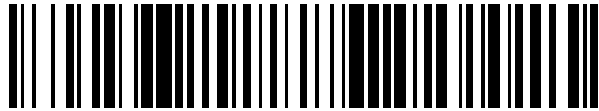


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 105**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2008 E 08789758 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2185175**

54 Título: **Reguladores de la MMP-9 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

15.08.2007 US 935486 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2013

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)
AT THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 Rehovot , IL**

72 Inventor/es:

**SAGI, IRIT y
ROSENBLUM, GABRIEL**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 406 105 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

Reguladores de la MMP-9 y usos de los mismos

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a reguladores de la MMP-9 y, más particularmente, a reguladores dirigidos hacia el dominio OG de la misma.

Las funciones fisiológicas y patológicas de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son versátiles. En numerosos aspectos de la migración de células inflamatorias y cancerosas, a través de tejidos conectivos, no solamente catabolizando los componentes de la matriz extracelular (ECM) sino también procesando diversos mediadores solubles, promoviendo muchas patologías, se han implicado miembros de la familia de las MMP. Aunque todas las MMP comparten sitios catalíticos similares, se observan notables diferencias en cuanto a su especificidad de sustrato, debido, al menos en parte, a la presencia de sitios de unión a sustrato adicionales en dominios proteicos no catalíticos. Como una consecuencia, diferentes MMP tienen diferentes funciones biológicas. La MMP-9, también conocida como gelatinasa B, es una diana prototípica en enfermedades inflamatorias, debido a sus funciones en lesiones tisulares y procesamiento de proteínas solubles que promueven la inflamación, incluyendo inhibidores de proteasa, quimiocinas y citocinas.

En cambio, la MMP-2 o gelatinasa A, tiene funciones principalmente antiinflamatorias u homeostáticas, presumiblemente por la inactivación de quimiocinas inflamatorias y por la regulación de la renovación de tejido conectivo. Esto implica que los inhibidores selectivos, que discriminan entre estas enzimas muy similares, son cruciales para la terapia antiinflamatoria eficaz sin efectos secundarios. En esta perspectiva, otras partes no catalíticas de la enzima, diferenciando la MMP-2 y la MMP-9, pueden dirigirse para generar inhibidores selectivos.

Curiosamente, la principal diferencia estructural entre la MMP-9 y la MMP-2 es la presencia de un dominio ampliamente O-glucosilado (OG) en la MMP-9 [Opdenakker, G., y col (2001), Trends Immunol. 22, 571-579; Van den Steen, P. E., y col (2006) J Biol Chem. 281, 18626-18637]. Otros dominios en la MMP-9 también se encuentran en la MMP-2 e incluyen un dominio propéptido responsable de mantener la latencia, un dominio catalítico en el que se insertan tres repeticiones de fibronectina, y un dominio C-terminal también conocido como dominio similar a hemopexina que constituye un exosito para la unión del inhibidor endógeno de MMP-9 y MMP-2, inhibidor tisular de metaloproteinasa 1 (TIMP-1). A pesar de su gran importancia en muchas patologías y a diferencia de la MMP-2, la información estructural disponible sobre la MMP-9 está limitada a sus dos dominios terminales, en lugar de a la enzima de longitud completa. La estructura de rayos X de la parte N terminal [Elkins y col, 2002, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 58, 1182-1192], que contiene el dominio pro-catalítico muestra que posee un plegamiento de matrixina. El dominio C terminal similar a la hemopexina consiste en una estructura en hélice con cuatro álabes ? con simetría pseudo-cuadri-plegada [Cha y col, 2002, J Mol Biol 320, 1065-1079]. La Figura 1A presenta las estructuras cristalinas de los dominios pro-catalítico y similar a la hemopexina de la pro-MMP-9. Los dominios están conectados por una línea de puntos que representa el engarce de 64 aminoácidos de longitud (que contiene 22 restos de prolina, 6 restos de glicina y aproximadamente 12-14 glucanos O unidos [Van den Steen y col., 2001, Biochim Biophys Acta 1528, 61-73]. Cabe destacar que, el dominio engarzador de la pro-MMP-9 es 2-3 veces mas largo que las regiones engarzadoras de las colagenasas, estromelinas y gelatinasa A, de la familia de las MMP, para la cual las longitudes típicas de los engarces abarcan un intervalo de solo 21-27 restos de aminoácidos.

Se ha demostrado que la cristalización del dominio engarzador en la pro-MMP-9, individualmente o junto con otros dominios de proteínas, es difícil. La ausencia de una cadena lateral larga, en el caso de la glicina, y la presencia de un pliegue integrado, en el caso de la prolina, interfiere con la formación de estructuras secundarias y, a menudo, da como resultado regiones en bucle o no estructuradas. Además, la presencia de serinas y treoninas agrupadas como puntos de conexión para O-glucanos produciría efectos estéricos que podrían impedir el empaquetamiento cristalográfico. Este dominio también se ha denominado dominio similar al colágeno V, debido a la similitud de su secuencia con la del colágeno V y recientemente se ha renombrado dominio O-glucosilado (OG). El dominio OG es activo en la orientación de los dominios de la hemopexina para permitir interacciones exosito. Sin embargo, no se sabe nada acerca de la influencia del dominio OG sobre la estructura 3D global de la MMP-9 y su naturaleza biofísica.

La Patente de Estados Unidos N° 20040175817 explica la identificación de moduladores de MMP-9 basados en la estructura cristalina de su subunidad catalítica. Sin embargo, dado que, en general, las MMP comparten una alta homología de secuencia en sus sitios catalíticos, los moduladores diseñados para dirigirse al sitio catalítico no serán selectivos hacia la MMP-9.

Sumario de la invención

Existe una necesidad de reguladores específicos de la MMP-9.

De acuerdo con un aspecto, se proporciona un procedimiento de identificación de un agente que sea capaz de regular específicamente la MMP-9, comprendiendo el procedimiento determinar si el agente es capaz de interactuar con el dominio OG de la MMP-9, siendo el agente un supuesto regulador negativo de la actividad

colagenolítica de la MMP-9, y sometiendo a ensayo dicho agente con respecto a la capacidad para regular negativamente la actividad colagenolítica de la MMP-9.

5 De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que interacciona específicamente con un dominio OG de la MMP-9 para regular negativamente la actividad colagenolítica de la MMP-9 para su uso en el tratamiento del cáncer y trastornos inflamatorios.

De acuerdo con un aspecto adicional, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

De acuerdo con otro aspecto adicional, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo.

De acuerdo con una realización, la MMP-9 es la MMP-9 natural.

De acuerdo con otra realización más, el agente comprende un agente polipeptídico.

10 De acuerdo con otra realización más, el agente polipeptídico comprende un anticuerpo.

De acuerdo con otra realización más, el agente comprende una molécula pequeña.

De acuerdo con otra realización más, la determinación se efectúa comparando una estructura del agente con una estructura de un dominio OG de la MMP-9.

15 De acuerdo con otra realización más, la determinación se efectúa poniendo en contacto dicho agente con un dominio OG aislado de la MMP-9.

De acuerdo con otra realización más, el agente comprende un polipéptido.

De acuerdo con otra realización más, el polipéptido comprende un anticuerpo.

De acuerdo con otra realización más, el agente comprende una molécula pequeña.

De acuerdo con otra realización más, el agente se identifica como se describe en el presente documento.

20 De acuerdo con otra realización más, el agente comprende una molécula pequeña o un agente polipeptídico.

De acuerdo con otra realización más, el agente polipeptídico comprende un anticuerpo.

De acuerdo con otra realización más, la molécula comprende un anticuerpo humanizado que comprende un dominio de reconocimiento de antígenos que interacciona específicamente con el dominio OG de la MMP-9.

Breve descripción de los dibujos

25 En el presente documento la invención se describe únicamente como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos con detalle, se resalta que las particularidades mostradas se ofrecen solo como ejemplo y con objeto de analizar de un modo ilustrativo las realizaciones preferidas de la presente invención, y se presentan para ofrecer lo que se piensa que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la presente invención. En este sentido, para una comprensión fundamental
30 de la invención no se intentan mostrar detalles estructurales de la misma más detalladamente de lo necesario siendo obvia la descripción, junto con los dibujos, para los expertos en la técnica, de como pueden llevarse a la práctica las diferentes formas de la invención.

En los dibujos:

35 Las FIGs. 1A-D son modelos y gráficos generados por ordenador que caracterizan la pro-MMP-9. La Figura 1A ilustra las estructuras cristalinas de los dominios terminales. El dominio N terminal de la pro-MMP-9 (código PDB: 1L6J) comprende el propéptido (verde), las tres repeticiones de fibronectina de tipo II (azul) y el dominio catalítico (rojo) conteniendo cinc el sitio activo (esfera gris). El dominio OG (línea discontinua) contiene un fragmento de 64 restos de estructura desconocida y conecta el dominio N terminal con el dominio C terminal similar a hemopexina (código PDB: 1ITV), que consiste en cuatro álabes de hélice (cian). La Figura 1B es un gráfico que ilustra la cromatografía de exclusión por tamaños que muestra el perfil de elución de formas de especies oligoméricas (pico 1, 15,8 min y pico 2, 22,7 min) y monoméricas (pico 3, 25,1 min) de pro-MMP-9. Inserto: para calibrar la columna Superdex 200 se usaron representaciones Porath [57] de patrones de proteínas con radios de Stokes conocidos (de izquierda a derecha: tiroglobulina 85 Å, ferritina 61 Å, catalasa 52,2 Å, aldolasa 48,1 Å, albúmina 35,5 Å). Se representa la raíz cúbica de Kd frente al radio de Stokes de cada proteína y se muestra el ajuste lineal de mínimos cuadrados. La Figura 1C es una fotografía de un zimograma de gelatina. Para separar monómeros de estructuras oligoméricas superiores se aplicó sedimentación con glicerol en cantidades preparativas. En un zimograma de gelatina se ensayaron alícuotas de cada fracción. En las fracciones 1-3 se presentan estructuras oligoméricas superiores. La fracción 3 contiene una mezcla de todas las formas oligoméricas. Las fracciones 4-7 contienen principalmente la forma monomérica. La Figura 1D es un análisis de velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica, usado para calcular la distribución del
50

coeficiente de sedimentación. Inserto: modelado de los perfiles de sedimentación (líneas) de los datos experimentales (puntos) en función del tiempo y distancia del eje de rotación. La representación de productos residuales se muestra en el panel superior. Por claridad, en el análisis solo se muestra cada perfil décimo usado.

5 Las FIGs. 2A-E son modelos y gráficos generados por ordenador que ilustran el análisis estructural de pro-MMP-9. La Figura 2A es un gráfico que ilustra datos SAXS de pro-MMP-9 en solución. Los datos de intensidad de rayos X experimentales (puntos negros) se comparan con el modelo más probable (línea gris) usando CHADD. Inserto: función de distribución por pares de los datos SAXS experimentales. La Figura 2B ilustra modelos de pro-MMP-9 reconstruidos por CHADD. Los modelos obtenidos de los datos SAXS se representan mediante esferas blancas con un radio de 5 Å. Cada modelo giró a 0° y 90° a lo largo del eje vertical. Las estructuras cristalinas acopladas de los dominios N y C terminal [22, 24] se representan como cintas de color azul y rojo, respectivamente. La Figura 2C es una predicción de una región de gran desorden (línea negra gruesa) mediante PONDR [37] en la secuencia de pro-MMP-9 y la correspondiente organización de dominios (barra superior: PRO - pro-péptido, CAT+FN – dominio catalítico y tres repeticiones de fibronectina de tipo II, OG – dominio O-glicosilado, PEX – dominio similar a hemopexina)- La Figura 2D ilustra el ajuste de la curva de dispersión calculada de pro-MMP-9 de longitud completa con el dominio OG reconstruido, con respecto a los datos experimentales. Las curvas calculadas de los tres mejores modelos se muestran en líneas de color verde, cian y amarilla. Los datos experimentales se representan como puntos negros. Los tres mejores modelos del dominio OG se calcularon usando RAPPER [38, 39] dentro del modelo CHADD. La Figura 2E ilustra la reconstrucción estructural del dominio OG. Los tres mejores modelos se muestran en la representación de cintas de color verde, cian y amarillo.

