteasas

CB N°	Mutaciones	Hemolisis Clásica 200 nM	Hemolisis Alternativa 500 nM	Hemolisis Clásica CI <sub>50</sub> (nM)	Hemolisis Alternativa CI <sub>50</sub> (nM)	Actividad Plasmática	% No unido por a2M
CB42 1	I41T/Y146D/Q175 D/K224F	0,714	478,90	0,271		0,585	84%
CB42 2	I41T/Y146E/Q175 D/K224N	0,050	50,35	0,150	111,8	0,511	83%
CB45 0	I41T/146D/G151L/ K224F	0,255	269,14	0,223	262,4	0,287	
CB47 6	141T/Y146D/Q175 D/K224L	0,111	87,26	0,217	1623	0,595	89%
CB47 7	I41T/Y146D/Q175 D/K224R	0,016	53,43	0,140	116,2	0,346	67%
CB47 8	I41T/Y146D/Q175 D/K224N	0,254	86,48	0,316	230,3	0,550	89%
CB48 0	I41T/Y146D/G151 L/Q175D/K224F	0,272	131,01	0,367	268,1	0,670	88%
CB48 1	I41T/Y146D/G 151 L/Q175D/K224L	0,050	143,19	0,169	154,3	0,687	72%
CB48 2	I41T/Y146D/G151 L/Q175D/K224R	0,042	57,39	0,255	296,2	0,306	10%
CB48 3	I41T/Y146D/G151 L/Q175D/K224N	0,076	57,39	0,425	257,3	0,642	73%
CB48 4	I41T/Y146E/Q175 D/K224F	0,235	67,21	0,365	268,5	0,649	94%
CB48 5	I41T/Y146E/Q175 D/K224L	0,072	103,78	0,184	160,4	0,593	82%
CB48 6	I41T/Y146E/Q175 D/K224R	0,014	43,36	0,128	125,4	0,326	44%
CB48 7	I41T/Y146E/G151 L/Q175D/K224N	0,026	52,87	0,173	169,2	0,548	53%
CB48 8	I41T/Y146E/G 151 LQ175D/K224F	0,086	72,61	0,195	179,3	0,658	85%

CB48 9	I41T/Y146E/G151 L/Q175D/K224L	0,038	50,56	0,143	140,8	0,526	58%
CB49 0	I41T/Y146E/G151 L/Q175D/K224R	0,031	52,63	0,125	193,8	0,288	0%

**Ejemplo 28**

**Mutantes adicionales**

5 Se prepararon mutantes adicionales como se describe en el presente documento. Dichos mutantes incluyen, pero sin limitación, los que se indican en la siguiente Tabla 32.

Tabla 32: Mutantes Adicionales	SEC ID	SEC ID
I41T/Y146D/G151L/K224N	681	696
Y146D/Q175D/K224N	682	697
I41T/Y146D/K224N	683	698
Y146D/G151L/K224N	684	699
Y146D/Q175R/K224N	685	700
Y146D/Q175K/K224N	686	701
Y146D/Q175H/K224N	687	702
I41T/Y146D/G151L/Q175K/K224F	688	703
I41T/Y146D/G151L/Q175R/K224F	689	704
I41T/Y146D/G151L/Q175H/K224F	690	705
I41T/Y146D/G151L/Q175Y/K224F	691	706
I41T/Y146D/G151L/Q175K/K224N	692	707
I41T/Y146D/G151L/Q175R/K224N	693	708
I41T/Y146D/G151L/Q175H/K224N	694	709
I41T/Y146D/G151L/Q175Y/K224N	695	710

## REIVINDICACIONES

1. Una proteasa modificada que no pertenece al complemento, que comprende modificaciones en uno cualquiera o más aminoácidos de una proteasa armazón, en la que:

5 el resto o los restos de aminoácidos modificados aumentan una o ambas de la especificidad por un sustrato diana o la actividad hacia un sustrato diana, en la que el sustrato diana es una proteína del complemento; la proteasa armazón es una proteasa MT-SP1, variantes alélicas, isoformas o una parte catalíticamente activa de la misma; y  
10 la proteasa modificada que no pertenece al complemento comprende:

a) al menos dos o más modificaciones en la proteasa armazón, en la que una modificación está en la posición 146 y la segunda modificación está en la posición 224, en base a la numeración de la quimotripsina, a condición de que:

(i) cuando la proteasa solo incluye dos modificaciones, la proteasa no incluya Y146D ni K224F como las dos modificaciones; y

(ii) cuando la proteasa contiene tres modificaciones, la proteasa no incluya F99V o I o L o T con Y146D y K224F; o

b) una o más modificaciones en la proteasa armazón seleccionadas entre una cualquiera o más de D96A, D96V, D96F, D96S, D96T, F99S, F99G, Q174H, Q174A, Q174V, Q174F, Q174R, Q174K, Q174L, Q174Y, Q192L, Q192I, Q192E, Q192K, Q192Y, D217Q, D217N, D217H, Q221aD, en base a la numeración de la quimotripsina; o

c) una o más modificaciones en la proteasa armazón seleccionadas entre I41T, I41A, 141L, 141F, 141D, 141E, G147E, G151L, Q221aL, Q221aE, Q175H, Q175L, Q175W, Q175Y, Q175K, K224L, K224R, K224N, K224T, K224Y y K224S, en base a la numeración de la quimotripsina.

2. La proteasa modificada que no pertenece al complemento de la reivindicación 1, en la que la proteasa MT-SP1 o una parte catalíticamente activa de la misma comprende una secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°: 2 o 10.

3. La proteasa modificada que no pertenece al complemento de la reivindicación 1, en la que:

la proteasa modificada que no pertenece al complemento se indica en a); y  
la proteasa modificada que no pertenece al complemento comprende una modificación en la posición 151, en base a la numeración de la quimotripsina.

4. La proteasa modificada que no pertenece al complemento de la reivindicación 1, en la que:

la proteasa modificada que no pertenece al complemento se indica en a); y  
la proteasa modificada que no pertenece al complemento comprende una modificación en la posición 41, en base a la numeración de la quimotripsina.

5. La proteasa modificada que no pertenece al complemento de la reivindicación 1, en la que:

la proteasa modificada que no pertenece al complemento se indica en a); y  
la modificación o modificaciones en una proteasa MT-SP1 o una parte catalíticamente activa de la misma se seleccionan entre Y146E/K224N, I41T/Y146E/Q175D/K224R, I41T/Y146E/Q175D/K224F, I41T/Y146E/Q175D/K224N, 141T/Y146E/G151L/Q175D/K224L, Y146E/Q221aE/K224F, I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224R, 141T/Y146E/G151L/Q175D/K224N, Y146E/K224R, Y146E/Q175D/K224N, Y146D/K224R, I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224F, Y46E/Q75D/K224R, Y146E/K224L, Y146D/Q175D/K224R, Y146D/Q175L/K224L, Y146D/Q175W/K224L, Y146D/K224L, Y146E/Q221aE/K224R, Y146E/K224A, Y146D/Q175H/K224L, Y146D/Q175Y/K224L, Y146E/K224Y, Y146D/Q175F/K224L, Y46D/Q221aL/K224S, I41EA146D/K224L, Y146D/D217F/K224L, H143V/Y146D/K224F, Y146E/K224F, Y146A/K224F, Y146E/K224T, I41T/Y146E/K224L, 141F/Y146D/K224F, I41L/Y146D/K224F, I41T/Y146D/G151L/K224F, I41A/Y146D/K224F, I41E/Y146D/K224F, I41D/Y146D/K224L, I41D/Y146D/K224F, Y146N/K224F, Y146N/K224F, Y146D/Q192A/K224F, I41T/Y146D/Q175D/K224L, I41T/Y146D/Q175D/K224R, I41T/Y146D/Q175D/K224N, I41T/Y146D/G151L/Q175D/K224F, 141T/Y146D/G151L/Q175D/K224L, I41T/Y146D/G151L/Q175D/K224R, I41T/Y146D/G151L/Q175D/K224N, I41T/Y146E/Q175D/K224F, I41T/Y146E/Q175D/K224L, 141T/Y146D/G151L/K224N, Y146D/Q175D/K224N, Y146D/G151L/K224N, Y146D/Q175R/K224N, Y146D/Q175K/K224N, Y146D/Q175H/K224N, I41T/Y146D/G151L/Q175K/K224F, I41T/Y146D/G151L/Q175R/K224F, I41T/Y146D/G151L/Q175Y/K224F, I41T/Y146D/G151L/Q175K/K224N, I41T/Y146D/G151L/Q175R/K224N, I41T/Y146D/G151L/Q175H/K224N Y146D/K224N, I41T/Y146D/K224L, I41T/Y146E/G151L/Q175D/K224N, I41T/Y146D/K224N e I41T/Y146D/G151L/Q175Y/K224N, en base a la numeración de la quimotripsina.