Las FIGs 3A-F son gráficos e imágenes de MFA de pro-MMP-9 natural y mutada. El glutaraldehído sirvió como engarce covalente entre la amina en la superficie de la proteína. Todas las exploraciones emplearon una punta en espiga. Figuras 3A-C: exploraciones en modo semiseco de pro-MMP-9 natural. Figuras 3D-F: exploraciones en modo semiseco del mutante pro-MMP-9ΔOG. Las Figuras 3A y 3D son representaciones 2D. Las Figuras 3B y 3E son representaciones 3D. Las Figuras 3C y 3F son secciones transversales XZ a lo largo de la línea discontinua mostrada en la Figura 3A y Figura 3D. Para la preparación de muestras y condiciones de formación de imágenes, véase el texto. La barra de la derecha indica una escala de altura en la que el eje Z varía de 0 a 50 Å (de color oscuro a claro).

30 Las FIGs 4A-F son histogramas de distribución por tamaños de pro-MMP-9 natural (izquierda) y pro-MMP-9ΔOG (derecha) medido por MFA. El eje y de todos los histogramas es la frecuencia normalizada obtenida dividiendo los recuentos entre la población total. Las Figuras 4A y 4B - distribución en altura. Las Figuras 4C y 4D - distribución en anchura. Los valores de anchura se corrigieron como se describe en la sección de procedimientos experimentales. La Figura 4E ilustra la distribución lóbulo a lóbulo de la pro-MMP-9 natural. La separación entre lóbulos en pro-MMP-9ΔOG no pudo resolverse. La Figura 4F ilustra los estados conformacionales de modelado de la pro-MMP-9. Una desviación típica de 9,5 Å, calculada de acuerdo con los datos MFA lóbulo a lóbulo, se restó (izquierda), o se añadió (derecha) a la separación inter-dominio de la estructura promediada (central) obtenida por reconstrucción estructural SAXS. Los dominios N y C terminales [22, 24] se representan mediante animación de color azul y rojo, respectivamente. El dominio OG se reconstruyó mediante RAPPER [38, 39] y se representa mediante trazado C α de color verde

Las FIGs 5A-B ilustran modelos de pro-MMP-9 reconstruidos obtenidos por SAXS. La Figura 5A es un modelo GASBOR. La Figura 5B es un modelo CHADD. Las esferas blancas con un radio de 5 Å representan los modelos obtenidos. Las estructuras cristalinas acopladas de los dominios N y C terminal se representan mediante animación de color azul y rojo, respectivamente. Cada modelo giró a 0° y 90° a lo largo del eje vertical. 45 Las FIGs 6A-C son imágenes MFA de pro-MMP-9. El glutaraldehído sirvió como un engarce covalente entre la amina en la superficie de la proteína. Todas las exploraciones emplearon una punta en espiga, excepto para la de la Figura 6A que usó una punta de nitruro de silicio con acabado en óxido. Figura 6A: pro-MMP-9 natural en solución tampón. Figura 6B: muestra deshidratada de la enzima natural explorada en condiciones ambientales. Figura 6C: muestra blanco sometida al mismo procedimiento de inmovilización sin aplicar la enzima. La flecha indica una sola partícula observada en la exploración 1x1? m². La barra de la derecha indica una escala en altura en la que el eje Z varía de 0 a 50 Å (de color oscuro a claro).

FIGs. 7A-B: La FIG. 7A ilustra una zimografía *in situ* de células HT1080 que expresan la MMP-9 secretada. La detección de fluorescencia verde es indicativa de actividad proteolítica de colágeno de tipo IV. El azul indica tinción nuclear (Hoechst). La Figura 7B ilustra la incubación de células HT1080 con anti-MMP (9 h) y después cubierta con colágeno de tipo IV conjugado con verde Oregón. La ausencia de fluorescencia verde pronunciada alrededor de las células indica inhibición de proteólisis pericelular por MMP-9.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención se refiere a reguladores de la MMP-9 y, más particularmente, a reguladores dirigidos hacia el dominio OG de la misma.

60 Los principios y funcionamiento de la presente invención pueden comprenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones que se adjuntan.

Antes de explicar con detalle al menos una realización de la invención, debe entenderse que la aplicación de la invención no se limita a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los ejemplos. La invención puede tener otras realizaciones o puede llevarse a la práctica o realizarse de diversas maneras. Además, debe entenderse que las frases y términos empleados en el presente documento se proporcionan como descripción y no deben considerarse limitantes.

Los miembros de la familia de las metaloproteinasas (MMP) se han implicado en numerosos aspectos de la migración de células inflamatorias y cancerosas a través de los tejidos conectivos, promoviendo muchas patologías. Aunque todas las MMP comparten sitios catalíticos similares, sus sitios de unión al sustrato difieren. Como consecuencia, diferentes MMP tienen diferentes funciones biológicas. Por ejemplo, la MMP-9 promueve la lesión e inflamación tisular, mientras que la MMP-2 comprende principalmente funciones antiinflamatorias y homeostáticas. Esto implica que inhibidores selectivos, que discriminan entre estas enzimas altamente similares, son cruciales para una terapia antiinflamatoria eficaz sin efectos secundarios.

Al mismo tiempo que se diseña la invención, los autores de la misma han llegado a comprender que principal diferencia estructural entre la MMP-9 y la MMP-2 es la presencia de un dominio ampliamente O-glucosilado (OG) en la MMP-9. Sin embargo, la información estructural disponible sobre la MMP-9 se limita a sus dos dominios terminales, que no incluye este dominio OG. Como tal, no existe información relacionada con la influencia del dominio OG en la estructura 3D global de la MMP-9 y su naturaleza biofísica.

Al mismo tiempo que la presente invención se reduce a la realización práctica, los autores de la misma han realizado un análisis estructural novedoso que combina la dispersión de rayos X en ángulos pequeños (SAXS) con formación de imágenes con microscopía de fuerza atómica (MFA) de molécula sencilla para caracterizar la primera estructura de longitud completa de la pro-MMP-9 y el carácter molecular de su dominio engarzador O glucosilado. La SAXS seguido de formación de imágenes y análisis de reconstrucción estructural proporciona la forma molecular de la pro-MMP-9 de longitud completa representando su conformación media en solución (Figuras 2A-E). Esta estructura, respaldada mediante la formación de imágenes con MFA de alta resolución (Figuras 3A-F y 4A-E) y mediciones biofísicas, muestra una proteína alargada actuando el dominio OG como un engarce alargado, flexible, de 30 Å entre los dos dominios terminales (Figuras 5A-B). El grado de flexibilidad del dominio OG se evaluó estadísticamente a partir de las diversas conformaciones de proteína detectadas por formación de imágenes de moléculas sencillas (Figura 4F). El modelo dinámico estructural de longitud completa de la pro-MMP-9 proporciona nuevas perspectivas sobre la función de la flexibilidad del dominio de la proteína en la regulación del reconocimiento, unión y procesamiento de sustratos, ligandos y receptores, necesaria para las actividades de la MMP-9.

Mientras que adicionalmente la presente invención se reduce a la realización práctica, los autores de la misma mostraron por zimografía *in situ* que un anticuerpo capaz de interactuar específicamente con el dominio OG de la MMP-9, bloqueaba su actividad colagenolítica, pero no su actividad gelatinolítica (Figuras 7A-B). Por tanto, los autores de la presente invención sugieren que, para controlar las actividades patológicas de esta enzima, pueden usarse agentes que regulen la flexibilidad del dominio OG.

Por tanto, un procedimiento de regulación de una actividad de la metaloproteinasa 9 (MMP-9) puede comprender poner en contacto la MMP-9 con un agente que interactúe específicamente con un dominio OG de la MMP-9, regulando así la actividad de la MMP-9.

Como se usa en el presente documento la expresión "MMP-9" (metaloproteinasa 9 de la matriz endopeptidasa con multidominio de cinc, denominada también gelatinasa B) se refiere a la forma precursora o activa del polipéptido MMP-9 de mamíferos (por ejemplo, ser humano), (EC 3.4.24.35; Swiss Prot N° P14780) incluyendo sus homólogos, ortólogos e isoformas. La MMP-9 comprende normalmente tres dominios-un dominio catalítico, un dominio de unión a sustrato y un dominio engarzador entre ellos. El dominio engarzador, denominado también en el presente documento dominio similar al colágeno V o dominio O-glucosilado (OG) comprende 64 aminoácidos, 22 de los cuales son restos de prolina, 6 de los cuales son restos de glicina y aproximadamente 12-14 son glucanos O unidos.

De acuerdo con una realización de este procedimiento, la MMP-9 es natural, es decir, no desnaturalizada. De acuerdo con otra realización, la MMP-9 es activa, preferentemente completamente activa.

Las actividades de la MMP-9 incluyen, pero sin limitación, actividades gelatinolíticas, degradación de colágenos naturales de tipo I, III y XI (actividades colagenolíticas), degradación de elastina, agregano, la cadena de laminina A y la proteína básica de mielina.

El término "regulación" como se usa en el presente documento se refiere a regulación negativa o regulación positiva. Se apreciará que, los agentes que inhiben la flexibilidad del dominio OG regularán negativamente una función de la MMP-9 que requiere que el dominio OG sea flexible, tal como su actividad colagenolítica. En cambio, las actividades que requieren una estructura 3D particular de la MMP-9 y que no requieren flexibilidad del dominio OG pueden regularse positivamente por agentes que interactúan con el dominio OG. Un ejemplo de dicha actividad es la actividad gelatinolítica o una capacidad de interactuar con receptores y/o factores de crecimiento.

Como se ha mencionado, el procedimiento de la invención se efectúa poniendo en contacto la MMP-9 con un agente capaz de interactuar específicamente con su dominio OG.

Como se usa en el presente documento, la expresión “poner en contacto” se refiere a permitir que la MMP-9 se ponga en contacto con el agente en condiciones (es decir, tiempo, temperatura, tampón) que permitan que el agente interactúe con su dominio OG (por ejemplo, la unión al dominio OG) y afecte a su rigidez. Se apreciará que la puesta en contacto puede efectuarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

5 La frase “que interactúe específicamente”, como se usa en el presente documento, se refiere a una afinidad potenciada hacia el dominio OG de la MMP-9 opuesta a otro dominio de la MMP-9 (por ejemplo dominio catalítico o dominio de unión a sustrato) y una afinidad potenciada hacia el dominio OG de la MMP-9 sobre un dominio OG de otra enzima metaloproteínasa, por ejemplo, la MMP-2. Un ejemplo de actividad mínima es probablemente 10^{-5} M. Preferentemente, el agente interactúa con el dominio OG de la MMP-9 con una afinidad al menos 3 veces mayor en comparación con lo anterior, más preferentemente, al menos con una afinidad 5 veces mayor, más preferentemente al menos con una afinidad 10 veces mayor o superior. Se apreciará que, dado que la secuencia de aminoácidos del dominio OG de la MMP-9 es específica para la MMP-9 (a diferencia de la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico que es muy homóloga entre la MMP-9 y la MMP-2), los agentes capaces de interactuar específicamente con el dominio OG de la MMP-9 son por tanto capaces de regular específicamente la MMP-9.

Los agentes (es decir moléculas) que contempla la presente invención, capaces de interactuar con el dominio OG de la MMP-9 incluyen, pero sin limitación, agentes polipeptídicos (por ejemplo, anticuerpos que comprenden un dominio de reconocimiento de antígenos que interactúa específicamente con un dominio OG de la MMP-9), péptidos y moléculas pequeñas. Se apreciará que los agentes pueden interactuar con el dominio OG basándose en el reconocimiento de la secuencia de aminoácidos específica y/o en el reconocimiento conformacional.

Los agentes anticuerpos que reconocen el dominio OG de la MMP-9 se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, de Sigma, Chemicon y Abcam.

El término “anticuerpo”, como se usa en la presente invención, incluye moléculas intactas así como sus fragmentos funcionales, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv que son capaces de unirse a las proteínas mitocondriales específicas. Los fragmentos de anticuerpo más pequeños pueden ser ventajosos sobre los anticuerpos completos ya que son capaces de penetrar en los tejidos más fácilmente y eliminarse más rápidamente del organismo. Esto es específicamente importante para el uso *in vivo* de anticuerpos específicos de MMP-9. Además, una ventaja adicional de los fragmentos de anticuerpo es que pueden producirse en bacterias o levaduras.

La generación de anticuerpos dirigidos contra el dominio OG de la MMP-9 puede efectuarse usando un péptido que comprenda el dominio OG. El anticuerpo puede seleccionarse usando otros dominios de la MMP-9 como controles negativos.

Los fragmentos de anticuerpos adecuados para la realización práctica de la presente invención incluyen una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena ligera de inmunoglobulina (denominada en el presente documento “cadena ligera”), una región determinante de la complementariedad de una cadena pesada de inmunoglobulina (denominada en el presente documento “cadena pesada”), una región variable de una cadena ligera, una región variable de una cadena pesada, una cadena ligera, una cadena pesada, un fragmento Fv, y fragmentos de anticuerpos que comprenden esencialmente regiones variables completas de cadenas tanto ligeras como pesadas, tal como un fragmento Fv, un Fv monocatenario, un Fab, un Fab' y un F(ab')₂.

Los fragmentos de anticuerpos funcionales que comprenden regiones variables completas o esencialmente completas de cadenas tanto ligeras como pesadas se definen como se indica a continuación:

- (i) Fv, definido como un fragmento modificado por ingeniería genética que consiste en la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresado como dos cadenas;
- (ii) Fv monocatenario (“scFv”, *single chain Fv*), una molécula monocatenaria modificada por ingeniería genética que incluye la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas mediante un engarce polipeptídico adecuado.
- (iii) Fab, un fragmento de una molécula de anticuerpo que contiene una parte de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima papaína para producir la cadena ligera intacta y el fragmento Fd de la cadena pesada que consiste en los dominios variable y CHI del mismo;
- (iv) Fab', un fragmento de una molécula de anticuerpo que contiene una parte de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina, seguido por reducción (por molécula de anticuerpo se obtienen dos fragmentos Fab') ; y
- (v) F(ab')₂, un fragmento de una molécula de anticuerpo que contiene una parte de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina (es decir, un dímero de fragmentos Fab' unidos entre sí mediante dos enlaces disulfuro).

En la técnica son bien conocidos los procedimientos para generar anticuerpos (es decir, monoclonales y policlonales). Los anticuerpos pueden generarse mediante cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica, cuyos métodos pueden emplear la inducción de la producción *in vivo* de moléculas de anticuerpo, la exploración de

bibliotecas de inmunoglobulina (Orlandi D. R. y col., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 3833-3837; Winter G. y col., 1991. Nature 349: 293-299) o la generación de moléculas de anticuerpo monoclonal mediante líneas celulares en cultivo continuado. Estos incluyen, pero sin limitación, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos, y la técnica del hibridoma - virus de Epstein-Barr (EBV) (Kohler G. y col., 1975. Nature 256: 495-497; Kozbor D. y col., 1985. J. Immunol. Methods 81: 31-42; Cote RJ. y col., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 2026-2030; Cole SP. y col., 1984. Mol. Cell. Biol. 62:109-120).

En los casos en los que los antígenos diana sean demasiado pequeños para suscitar una respuesta inmunogénica adecuada cuando se generan anticuerpos *in vivo*, dichos antígenos (haptenos) pueden acoplarse a vehículos antigénicamente neutros tales como hemocianina de lapa californiana (KLH) o albúmina de suero [por ejemplo, vehículos de albúmina de suero bovino (BSA)] (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.189.178 y 5.239.078]. El acoplamiento de un hapteno con un vehículo puede efectuarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede efectuarse acoplamiento directo con grupos amino y opcionalmente seguido de reducción del engarce imino formado. Como alternativa, el vehículo puede acoplarse usando agentes de condensación tales como diciclohexil carbodiimida u otros agentes carbodiimida deshidratantes. También pueden usarse compuestos engarzadores para efectuar el acoplamiento; se dispone de engarces homobifuncionales y heterobifuncionales en Pierce Chemical Company, Rockford, Ill. El complejo inmunogénico resultante puede después inyectarse en sujetos mamíferos adecuados tales como ratones, conejos y similares. Los protocolos adecuados implican la inyección repetida del inmunógeno en presencia de adyuvantes de acuerdo con un programa que refuerce la producción de anticuerpos en el suero. Las titulaciones del suero inmunitario pueden medirse fácilmente usando procedimientos de inmunoensayo bien conocidos en la técnica.

Los antisueros obtenidos pueden usarse directamente o pueden obtenerse anticuerpos monoclonales como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos usando procedimientos bien conocidos en la técnica "[véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, (1988)]. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en células de *E. coli* o de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster Chino u otros sistemas de expresión de proteínas) del ADN que codifica el fragmento.

Como alternativa, los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante procedimientos convencionales. Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, pueden producirse fragmentos de anticuerpos (Fab')₂ mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S. Adicionalmente, este fragmento puede escindirse usando un agente reductor tiol y opcionalmente un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo dando resultantes de la escisión de engarces disulfuro para producir fragmentos monovalentes Fab' 3,5S. Como alternativa, la escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. En la bibliografía de la técnica se proporciona una amplia orientación para llevar a la práctica dichos procedimientos (por ejemplo, con referencia a: Goldenberg, Patentes de Estados Unidos N° 4.036.945 y 4.331.647; Porter, RR., 1959. Biochem. J. 73: 119-126). También pueden usarse otros procedimientos de escisión de anticuerpos, tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno reconocido por el anticuerpo intacto.

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, un Fv está compuesto por dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada emparejados. Esta asociación puede ser no covalente (véase, por ejemplo, Inbar y col., 1972. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69: 2659-62). Como alternativa, como se ha descrito anteriormente en el presente documento los dominios variables pueden unirse para generar un Fv monocatenario mediante un enlace disulfuro intermolecular, o como alternativa, dichas cadenas pueden reticularse mediante productos químicos tal como glutaraldeído.

Preferentemente, el Fv es un Fv monocatenario.

Los Fv monocatenarios se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada conectados mediante un oligonucleótido que codifica un engarce peptídico. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula huésped tal como *E. coli*. Las células huéspedes recombinantes sintetizan una cadena polipeptídica sencilla con un péptido engarzador que forma un puente entre los dos dominios variables. En la bibliografía de la técnica se proporciona una amplia orientación para producir los Fv monocatenarios (por ejemplo, con referencia a: Whitlow y Filipula, 1991. Methods 2: 97-105; Bird y col., 1988. Science 242: 423-426; Pack y col., 1993. Bio/Technology 11: 1271-77; y Ladner y col., Patente de Estados Unidos N° 4.946.778).

Pueden obtenerse péptidos aislados de la región determinante de la complementariedad construyendo genes que codifiquen la región determinante de la complementariedad de un anticuerpo de interés. Dichos genes pueden prepararse, por ejemplo, mediante RT-PCR de ARNm de una célula productora de anticuerpos. En la bibliografía de la técnica se proporciona una amplia orientación para llevar a la práctica dichos procedimientos (por ejemplo, con

referencia a Larrick y Fry, 1991. *Methods* 2: 106-10).

Se apreciará que para la terapia en seres humanos, se usan preferentemente anticuerpos humanizados. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos modificados por ingeniería genética o fragmentos de anticuerpos que tienen preferentemente partes mínimas derivadas de anticuerpos no humanos. Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos en los que las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo humano (anticuerpo receptor) se sustituyen por restos de una región determinante de la complementariedad de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tienen la funcionalidad deseada. En algunos casos, los restos marco conservados Fv del anticuerpo humano se sustituyen por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la región determinante de la complementariedad importada ni en las secuencias marco conservadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones determinantes de la complementariedad corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas, o sustancialmente todas, las regiones marco conservadas corresponden a las de una secuencia consenso humana relevante. De manera óptima, los anticuerpos humanizados también incluyen al menos una parte de una región constante de anticuerpo, tal como una región Fc, normalmente derivada de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Jones y col., 1986. *Nature* 321: 522-525; Riechmann y col., 1988. *Nature* 332: 323-329; Presta, 1992. *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596).

En la técnica son bien conocidos los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos importados que normalmente se extraen de un dominio variable importado. La humanización puede realizarse esencialmente como describen (véase, por ejemplo: Jones y col., 1986. *Nature* 321: 522-525; Riechmann y col., 1988. *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen y col., 1988. *Science* 239: 1534-1536; Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567) sustituyendo regiones humanas determinantes de la complementariedad por regiones correspondientes de determinantes de la complementariedad de roedores. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente procedente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados pueden ser normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región determinante de la complementariedad y posiblemente algunos restos marco conservados se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

También pueden producirse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos [véase, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, 1991. *J. Mol. Biol.* 227: 381; Marks y col., 1991. *J. Mol. Biol.* 222: 581; Cole y col., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, páginas 77 (1985); Boerner y col., 1991. *J. Immunol.* 147: 86-95]. También pueden prepararse anticuerpos humanizados introduciendo en animales transgénicos secuencias que codifiquen locus de la inmunoglobulina humana, por ejemplo, en ratones en los que los genes endógenos de inmunoglobulina se han inactivado parcial o completamente. Después de la exposición antigénica, se observa que la producción de anticuerpos humanos en dichos animales se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los sentidos, incluyendo reordenamiento génico, ensamblaje de cadenas y repertorio de anticuerpos. En la bibliografía de la técnica se proporciona una amplia orientación para la realización práctica de dicho enfoque (por ejemplo, con referencia a: las Patentes de Estados Unidos Nº 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 y 5.661.016; Marks y col., 1992. *Bio/Technology* 10: 779-783; Lonberg y col., 1994. *Nature* 368: 856-859; Morrison, 1994. *Nature* 368: 812-13; Fishwild y col., 1996. *Nature Biotechnology* 14: 845-51; Neuberger, 1996. *Nature Biotechnology* 14: 826; Lonberg y Huszar, 1995. *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93).

Para identificar supuestos agentes capaces de regular específicamente la MMP-9, puede evaluarse un agente con respecto a su capacidad de interactuar con el dominio OG de la MMP-9.

Por tanto, para determinar si un agente es un regulador específico de la MMP-9 puede proporcionarse un procedimiento que comprenda determinar si el agente es capaz de interactuar con un dominio OG de la MMP-9, siendo el agente un supuesto regulador específico de la MMP-9.