6. La proteasa modificada que no pertenece al complemento de la reivindicación 5, en la que la proteasa modificada que no pertenece al complemento tiene una secuencia de aminoácidos indicada en una cualquiera de las SEC ID N°: 552-559, 561-566, 570-580, 583-591, 594-602, 604, 606-613, 615-620, 624-634, 637-645, 648-656, 658 o 663-710.
- 5
7. La proteasa modificada que no pertenece al complemento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que:
- la proteasa modificada que no pertenece al complemento se indica en b) o c); y  
 la modificación o modificaciones en una proteasa MT-SP1 o una parte catalíticamente activa de la misma  
 10 corresponde a un polipéptido MT-SP1 modificado que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en una cualquiera de las SEC ID N°: 41-51, 56, 57, 60-64, 67, 419-429, 434, 435, 438-442, 445, 524, 525, 527-530, 532, 533, 560, 568, 614 o 622.
8. Una composición farmacéutica, que comprende una proteasa modificada que no pertenece al complemento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 15
9. Una combinación, que comprende:
- (a) una composición farmacéutica de la reivindicación 8; y  
 20 (b) un segundo agente o agentes para el tratamiento de un trastorno mediado por el complemento, en el que el segundo agente es un agente antiinflamatorio o un anticoagulante.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que la composición farmacéutica se formula para administración sistémica, oral, nasal, pulmonar, local o tópica.
12. Un kit que comprende la composición farmacéutica de la reivindicación 8, un dispositivo para la administración  
 30 de la composición y, opcionalmente, instrucciones para la administración.
13. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera de las proteasas modificadas que no pertenecen al complemento de las reivindicaciones 1-7.
- 35
14. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13.
15. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 14.
16. Una proteína de fusión que comprende una parte catalíticamente activa de una proteasa de una cualquiera de  
 40 las reivindicaciones 1-7 que está fusionada a un polipéptido que no es una proteasa.
17. Una proteasa modificada que no pertenece al complemento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado entre un trastorno inflamatorio, un trastorno neurodegenerativo y un trastorno cardiovascular, en el que:
- 45 la proteasa que no pertenece al complemento escinde uno cualquiera o más sustratos diana de una ruta del complemento de tal manera que se inhibe la activación del complemento en una ruta que comprende el sustrato diana; y  
 la inhibición de la activación del complemento conduce a una reducción de los síntomas inflamatorios  
 50 asociados a la enfermedad o al trastorno.
18. La proteasa modificada que no pertenece al complemento para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el trastorno mediado por el complemento se selecciona entre septicemia, artritis Reumatoide (AR), glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP), Esclerosis Múltiple (EM), Miastenia grave (MG), asma, enfermedad  
 55 intestinal inflamatoria, lesión tisular inflamatoria aguda mediada por el complejo inmune (CI), Enfermedad de Alzheimer (EA) y lesión de isquemia-reperusión.
19. La proteasa modificada que no pertenece al complemento para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el trastorno mediado por el complemento es el síndrome de Guillan-Barré.
- 60
20. La proteasa modificada que no pertenece al complemento para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la lesión de isquemia-reperusión se produce por un suceso o tratamiento seleccionado entre infarto de miocardio (IM), ictus, angioplastia, injerto de derivación de arteria coronaria, derivación cardiopulmonar (DCP) y hemodiálisis.
- 65

21. La proteasa modificada que no pertenece al complemento para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-20, en el que el trastorno mediado por el complemento se produce como resultado del tratamiento de un sujeto.