A través de una meticulosa experimentación, los autores de la presente invención han descubierto la estructura 3D de la pro-MMP-9 de longitud completa. La estructura 3D de la MMP-9 completa descrita en el presente documento puede usarse en el diseño lógico de fármacos que modulen (preferentemente inhiban) la acción de la MMP-9. Estos moduladores de la MMP-9 pueden usarse para impedir o tratar las propiedades físicas y farmacológicas no deseables de la actividad de la MMP-9. Por tanto, de acuerdo con una realización de este procedimiento, puede evaluarse un agente con respecto a su capacidad para regular específicamente la MMP-9 comparando su estructura con la estructura del dominio OG de la MMP-9. Esto puede realizarse usando modelos por ordenador de la MMP-9 de longitud completa tales como los generados por los autores de la presente invención usando programas tales como GASBOR y CHADD. Este procedimiento puede ser particularmente adecuado para identificar agentes peptídicos y moléculas pequeñas.

Una vez que se dispone de la estructura del agente, pueden diseñarse péptidos que encajen en la estructura 3D del dominio OG y lo estabilicen satisfactoriamente o lo alteren. Dichos péptidos/moléculas pequeñas pueden explorarse para unirse específicamente al dominio OG.

5 La generación de peptidomiméticos, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, puede efectuarse usando diversos enfoques, incluyendo, por ejemplo, técnicas de presentación.

En la técnica son bien conocidos los procedimientos para construir dichas bibliotecas de presentación. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en Young AC, y col., "The three-dimensional structures of a polysaccharide binding antibody to *Cryptococcus neoformans* and its complex with a peptide from a phage display library: implications for the identification of peptide mimotopes" *J Mol Biol* 1997 Dec 12; 274(4): 622-34; Giebel LB y col. "Screening of cyclic peptide phage libraries identifies ligands that bind streptavidin with high affinities" *Biochemistry* 1995 noviembre 28; 34(47): 15430-5; Davies EL y col., "Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes" *J Immunol Methods* 1995 octubre 12; 186(1): 125-35; Jones C RT al. "Current trends in molecular recognition and bioseparation" *J Chromatogr A* 1995 julio 14; 707(1): 3-22; Deng SJ y col. "Basis for selection of improved carbohydrate-binding single-chain antibodies from synthetic gene libraries" *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* 23 de mayo 1995; 92(11): 4992-6; y Deng SJ y col. "Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display" *J Biol Chem* 1994 abril 1; 269(13): 9533-8.

También pueden descubrirse péptido miméticos usando biología informática. Por ejemplo, diversos compuestos pueden analizarse informáticamente con respecto a su capacidad para unirse al dominio OG usando diversas herramientas informáticas tridimensionales como se describe más adelante en la sección de Ejemplos del presente documento. Pueden utilizarse programas informáticos útiles para presentar modelos estructurales tridimensionales, tales como RIBBONS (Carson, M., 1997. *Methods in Enzymology* 277, 25), O (Jones, TA, y col., 1991. *Acta Crystallogr.* A47, 110), DINO (DINO: Visualizing Structural Biology (2001) www.dino3d.org); y QUANTA, INSIGHT, SYBYL, MACROMODE, ICM, MOLMOL, RASMOL y GRASP (revisados en Kraulis, J., 1991. *Appl Crystallogr.* 24, 946) para modelar interacciones entre el dominio OG y los presuntos péptidomiméticos para identificar de esta manera péptidos que presentan la mayor probabilidad de unirse a la región OG. El modelado informatizado de interacciones proteína-péptido se ha usado con éxito en diseños lógicos de fármacos, para detalles adicionales, véase Lam y col., 1994. *Science* 263, 380; Wlodawer y col., 1993. *Ann Rev Biochem.* 62, 543; Appelt, 1993. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 1, 23; Erickson, 1993. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 1, 109, y Mauro MJ. y col., 2002. *J Clin Oncol.* 20, 325-34.

De acuerdo con otra realización de este aspecto de este procedimiento, un agente puede evaluarse con respecto a su capacidad para regular específicamente la MMP-9 incubando el agente con la MMP-9 aislada. Dado que se conoce la secuencia de aminoácidos de la MMP-9, usando tecnología convencional de ADN recombinante o síntesis química puede generarse la MMP-9 aislada, o un fragmento de la misma, que comprenda el dominio OG. Para ensayar la unión del agente a la diana pueden usarse técnicas convencionales de marcaje de proteínas. El marcaje puede ser directo (por ejemplo, mediante marcaje de la MMP-9 con S35) o indirecto, tal como mediante el uso de anticuerpos secundarios. Para ensayar la unión del agente pueden usarse procedimientos inmunológicos (ELISA, inmunoprecipitación) y bioquímicos (por ejemplo, filtración en gel) convencionales.

Una vez identificados los supuestos agentes, pueden ensayarse con respecto a su capacidad para regular las funciones de la MMP-9 y su capacidad para ser selectivos hacia la MMP-9. Un ejemplo de dicho ensayo es el análisis zimográfico *in situ* de la actividad colagenolítica, descrito más adelante en el ejemplo 7 del presente documento.

Como se ha mencionado, se sabe que la MMP-9 es una diana prototípica en enfermedades inflamatorias, debido a sus funciones en lesiones tisulares y procesamiento de proteínas solubles que promueven la inflamación, incluyendo inhibidores de proteasa, quimiocinas y citocinas. Por lo tanto, para tratar trastornos relacionados con la MMP-9 pueden usarse agentes capaces de regular negativamente actividades de la MMP-9.

Por tanto, puede proporcionarse un procedimiento de tratamiento de una afección médica mediada por MMP-9, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que interactúe específicamente con un dominio OG de la MMP-9, tratando de este modo la afección médica mediada por la MMP-9.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sujeto que lo necesite" se refiere a un mamífero, preferentemente a un sujeto humano.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a prevenir, curar, invertir, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir o detener los efectos perjudiciales de una afección o enfermedad mediada por la MMP-9.

55 La frase "afección médica mediada por MMP-9" se refiere a una enfermedad o a un trastorno en el que su aparición o progresión puede atribuirse a la MMP-9. El cáncer, por ejemplo, cáncer metastásico tal como cáncer de mama, de ovario, de hueso, de pulmón, de páncreas y de próstata, es un ejemplo de una afección médica mediada por la MMP-9.

- Además de desempeñar una función en el cáncer, la MMP-9 puede estar implicada en otras patologías, por ejemplo, en la artritis o en enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple (Firestein, *Curr. Opin. Rheumatol.* 4: 348-354 (1992); Gijbels y col., *J. Neuroimmunol.* 41: 29-34 (1992)). Por ejemplo, se han detectado altos niveles de MMP-9 en suero y en líquido sinovial de pacientes con artritis inflamatoria tal como artritis reumatoide en comparación con pacientes sanos o pacientes con osteoartritis (Ahrens y col., *Arthritis & Rheumatism* 39: 1576-87 (1996); Gruber y col., *Clin. Immunol. & Immunopathol.*, 78: 161-171 (1996)). Además, se ha descrito una correlación entre la puntuación de actividad artrítica de una artículación y la cantidad de MMP-9 en el líquido sinovial aspirado (Koolwijk y col. *J. Rheumatology*, 22: 385-393 (1995)).
- La expresión de MMP-9 también se detecta en enfermedades del sistema nervioso. Por ejemplo, en comparación con tejido de cerebro normal, se ha encontrado una importante expresión de MMP-9 en astrocitos y macrófagos reactivos en lesiones desmielinizantes (Cuzner y col., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55: 1194-1204 (1996)). La expresión de MMP-9 es elevada en pacientes con encefalomielitís (Gijbels, y col., *J. Neuro. Res.* 36: 432-440 (1993); Proost, y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 192: 1175-1181 (1993)), en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple (Leppert, y col., *Brain* 121: 2327-2334 (1998); Rosenberg y col., *Brain Res.*, 703: 151-155(1995)) y en pacientes con demencia relacionada con el SIDA (Conant, y col., *Annals of Neurology* 46: 391-398 (1999)). Además, en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica, se observa expresión de MMP-9 en las neuronas piramidales de la corteza motora y en las neuronas motoras de la médula espinal (Lim y col., *J. Neurochem.*, 67: 251-259 (1996)).
- La MMP-9 también se ha asociado con diversas otras enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, en la pared de los vasos de aneurismas aórticos se encuentra un alto nivel de actividad de MMP-9 (Freestone, y col. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*, 15: 1145-1151 (1995); Newman y col., *Connective Tissue Research*, 30: 265-276, (1994); Sakalihan y col., *J. Vascular Surgery*, 24: 127-33 (1996)). Además, pacientes con arteritis de células gigantes tienen mayores niveles de MMP-9 y se encuentra ARNm de MMP-9 en células del músculo liso y fibroblastos en las regiones de tejido elástico fragmentado en la lámina media de vasos inflamados (Sorbi, y col., *Arthritis & Rheumatism*, 35: 1747-1753 (1996)). También se encuentran mayores niveles de MMP-9 en esputo de pacientes con fibrosis quística y en fluidos de lavado broncoalveolar de pacientes con bronquiectasias (Delacourt y col., *Amer. J. Respiratory & Critical Care Med.*, 152: 765-764 (1995); Sepper y col, *Chest*, 106: 1129-1133 (1994)). También se han encontrado altos niveles de MMP-9 en fluidos ampollosos procedentes de lesiones dérmicas de pacientes con penfigoide ampolloso (Stahle-Backdahl y col., *J. Clinical Invest.*, 93: 2022-2030 (1994)).
- La expresión de MMP-9 también se ha implicado en la patogénesis de diversas otras enfermedades. Por ejemplo, se ha implicado la MMP-9 en la enfermedad renal poliquística (Murray y col., *Conn. Tissue Res.*, 33: 249-256 (1996)), nefropatía membranosa (McMillin y col., *J. Clin. Invest.*, 97: 1094-1101 (1996)) y enfermedad de Alzheimer (Lim y col., *J. Neurochem.*, 68: 1606-1611 (1997)).
- Por consiguiente, la presente invención contempla el tratamiento de todas las afecciones o enfermedades indicadas anteriormente usando agentes capaces de interactuar selectivamente con el dominio OG de la MMP-9.
- Los agentes de la presente invención pueden administrarse al sujeto como tal, o como parte de una composición farmacéutica, que también incluye un vehículo fisiológicamente aceptable. La finalidad de una composición farmacéutica es facilitar la administración del principio activo a un organismo.
- Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. La finalidad de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "principio activo" se refiere al agente responsable del efecto biológico deseado, es decir, regulación negativa de una actividad de MMP-9.
- En lo sucesivo en el presente documento, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", que pueden usarse de modo indistinto, se refieren a un vehículo o a un diluyente que no produce irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado. En estas frases se incluye un adyuvante. Uno de los principios incluidos en el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio intervalo de solubilidad en medios tanto orgánicos como acuosos [Mutter y col. (1979)].
- En el presente documento, el término expresión "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a la composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Como ejemplos, sin limitación, de excipientes se incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.
- Pueden encontrarse técnicas de formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, la administración oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares así como inyecciones directas intratecales, intraventriculares, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

- 5 Como alternativa, puede administrarse una preparación de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, inyectando la preparación directamente en una región específica del cuerpo de un paciente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante procedimientos de mezcla, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales.

- 10 Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesado de los principios activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La correcta formulación depende de la vía de administración seleccionada.

- 15 Para inyección, los principios activos de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa, en la formulación se usan penetrantes apropiados para atravesar la barrera. Dichos penetrantes son comúnmente conocidos en la técnica.

- 20 Para administración oral, la composición farmacéutica puede formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten formular la composición farmacéutica como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas de uso oral pueden prepararse usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla de resultante y procesando la mezcla de gránulos, añadiendo después productos auxiliares adecuados según se desee, para obtener núcleos de comprimidos o de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas, tales como, azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una de sus sales, tal como alginato sódico.

- 30 Se proporcionan núcleos de grageas, con revestimientos adecuados. Para esta finalidad, pueden usarse soluciones de azúcares concentrados que, opcionalmente, pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca, y disolventes o mezclas de disolventes orgánicos adecuados. Para identificar o distinguir diferentes combinaciones de dosis de los compuestos activos pueden añadirse colorantes o pigmentos a los revestimientos de los comprimidos o grageas.

- 35 Las composiciones farmacéuticas, que pueden usarse por vía oral, incluyen cápsulas de ajuste por presión fabricadas con gelatina así como cápsulas herméticas blandas fabricadas con gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los principios activos mezclados con cargas tales como lactosa, aglutinantes, tales como, almidones, lubricantes, tales como, talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los principios activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración seleccionada.

Para administración bucal, las composiciones pueden tener forma de comprimidos o de pastillas para chupar formuladas de una manera convencional.

- 45 Para la administración por inhalación nasal, los principios activos para su uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador usando un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorofluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una dosis medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina, para su uso en un dispensador que contenga una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

- 50 Las preparaciones descritas en el presente documento pueden formularse para administración parenteral, 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 opcionalmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos u acuosos y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

- Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de los principios activos como suspensiones apropiadas para inyección basadas en aceite o agua. Como disolventes o vehículos lipófilos adecuados se incluyen aceites grasos, tales como, aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como, oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano, que aumentan la viscosidad de la suspensión. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.
- Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para la constitución, antes de su uso, con un vehículo adecuado, por ejemplo, una solución estéril, a base de agua apirógena.
- La composición farmacéutica de la presente invención también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.
- Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están incluidos en una cantidad eficaz para conseguir el propósito deseado. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de principios activos (por ejemplo, una construcción de ácido nucleico) eficaz para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de un trastorno (por ejemplo, isquemia) o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.
- La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra bien dentro de la habilidad del experto en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.
- Para cualquier preparación usada en los procedimientos de la invención, la dosificación o la cantidad terapéuticamente eficaz puede calcularse inicialmente a partir de ensayos realizados *in vitro* y en cultivos celulares. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir una concentración o titulación deseada. Dicha información puede usarse para determinar dosis, de un modo más preciso, útiles en seres humanos.
- La toxicidad y eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos de células o en animales experimentales. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro*, en cultivos de células y en estudios en animales pueden usarse en la formulación de una serie de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación puede seleccionarla el propio médico a la vista de la afección del paciente. (Véase por ejemplo Fingl, E. y col. (1975), "The Pharmacological Basis of Therapeutics," C. 1, pág. 1).
- La cantidad de dosificación e intervalos de administración pueden ajustarse individualmente para proporcionar suficientes niveles plasmáticos o cerebrales del principio activo para inducir o suprimir el efecto biológico (es decir, concentración mínimamente eficaz CME). La CME variará para cada preparación, pero puede calcularse a partir de datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para conseguir la CME dependerán de características individuales y de la vía de administración. Para determinar concentraciones plasmáticas pueden usarse ensayos de detección.
- Dependiendo de la gravedad y sensibilidad de la afección que vaya a tratarse, la dosificación puede ser única o una pluralidad de administraciones, durando la evolución del tratamiento desde varios días a varias semanas, o hasta que se efectúe la curación o se consiga la disminución de la patología.
- La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se esté tratando, de la gravedad de la afección, del modo de administración, del criterio del médico tratante, etc.
- Si se desea, las composiciones de la presente invención pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o de plástico, tal como un envase de tipo blister. El envase o dispositivo dispensador puede incluir instrucciones para la administración. El envase o dispositivo dispensador también puede incluir información en un formulario prescrito por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, cuya información refleje la aprobación de la agencia de la forma de las composiciones para la administración veterinaria o a seres humanos. Dicha información puede incluir, por ejemplo, el etiquetado aprobado por la U.S. Food and Drug Administration para la prescripción de fármacos o un prospecto del producto autorizado. Las composiciones que comprenden una preparación de la invención, formuladas en un vehículo farmacéuticamente aceptable, también pueden prepararse, colocarse en un envase apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada, como se ha descrito anteriormente con detalle.
- Otros objetos, ventajas y nuevas características de la presente invención, serán obvios para un experto habitual en la técnica después de examinar los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, como se han definido anteriormente en

el presente documento y como se reivindica más adelante en la sección de reivindicaciones, encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

5 A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las anteriores descripciones, ilustran la invención de una manera no limitativa.

Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley y Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley y Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías como se expone en las Patentes de Estados Unidos Nos 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Volúmenes 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se considera que los procedimientos del presente documento son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

Materiales y procedimientos generales

30 **Expresión de MMP-9:** La pro-MMP-9 recombinante se expresó por infección de células de insecto Sf9 con un baculovirus que portaba el ADNc de la proMMP-9 humana [19]. Se centrifugaron cantidades en litros de líquidos de cultivo celular, se filtraron y se purificaron hasta la homogeneidad por cromatografía en gelatina-Sefarosa [52]. El material se dializó ampliamente en Tris 100 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM (tampón C) antes de procesar posteriormente y en este estudio se usaron aproximadamente 20 mg. De manera similar se preparó un mutante que carecía del dominio OG (MMP-9? OG) [19].

40 **Dispersión X-my a bajos ángulos:** se realizaron experimentos SAXS en solución en la estación 2.1 [53] de la Fuente de Radiación Synchrotron, Daresbury Laboratory, RU, siguiendo los procedimientos convencionales. Antes de medirse, la solución con la proteína se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 x g a una temperatura de 4 °C. Se recopilaron curvas de dispersión con un contador proporcional multialámbrico bidimensional, a distancias de 1m de muestra con respecto a detector (7 mg/ml, 100 µl) y 4,25 m (0,8, 1,6, 2,5 mg/ml, 100 µl), a una longitud de onda (λ) de 1,54 Å, cubriendo el intervalo de transferencia del momento $0,008 < q < 0,78 \text{ \AA}^{-1}$ ($q = 4\pi\sin\theta/\lambda$, en el que 2θ es el ángulo de dispersión). Los datos se recopilaron en 30 intervalos sucesivos de 1 minuto, y después se normalizaron con respecto a la intensidad del rayo de incidencia, se integraron radialmente sobre un sector de 60°, se calculó la media sobre el número de intervalos y se normalizaron con respecto a la respuesta del detector. Después, la dispersión del tampón se sustrajo y se combinaron curvas del ángulo bajo y alto sobre el intervalo q de 0,05-0,15 Å⁻¹. La reproducibilidad de la intensidad en función del tiempo se confirmó por la ausencia de lesión por radiación de la muestra pro-MMP-9 monomérica. El radio de giro (R_g) se evaluó usando la aproximación de Guinier: $I(q) = I(0)\exp(-q^2 R_g^2/3)$ para $qR_g < 1,3$ [54], y también a partir de la curva de dispersión completa con el programa GNOM de transformación indirecta de Fourier [55]. El programa GNOM también proporciona la función de distribución de la distancia $p(r)$ de la partícula y su dimensión máxima D_{max} , definida como el punto en el cual la $p(r)$ se transforma en cero. Para determinar la $p(r)$, la $p(0)=0$ y la $p(D_{max})$ se asignaron libres, en el primer caso, para juzgar si el intervalo r seleccionado era correcto. La D_{max} fue el valor más bajo que produjo la $p(D_{max})$ positiva más baja. Después de fijar la D_{max} , la $p(0)$ y la $p(D_{max})$ se fijaron a cero. Después, los datos se cortaron en la región del ángulo bajo y alto hasta que convergieron las funciones $p(r)$.

55 Para calcular sus curvas de dispersión teóricas correspondientes, se analizaron las estructuras cristalinas de los dos dominios de la MMP-9 (dominio catalítico N terminal y dominio C terminal similar a hemopexina) usando el programa CRYSOLOG [36]. Estas se transformaron adicionalmente por Fourier para producir sus funciones teóricas de distribución de pares, al mismo tiempo que se calcularon los valores D_{max} y R_g . Más adelante se describe con detalle el modelado desde el principio (*Ab initio*) de las curvas SAXS. Se realizaron figuras estructurales con PyMOL (DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.

60

www.pymol.org).

Para confirmar adicionalmente la precisión del modelo, se calcularon sus propiedades hidrodinámicas en solución usando HYDROPRO [34], y después se compararon con los valores experimentales. El radio de la cubierta de las miniperlas varió de 2,2 a 4,2 Å en incrementos de seis. Usando el programa informático SEDNTERP se calculó la densidad y viscosidad del disolvente y el volumen específico parcial de las proteínas [27]. Los radios de las esferas para el modelo de cubierta hidrodinámico variaron entre 3,8 a 5,3 Å. El radio de los restos ficticios (RF) en el modelo SAXS es de 3,8 Å. Sin embargo, el tamaño real del modelo de cubierta es ligeramente mayor debido a la hidratación de las proteínas, aunque el grado de ampliación es difícil de determinar [34]. Previamente se sugirió que aumentando a 1,5 Å el radio de los RF podría sopesarse la fiabilidad de la hidratación [56].

Formación de imágenes al Microscopio de Fuerza Atómica: la formación de imágenes se realizó usando un microscopio de fuerza atómica Multimode (MMAFM Veeco/Digital Instruments, Santa Barbara, CA, Estados Unidos) equipado con un escáner E, con un intervalo de barrido máximo de $14 \times 14 \mu\text{m}^2$. Se realizaron formaciones de imágenes de las muestras en aire o en tampón usando el Modo de contacto intermitente (Tapping). Para obtener muestras sin artefactos de adsorbatos falsos, principalmente deposición de sales, se necesitó un procedimiento de aclarado agresivo. Usando las superficies de silano modificadas con amina y el procedimiento de reticulación, fue posible preparar superficies que eliminasen casi todo el fondo (determinado mediante desarrollos con blanco), manteniendo al mismo tiempo una concentración significativa de proteínas en la superficie.

Para minimizar la cantidad de la fuerza aplicada, el punto de ajuste de amplitud se ajustó al valor máximo que daba un rastro estable. Se obtuvieron imágenes de alta resolución de muestras biológicas en el aire usando sondas "HI'RES™ DP14-con puntas en "espiga" de Mikromasch (Estonia). Estas sondas tienen una frecuencia de resonancia de aproximadamente 160 kHz, una constante de fuerza de aproximadamente 5 N/m y un radio de curvatura clasificado de 1 nm o menor, pero solo son adecuadas para mediciones sobre superficies con rugosidades rms menores de 20 nm debido a la presencia de "espigas" adicionales que podrían ocasionar contactos múltiples sobre una superficie rugosa. Se usaron sondas DNP-S (Veeco) con radio nominal de 20 nm para las mediciones de líquidos, que se realizaron en la célula para líquidos MMAFM convencional. Los tamaños de las moléculas de proteína se determinaron a partir de análisis transversales. Los valores de anchura se corrigieron para ampliar por la punta, sustrayendo la envuelta de la punta como se observa a partir de una imagen SEM de alta resolución típica.