5 22. La proteasa modificada que no pertenece al complemento para su uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el tratamiento produce lesión de isquemia-reperfusión mediada por el complemento.

23. La proteasa modificada que no pertenece al complemento para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el tratamiento es angioplastia o injerto de derivación de arteria coronaria.

10

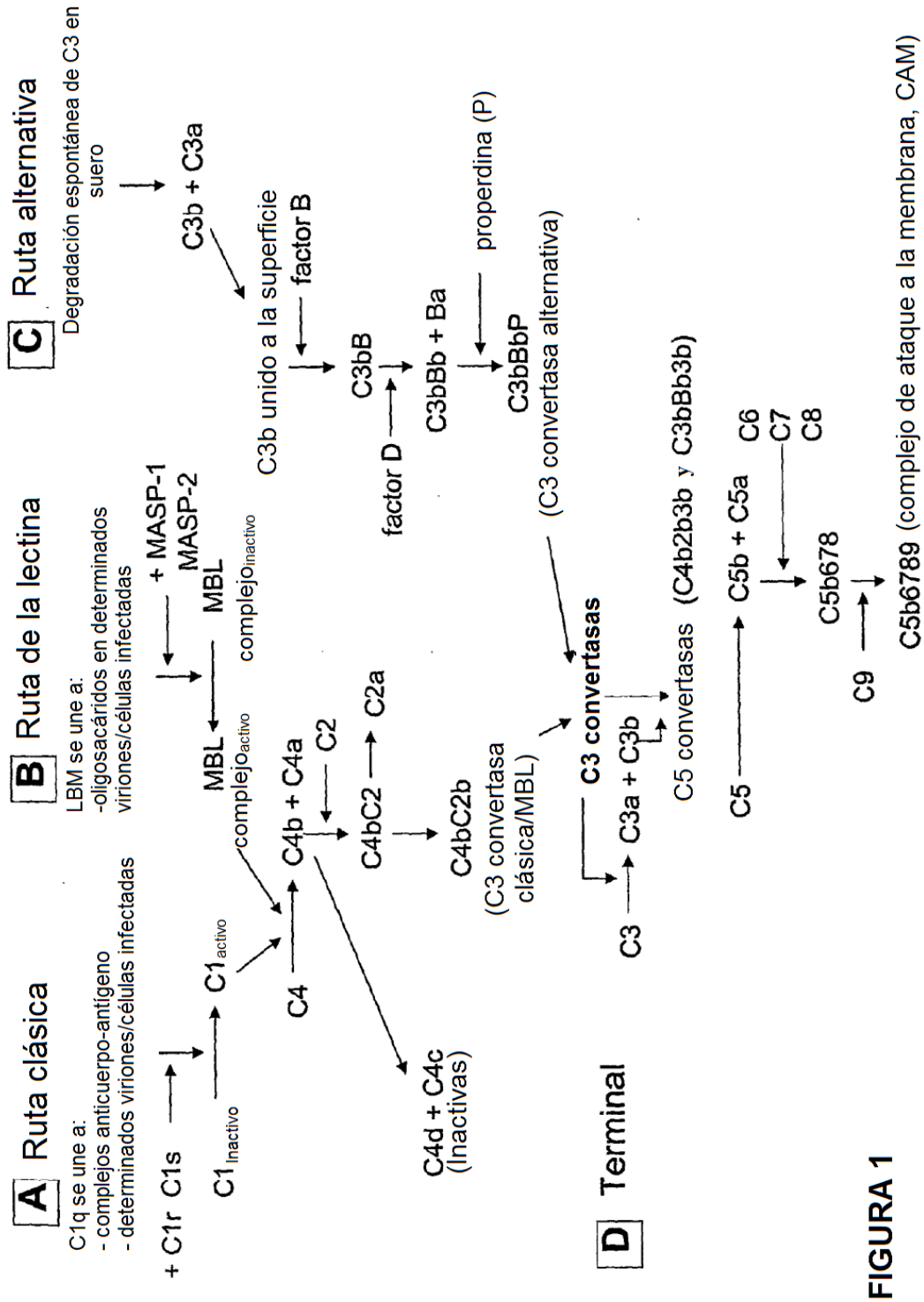


FIGURA 1