Cromatografía de exclusión por tamaños: La mezcla oligomérica de pro-MMP-9 se cargó en una columna Superdex-200 (300 x 10mm, Amersham Biosciences), preequilibrada y funcionando a 4 °C. El volumen de la muestra fue de 100 µl de pro-MMP-9 1,1 mg/ml y el caudal fue de 0,5 ml/min. La elución se controló mediante absorbancia a 280 nm. El radio de Stokes se determinó por análisis del tiempo de elución con respecto a una curva de calibrado usando un gráfico de Porath y un gráfico de Laurent y Killander [Siegel, L. M., y Monty, K. J. (1966). *Biochim Biophys Acta* 112, 346-362]. Para la curva de calibrado, las cinco proteínas patrón (Amersham Biosciences) de radios de Stokes conocidos fueron tiroglobulina (85 Å), ferritina (61 Å nm), catalasa (52.2 Å), aldolasa (48.1 Å) y albúmina (35.5 Å). El volumen de huecos medido por azul de dextrano tuvo un tiempo de retención, t_0 de 16,23 min y el volumen total determinado por la vitamina B-12 tuvo un tiempo de retención, t_T de 39,44 minutos. A partir de estos valores, el coeficiente de reparto de una proteína determinada, K_d , se determinó como: $K_d = (t_e - t_0) / (t_i - t_0)$, siendo t_e el tiempo de retención de una proteína determinada. Se obtuvieron resultados muy similares para los gráficos de Porath y de Laurent y Killander. Las incertidumbres en los tiempos de retención de tres conjuntos de experimentos de repetición fueron del 0,5 % por término medio. El ajuste lineal de mínimos cuadrados tuvo un coeficiente de correlación de $r^2 = 0,97$ para el gráfico de Porath y el de Laurent y Killander.

Sedimentación en gradiente de glicerol: Se estratificó una muestra (0,2 mg) de pro-MMP-9 purificada sobre cuatro tubos de polialómero que contenían gradiente de glicerol al 10-45 % (preparado en GradientMaster BioComp™) en tampón. Después, los tubos se centrifugaron en un rotor SW41 a 37.000 rpm durante 63 h a 4 °C. Después, el gradiente se fraccionó a muestras de 0,5 ml que se evaluaron para determinar la presencia de estructuras monoméricas y otras oligoméricas mediante zimografía con gelatina [Masure, S., Proost, P., Van Damme, J., y Opdenakker, G. (1991). *Eur J Biochem.* 198, 391-398]. Las fracciones que contenían estructuras monoméricas homogéneas se agruparon y se dializaron frente a tampón para eliminar el exceso de glicerol. La concentración de proteínas se determinó usando el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce).

Ultracentrifugación analítica: Se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación en un Beckman Optima XL-A de centrifugación analítica equipado con un rotor An-50 Ti. Los experimentos se realizaron a 20 °C en tampón C. Se cargó una muestra a una concentración de proteína de 0,4 mg/ml en células de trayectoria de 12 mm y se centrifugó a 50.000 rpm. Se registró la absorbancia a 280 nm cada 160 segundos usando un espaciador radial de 0,001 cm sobre el intervalo radial de 6-7,3 cm.

Los perfiles de sedimentación se analizaron usando el programa SEDFIT [Schuck, P. (2000). *Biophys J.* 78, 1606-1619] que permite evaluar el coeficiente de sedimentación (s). Se analizaron 130 curvas experimentales y la distribución del coeficiente de sedimentación, $c(s)$, se obtuvo entre 0,3 a 50 S a una resolución de 200 etapas en esta región, y un tamaño de cuadrícula de 500 puntos. El nivel de confianza para la parametrización se estableció a 0,9. Para calcular la densidad (ρ), que era de 1,0062 g/cm³, y la viscosidad (η), que era de 1,045 cP, del disolvente se usó el programa informático SEDNTERP [Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M., y Pelletier, S. L. (1992)

Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science (Cambridge, U.K.: Royal Society of Chemistry)]. El volumen específico parcial de las proteínas (v) se calculó en base a la composición de aminoácidos y de glucanos que era de 0,7328 cm³/gr, en la que se usaron los parámetros de aminoácidos de Kharakoz [Kharakoz, D. P. (1997). Biochemistry. 36, 10276-10285].

5 **Preparación de sustratos funcionalizados con amina para la formación de imágenes al MFA:** Se seleccionaron estas superficies por su alta concentración de grupos amina primarios que interaccionan con glutaraldeído que reticula y se une a la proteína. El glutaraldeído forma un enlace amida con un grupo de superficie amina. La amina libre del glutaraldeído reticula la proteína espontáneamente por interacción covalente con grupos amina generalmente presentes en la superficie externa de la proteína. Por tanto, no es necesario diseñar o modificar para fijar la proteína a la superficie. Además, este procedimiento solo perturba mínimamente la distribución aleatoria en la conformación y orientación de la proteína sobre la superficie.

10 Se describe brevemente la preparación y caracterización de los sustratos funcionalizados con amina usados para unirse específicamente a la proteína (Veeco Metrology, Inc Santa Barbara, CA Part Number FSUB-11). A partir de obleas <111> pulidas se trocearon microplacas de silicio de 1 cm² (International Wafer Service INC. - Dinamarca). La microplaca de silicio se modificó con un silano acabado en amina mediante deposición de vapor química potenciada con plasma (4th State, LLC, Belmont, CA) para crear un sustrato funcionalizado con amina. La composición de la superficie de los sustratos se analizó mediante Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (XPS) usando un Kratos Axis Ultra (Kratos, Manchester, RU) con una fuente de rayos x Al K α monocromada a 1486,6 eV tanto antes como después de la funcionalización de la amina. Los grupos amina, indicados por un pico de nitrógeno en el espectro XPS, estaban presentes en la superficie solo después de la funcionalización de la amina. La raíz cuadrática media (RMS) de la rugosidad de la superficie de los sustratos tratados fue de 1,8 Å, determinada por Microscopía de Fuerza Atómica (MFA) aplicando el modo de contacto intermitente, en aire con sondas OTESP (VEECO). Se usó un ensayo con Peroxidasa de Rábano Picante (HRP) para determinar la posible unión de los sustratos funcionalizados con amina. Se inmovilizaron anticuerpos marcados con HRP en el sustrato funcionalizado con amina a través de un reticulante de glutaraldeído. Los sustratos se sometieron a ultrasonido para eliminar todos los anticuerpos no unidos y después se analizaron con Sustrato Peroxidasa Componente TMB 1 SureBlue Reserve (Kirkegaard y Perry Labs, Maryland). La actividad de unión se determinó leyendo la absorbancia a 450 nm.

15 **Procedimiento de inmovilización de proteínas:** Las matrices aminizadas se conservaron en un deshidratador a 4 °C. Inmediatamente antes de su uso, la pro-MMP-9 se inmovilizó en los sustratos funcionalizados con amina a través de un reticulante de glutaraldeído mediante el siguiente procedimiento: durante una noche se incubó glutaraldeído al 1,25 % en solución de Carbonato Sódico 0,1 M (pH 9) sobre el sustrato funcionalizado con amina. Después, el sustrato se aclaró minuciosamente con solución de carbonato sódico para eliminar el glutaraldeído no unido. Después, un volumen de muestra de 100 μ l que contenía solución monodispersa 0,1 mg/ml de mutante pro-MMP9 Δ OG o pro-MMP-9 natural, fraccionado para contener la forma monomérica, se incubó sobre las matrices durante 3 horas. Las muestras se aclararon suavemente con tampón 2 x 200 μ l seguido por agua Milli-Q 5 x 200 μ l y finalmente se secaron con vapor de nitrógeno. El glutaraldeído sirvió como un reticulante covalente de la proteína a en la superficie aminizada. Esto garantizó una fuerte unión de las moléculas de proteína a la superficie durante el aclarado y posterior formación de imágenes. Para los experimentos de MFA procesados en tampón, las muestras se mantuvieron continuamente hidratadas.

20 **Modelado desde el principio de las curvas SAXS:** Para generar modelos de baja resolución se usaron los programas GASBOR [Svergun, D. I., Petoukhov, M. V., y Koch, M. H. (2001). Biophys J 80, 2946-2953] y CHADD [Petoukhov, M. V., Eady, N. A., Brown, K. A., y Svergun, D. I. (2002). Biophys J 83, 3113-3125]. Para tener en cuenta las glucosilaciones sobre la pro-MMP-9 se supuso que un solo glucano era equivalente a ~1,6 restos de aminoácidos de acuerdo con su densidad electrónica y longitud [Receveur, V., Czjzek, M., Schulein, M., Panine, P., y Henrissat, B. (2002). J Biol Chem. 277, 40887-40892]. También se observó que este valor representaba la relación entre los pesos moleculares medios de los glucanos y restos. El número total de RF se calculó, basándose en la secuencia de aminoácidos y en la composición de glucano que previamente se había caracterizado [Van den Steen, P. E., Van Aelst, I., Hvidberg, V., Piccard, H., Fiten, P., Jacobsen, C., Moestrup, S. K., Fry, S., Royle, L., Wormald, M. R., Wallis, R., Rudd, P. M., Dwek, R. A., y Opdenakker, G. (2006). J Biol Chem. 281, 18626-18637].

25 Para cada procedimiento se generaron diversos modelos de los mismos parámetros de entrada, para comprobar la convergencia del modelo con respecto a una sola solución a través del procedimiento de ajuste Monte-Carlo aleatorizado. Los modelos se inspeccionaron usando DAMAVER [Volkov, V. V., y Svergun, D.I. (2003). Journal of Applied Crystallography 36, 860-864] para seleccionar la solución más probable y calcular los valores promedio de discrepancias espaciales normalizadas (NSD) (véase Resultados de Datos Complementarios). Las estructuras cristalinas de los dominios terminales [Elkins, P. A., Ho, Y. S., Smith, W. W., Janson, C. A., D'Alessio, K. J., McQueney, M. S., Cummings, M. D., y Romanic, A. M. (2002). Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 58, 1182-1192; Cha, H., Kopetzki, E., Huber, R., Lanzendorfer, M., y Brandstetter, H. (2002). J Mol Biol 320, 1065-1079] se acoplaron después en el modelo representativo usando el programa informático SUPCOMB [Kozin, M. B., y Svergun, D. I. (2001). Journal of Applied Crystallography 34,33-41].

60

Análisis zimográfico in situ de la actividad colagenolítica: Se realizó zimografía *in-situ* [Deshane, 2003] incubando células de fibrosarcoma humano HT1080 (CCL-121; ATCC, Rockville, MD), con anti-MMP9hr 60 nM o tampón correspondiente para el control, y colágeno marcado 450 nM (colágeno de tipo IV marcado con verde Oregón que se inactiva intramolecularmente-Molecular probes) a 37 °C durante 16 horas. La degradación del colágeno produce la fluorescencia verde, que indica la actividad colagenolítica neta. Antes de realizar la formación de imágenes, las muestras se tiñeron con Hoechst 33258 (Molecular Probes) a una concentración final de 3,8 µg/ml para el marcaje nuclear. Las muestras se examinaron y se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia (E600; Nikon, Tokio, Japón) equipado con objetivos con Fluor conectados a una cámara CCD (DMX1200F; Nikon). El experimento se repitió seis veces. Las imágenes se ensamblaron usando Adobe Photoshop (Adobe systems, San Jose, CA).

Ejemplo 1

Aislamiento y caracterización de pro-MMP-9 en su forma monomérica

El tamaño molecular y la determinación de la forma, reconstrucción estructural y análisis de imágenes de moléculas sencillas de monómeros de pro-MMP-9 requiere muestras de proteínas monodispersas y homogéneas. El siguiente ejemplo describe una combinación de diversos procedimientos para expresar, aislar y caracterizar la forma monomérica de pro-MMP-9. Para validar la determinación espectroscópica de la forma se usó caracterización de radios molecular.

Resultados

La pro-MMP-9 recombinante se expresó y purificó de células Sf9 infectadas con baculovirus como se ha indicado anteriormente [19] (véase Materiales y Procedimientos). Esta enzima forma mezclas de monómeros y otras especies oligoméricas superiores [20].

La Figura 1B muestra la proporción molecular relativa del monómero pro-MMP-9 con respecto a su especie oligomérica como se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) analítica. El pico principal (Nº 3) en el cromatograma comprende el monómero pro-MMP-9 con un radio de Stokes de 45,4 Å (véase el inserto). El radio de Stokes se determinó en base al tiempo de retención correspondiente usando procedimientos convencionales.

El aislamiento de monómeros pro-MMP-9 de especies oligoméricas superiores en cantidades preparativas se consiguió mediante sedimentación en gradiente de glicerol [26]. La Figura 1C muestra el análisis zimográfico de las diversas fracciones. La fracción monomérica aislada se sometió a ultracentrifugación analítica (UCA) para un cálculo adicional de sus radios de Stokes (Fig. 1D). En este experimento de velocidad de sedimentación, una solución uniforme de pro-MMP-9 se sometió a un campo gravimétrico. Esto produce un empobrecimiento de soluto cercano al menisco y la formación de un límite bien definido entre la región empobrecida y la concentración uniforme del soluto en sedimentación (Figura 1D, inserto). La velocidad de movimiento de este límite puede medirse y conduce a la determinación de los coeficientes de sedimentación, que dependen directamente de la masa de las partículas e inversamente de la proporción de fricción, que es a su vez una medida eficaz de tamaño y forma.

Se observó que el monómero pro-MMP-9 sedimentaba como una sola especie representando el pico principal el 91 % de la proteína total en la muestra con un coeficiente de sedimentación normalizado, $s_{20,w}^0$, de 4,4 S (Fig. 1D). Este valor es compatible con una medición reciente [19]. Se calculó un radio de Stokes de 44,1 Å mediante el programa informático SEDNTERP [27] usando un volumen específico parcial calculado de 0,7328 cm³/g. El análisis de forma basado en UCA (usando la proporción de fricción experimental) fue indicativo de una forma elíptica con una proporción axial a/b de 1:6. Los resultados radiales moleculares obtenidos por UAC son coherentes con el valor obtenido por SEC (45,4 Å). Además, el cálculo teórico del radio, por SEDNTERP, usando la masa molecular de pro-MMP-9 y la composición de aminoácidos y glucano produjo un radio esférico molecular equivalente de 28,7 Å. La desviación de este valor a partir de los radios de Stokes experimentales proporciona otra indicación de una forma no esférica, alargada o que incorpora cavidades.

Ejemplo 2

El análisis de la forma molecular de pro-MMP-9 mediante dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS) revela una estructura de tres dominios alargada

Resultados

Se investigó la conformación global del monómero pro-MMP-9 en solución mediante SAXS. En SAXS, el perfil de dispersión procede de todo el conjunto de moléculas orientadas al azar, produciendo información sobre su conformación media (del orden de aproximadamente un nanómetro). Por tanto, SAXS difiere del análisis estructural cristalográfico, en que requiere cristales de macromoléculas de alta calidad difíciles de conseguir, y es una de las pocas técnicas estructurales para estudiar las proteínas en solución. Este procedimiento utiliza la dispersión elástica de los fotones de rayos X incidentes por los electrones de la molécula diana. La distribución de la densidad electrónica, controlada por la disposición de los átomos en la molécula conduce a un patrón de interferencia.

Después, la forma tridimensional de la molécula se reconstruye a partir del perfil de dispersión [28].

La intensidad dispersa se observó sobre un intervalo de transferencia de momento de $0,008 < q < 0,46 \text{ \AA}^{-1}$ correspondiente a un intervalo de separación de $14 < r < 785 \text{ \AA}$ (Figura 2A). El valor más bajo (14 \AA) fija la resolución final que puede obtenerse en las mediciones. Las intensidades dispersas son lineales en la pequeña región q (perfil de dispersión véase Figura 2A) y se ajustan muy bien mediante la ley de Guinier. Se observó que la pendiente se correlacionaba débilmente con la concentración de proteína. Esto significa que ni la agregación ni las interferencias inter-partícula contribuyen significativamente a la señal. El radio de giro (R_g) resultante de las mediciones es de $50 \pm 2,7 \text{ \AA}$. La función $p(r)$ representa la distribución de distancias interatómicas dentro de la molécula (función de distribución de pares - Figura 2A, inserto). La extracción de R_g de $p(r)$ proporciona un valor comparable, $49,2 \text{ \AA}$ lo que indica un análisis de datos preliminar exacto (antes del procedimiento de ajuste). La distancia interatómica máxima (D_{max}) es de 160 \AA . La forma de $p(r)$ indica una estructura elipsoidal alargada (véase por ejemplo [29-31]).

Usando los programas GASBOR [32] y CHADD [33] se obtuvo el modelo de reconstrucción tridimensional de la pro-MMP-9. Se simularon curvas de dispersión teóricas a partir de disposiciones tridimensionales de centros esféricos (o restos simulados) que representaban restos de proteínas, que se combinan para formar la forma global de la proteína. La forma final de la proteína se determina mediante ajuste repetitivo de las curvas teóricas simuladas con respecto a los datos experimentales. La ventaja de CHADD radica en el uso de un conocimiento *a priori* obtenido a partir de la estructura cristalina disponible de dominios aislados para introducir restricciones en los procedimientos de análisis de datos. En cambio, se calcularon modelos producidos por GASBOR sin ningún conocimiento *a priori*. Más adelante, en el Ejemplo 3 del presente documento se describe una comparación detallada entre CHADD y GASBOR.

La Figura 2B muestra la estructura tridimensional reconstruida de la pro-MMP-9. El radio de Stokes de la estructura reconstruida de la pro-MMP-9 se calculó usando el programa HYDROPRO [34]. Este radio calculado varía entre $44,9$ y $47,1 \text{ \AA}$, lo que coincide con los valores medidos de $45,4$ y $44,1 \text{ \AA}$ obtenidos por SEC y UCA, respectivamente. Además, tanto el modelo SAXS como el parámetro de radio axial obtenido por UCA, sugiere una forma alargada. Por tanto, la forma reconstruida reestablecida a partir del perfil SAXS experimental es coherente con los datos hidrodinámicos medidos obtenidos tanto por SEC como por UCA.

El análisis de ajuste de curvas simulado de esta estructura se representa en la Figura 2A (curva gris). La localización de la estructura del carbono alfa del dominio procatalítico se usó como una limitación en el análisis de reconstrucción estructural mientras que los dominios OG y similar a hemopexina se reconstruyeron usando CHADD. Finalmente, las estructuras cristalinas del dominio procatalítico [22] y el dominio similar a hemopexina [24] se acoplaron secuencialmente a la densidad de contorno usando el programa informático SUPCOMB [35] (Fig. 2B). La densidad restante pertenece al dominio OG que separa los dos dominios terminales en -30 \AA . Este valor se verificó adicionalmente calculando las curvas teóricas $p(r)$ basándose en las estructuras cristalinas de los dominios N-terminal y C-terminal aislados usando el programa informático CRY SOL [36]. Los valores D_{max} calculados para estos dominios son de 80 \AA y 50 \AA , respectivamente. Al restar estos valores de la D_{max} experimental de la pro-MMP-9 de longitud completa (160 \AA), se proporciona una verificación adicional de la estructura reconstruida en la que los dominios terminales están separados $\sim 30 \text{ \AA}$.

El análisis de los volúmenes ocupados por los dominios OG y similar a hemopexina revela que tienen un volumen similar. Sin embargo, el peso molecular calculado del dominio OG, incluyendo los O glucanos, es aproximadamente la mitad del peso molecular del dominio similar a hemopexina. El análisis de secuencia computacional del dominio OG usando PONDR [37] reveló que esta región está significativamente desordenada con respecto a otros dominios (Fig. 2C). Por tanto, a pesar de su conformación compacta observada, este dominio OG rico en prolina posee una estructura desordenada de densidad relativamente baja. Por lo tanto, la densidad electrónica relativamente voluminosa del dominio OG, detectada por SAXS, representa una serie de conformaciones conservadas por este péptido engarzador en solución. Esto sugiere que el dominio OG engarzador es flexible. Se usó el programa de modelado estructural RAPPER [38, 39] para modelar posibles conformaciones engarzadoras que se ajustarían al perfil de la expresión observado y al mapa de densidad. Específicamente, 8 de 500 conformeros calculados se ajustan al modelo SAXS del engarce. Se calcularon curvas de dispersión teóricas (usando el programa SAXS CRY SOL [36]) para la estructura modelo pro-MMP-9 global. Las Figuras 2D y 2E describen los mejores modelos de engarce que se ajustan tanto a la curva de dispersión experimental como al mapa de densidad SAXS de pro-MMP-9. El engarce OG parece mostrar múltiples supuestas conformaciones no estructuradas.

Ejemplo 3

Comparación del programa informático de modelado para el análisis de los datos SAXS

Resultados

Para generar un modelo de baja resolución de pro-MMP-9 se usaron los programas GASBOR [Svergun, D. I., Petoukhov, M. V., y Koch, M. H. (2001). *Biophys J* 80, 2946-2953] y CHADD [Petoukhov, M. V., Eady, N. A., Brown, K. A., y Svergun, D. I. (2002). *Biophys J* 83, 3113-3125]. Ambos programas buscan una representación de la proteína mediante una disposición 3D de centros de dispersión esféricos que reproducen la curva de dispersión

medida. La ventaja de CHADD radica en el uso de un conocimiento *a priori* de una parte de las localizaciones Ca según se determina por la estructura cristalina de dominios aislados aunque que el resto de la molécula esté modelado, mientras que GASBOR modela toda la estructura sin incorporar ningún conocimiento *a priori*. En cada programa se comparan diversos cálculos independientes para analizar la convergencia de las estructuras en solución.

Ocho procesos GASBOR independientes convergieron a una sola solución de una conformación global alargada en la que un extremo tiene un mayor tamaño y puede albergar la estructura cristalina del dominio N terminal mientras que el otro extremo asume una forma discoidal que puede alojar la estructura cristalina del dominio C terminal (Figura 5A). Los dominios terminales se acoplaron al modelo GASBOR usando el programa SUPCOMB [Kozin, M. B., y Svergun, D. I. (2001). *Journal of Applied Crystallography* 34, 33-41]. La densidad restante pertenece al dominio OG que separa los dominios terminales en 50 Å, tomado como la longitud dominio OG. La discrepancia espacial normalizada (NSD) dentro de los ocho cálculos varió de 1,42 a 1,57. El valor NSD es una medida de la similitud entre las estructuras en solución: un valor inferior corresponde a un mejor solapamiento. Los valores NSD se calcularon usando DAMAVER [Petoukhov, M. V., y Svergun, D. I. (2003). *Journal of Applied Crystallography* 36, 540-544], que también puede seleccionar la solución más probable ($\chi^2=1.38$) y determinar los valores atípicos.

En un esquema de modelado alternativo, que utiliza información estructural conocida, se reconstruyó la estructura pro-MMP-9 de longitud completa usando CHADD. Se contaron once procesos independientes y se mostraron valores NSD de 1,59-1,75 sin valores atípicos, lo que sugiere convergencia de las soluciones hacia a un modelo único. En la Figura 5B se muestra la solución más probable ($\chi^2=1,66$). El modelo indica una estructura con tres dominios alargada, que presenta una forma bimodal grande con dominios discoidales conectados por el dominio OG de densidad relativamente baja. Las estructuras cristalinas del dominio procatalítico y los dominios de hemopexina se acoplaron secuencialmente con la densidad contorno usando el programa informático SUPCOMB [Kozin, M. B., y Svergun, D. I. (2001). *Journal of Applied Crystallography* 34, 33-41]. La densidad restante pertenece al dominio OG que separa los dos dominios terminales en -30 Å, un valor que coincidirá con el tamaño teórico del dominio OG según se calcula mediante CRY SOL.

Las dos estructuras obtenidas mediante dos algoritmos de modelado independientes son el resultado de la convergencia de diversos cálculos con respecto a una sola solución. Se obtuvo un valor NSD de 1,68 para ensayar la similitud entre los modelos GASBOR y CHADD, indicando una buena coincidencia entre los modelos. Aunque el modelo GASBOR es bastante extenso (con el dominio OG de 50 Å en lugar de 30 Å) ambos modelos comparten características muy similares, es decir, dos dominios claramente globulares conectados por un engarce (N-terminal elíptico y hemopexina C-terminal unidos por el engarce OG) dando como resultado una estructura global alargada compuesta por dos dominios claramente globulares conectados por un engarce. La concordancia del tamaño del dominio OG con el valor calculado por CRY SOL, y la similitud en la forma global con respecto a la MFA conduce a los autores de la presente invención a seleccionar CHADD como un modelo más fiable.

Ejemplo 4

Caracterización de forma y flexibilidad del dominio de pro-MMP-9 mediante formación de imágenes de moléculas sencillas

Resultados

Para verificar adicionalmente los análisis SAXS, los autores de la presente invención diseñaron un experimento para visualizar directamente la forma de pro-MMP-9 y evaluar las propiedades moleculares de su dominio OG como se predice en las Figuras 2B y E. Específicamente, los autores de la presente invención realizaron análisis de formación de imágenes de moléculas sencillas de pro-MMP-9 natural y de pro-MMP-9 mutante con OG delecionado (pro-MMP-9? OG) usando microscopía de fuerza atómica (MFA). Se obtuvieron imágenes reproducibles de moléculas pro-MMP-9 sencillas (Figura 3) reticulando las muestras de proteína con una capa silanizada modificada con amina en una superficie Si(111) antes de realizar la formación de imágenes por MFA.

Se realizaron formaciones de imágenes de las muestras en solución tampón y en aire (Figuras 6A-C). Las mejores imágenes se obtuvieron en modo semiseco usando una punta en "espiga". Las Figuras 3A-C muestran una imagen de molécula sencilla de pro-MMP-9 natural inmovilizada en la superficie Si(111) modificada. Coherente con el análisis SAXS indicado, la imagen de la proteína posee una estructura multidominio alargada. La sección transversal de la imagen (Figura 3C), que representa la altura frente a la anchura, revela dos dominios de proteína separados supuestamente conectados por el engarce OG. Por otro lado, el mutante pro-MMP-9? OG que carece del dominio OG en el resto 64 presenta una forma bastante esférica con una separación de dominio no resuelta (Figuras 3D-F).

Ejemplo 5

Elección de las condiciones y controles para la formación de imágenes por microscopía de fuerza atómica (MFA) de pro-MMP-9

Resultados

Se realizaron formaciones de imágenes de las muestras en solución tampón y en aire. Aunque el último modo se aproxima a las condiciones fisiológicas, la calidad de las imágenes fue mala (Figura 6A). La mala calidad de las imágenes podría producirse por diversos factores: (1) Las puntas diseñadas usadas para las condiciones en húmedo tenían un radio significativamente más grande que las puntas en "espiga" usadas en condiciones ambientales. (2) La muestra completamente hidratada puede ser más blanda y más fácil de distorsionar bajo la presión de la punta. (3) La unión de la proteína a la superficie puede aún permitir algún grado de movimiento en condiciones completamente hidratadas. Por lo tanto, para mejorar la calidad de la imagen, se aplicaron condiciones ambientales en las que la muestra se aclaró y el exceso de agua se eliminó a los 2-3 minutos de flujo suave con nitrógeno. Este procedimiento posiblemente deja una fina capa de hidratación sobre la muestra y por tanto se denomina "modo semiseco". Para comprobar la forma de la proteína sin ninguna capa de hidratación, se aplicó un secado minucioso (Figura 6B), que condujo a la pérdida de características refinadas, a la contracción de la proteína, y a una interferencia en la formación de imágenes en las secciones transversales.

La principal dificultad de estas mediciones en semiseco fue obtener muestras sin artefactos de adsorbatos ficticios, principalmente deposición de sales. Se necesitaron procedimientos de aclarado agresivos para eliminar estos adsorbatos, aunque también condujo a la eliminación de gran cantidad de proteína. Usando las superficies de silano modificadas con amina y el procedimiento de reticulación, fue posible preparar superficies que eliminaran casi todo el fondo (determinado mediante procesos en blanco), manteniendo al mismo tiempo una concentración significativa de proteínas de superficie, similar a la observada en condiciones completamente hidratadas. Se prepararon blancos (Figura 6C) incubando en condiciones idénticas a las de las muestras, pero sin pro-MMP-9 que normalmente contenían no más de una característica en una formación de imágenes de $1 \mu\text{m}^2$. La comparación de las muestras con pro-MMP-9 indicó que por término medio menos del 5 % de las características observadas podrían haber sido artefactos debidos a residuos o a sales secas.

Análisis estadístico de formación de imágenes por MFA: Se determinaron análisis estadísticos de altura, anchura y distancia de lóbulo a lóbulo para la pro-MMP-9 natural y la pro-MMP-9? OG. Estos datos se presentan como histogramas en las Figuras 4A-E y se resumen en la Tabla 1, más adelante en el presente documento. Se indican los valores más probables, dado que la presencia de dos subpoblaciones puede imponer un sesgo sobre el valor medio. La desviación típica se indica entre paréntesis. Los valores corresponden a la pro-MMP-9 natural (n=90) y pro-MMP-9 Δ OG mutante (n=120). Las distancias lóbulo a lóbulo se midieron entre los picos en la sección transversal XZ. Solo se extrajeron valores si la orientación de la proteína sobre la superficie permitía la identificación de dos dominios distintos (n=83). La separación entre lóbulos en pro-MMP-9 Δ OG no pudo diferenciarse.

Tabla 1

	<i>Tipo silvestre</i>	<i>Pro-MMP-9ΔOG</i>
Altura	34 (7,5)	22 (2,9)
Anchura	190 (33)	130 (13)
Lóbulo a lóbulo	78 (9,5)	N/D

Los valores de altura más probables fueron 34 Å y 22 Å, para el tipo natural y mutante respectivamente. Las comparaciones con respecto a los posibles valores de altura se extrajeron de las estructuras cristalinas [Elkins, P. A., Ho, Y. S., Smith, W. W., Janson, C.A., D'Alessio, K. J., McQueney, M. S., Cummings, M. D., y Romanic, A. M. (2002). Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 58, 1182-1192; Cha, H., Kopetzki, E., Huber, R., Lanzendorfer, M., y Brandstetter, H. (2002). J Mol Biol 320, 1065-1079] lo que sugiere un aplastamiento de la imagen de la proteína, que podría provenir de interacciones con la superficie, o alguna compresión de la estructura bajo la punta de la MFA. La forma del histograma de la Figura 4A revela que la proteína natural se distribuye en dos subpoblaciones, a diferencia de la mutante con OG delecionada (Fig. 4B), que tiene un solo pico en la distribución. Los valores de anchura más probables fueron 190 Å y 130 Å para el tipo natural (Fig. 4C) y pro-MMP-9? OG (Fig. 4D), respectivamente. Esta diferencia indica que el dominio OG tiene una contribución significativa con la anchura de la proteína natural. Se esperaba que se produjera alguna dispersión en los valores de altura y anchura como consecuencia de las diferentes configuraciones de unión de la proteína con la superficie. Dado que la proteína no es esférica, los estados de unión con el eje principal orientado a diferentes ángulos con respecto a la superficie normalmente conducirán a diferentes alturas y anchuras máximas medidas por MFA. Por tanto, la altura podría variar como el coseno de este ángulo y la anchura como el seno.

Los valores más probables de distancia lóbulo a lóbulo fueron de 78 Å para la pro-MMP-9 natural (Figura 4E). Esta distancia compara favorablemente valores de lóbulo a lóbulo obtenidos por SAXS. El intervalo de valores posibles de SAXS se encuentra en el intervalo de 75-87 Å, dependiendo de las orientaciones permitidas de los dominios individuales.

Ejemplo 6

El análisis estadístico de formación de imágenes de moléculas sencillas acoplado con SAXS revela la flexibilidad de dominio de la proteína mediada por el dominio OG

Resultados

5 Una característica llamativa que diferencia las dos especies de enzimas es que la extensión en ambos valores de anchura y altura para el tipo natural es significativamente mayor que para el mutante (Figuras 4A-E). Dichas diferencias podrían provenir de los grados adicionales de libertad prestados a la estructura natural por el dominio OG, a diferencia del mutante, en el que los dos lóbulos están más confinados. La heterogeneidad de tamaños resultantes de dos variables principales: las diferentes orientaciones de la proteína sobre la superficie y las diferentes conformaciones de la proteína. Dado que el mutante no contiene dominio OG, este ha reducido su heterogeneidad conformacional, lo que significa que la extensión de los valores surge principalmente de diferentes orientaciones sobre la superficie.

10 El efecto del dominio OG sobre la flexibilidad de la proteína se observa claramente en la Figura 4E que indica mediciones de distancias lóbulo a lóbulo. La extensión de distancias varía de 55-85 Å y puede dividirse en dos subpoblaciones. Notablemente, estos resultados apoyan la existencia de conformaciones enzimáticas múltiples mediadas por la naturaleza molecular flexible del dominio OG. La Figura 4F representa algunos posibles modelos de diversas conformaciones de proteínas basándose en las distancias lóbulo a lóbulo derivadas. Las distancias lóbulo a lóbulo se permitieron variar dentro de una desviación típica (9,5 Å). Las diversas conformaciones del dominio OG presentadas en la Figura 4F se calcularon usando el programa de modelado estructural RAPPER [38, 39].

15 La flexibilidad de la proteína pro-MMP-9, detectada por este novedoso análisis molecular proporciona nuevas características moleculares en la estructura global y dinámica de la enzima, resaltando la exclusividad de la estructura-función de la pro-MMP-9 sobre otros miembros de la familia de las MMP, incluyendo la gelatinasa A/MMP-2 [21]. Por ejemplo, en la colagenasa-1/MMP-1, la flexibilidad de una región de engarce mucho más corta se limita adicionalmente por interacciones entre el dominio hemopexina y el prodominio [40]. De manera similar, en MMP-2 el segundo álabe del dominio de hemopexina está unido al dominio de fibronectina a través de un enlace de hidrógeno (Morgunova y col. Science 1999).

Ejemplo 7

La función de la flexibilidad del dominio de la proteína es una función enzimática de la pro-MMP-9

Resultados

30 La MMP-9 es una enzima secretada, y no está claro como se dirige a la localización correcta y como se controla su actividad en el espacio pericelular [41]. Específicamente, no está claro que las funciones de los diversos dominios sean mediar interacciones de proteína-sustrato y proteína-proteína eficaces durante la catálisis. La estructura de longitud completa de la pro-MMP-9 expuesta en el presente documento indica nuevas características en la estructura de esta enzima y en su clara flexibilidad de dominio. En particular, los resultados expuestos aumentan la posibilidad de que, para mediar su función, en la MMP-9 se requiere la flexibilidad observada de la proteína.

35 En trabajos previos se supuso que la contribución del dominio OG era un resto espaciador que permitía un movimiento independiente de los dominios terminales [19, 42, 43]. De manera interesante, una investigación bioinformática con "BLAST" [44, 45] de todas las bases de datos disponibles reveló que el dominio OG en la pro-MMP-9 es homólogo a dominios similares desordenados en diversas superficies de células asociadas y proteínas de unión a ECM (véase la Tabla 2, en el presente documento más adelante). Los resultados indicados en la Tabla 2 están por encima del umbral del valor E por defecto. Los valores de identidad y similitud están en porcentaje.

Tabla 2

Nombre de la proteína	Organismo	Identidad	Similitud
Región de anclaje de proteína superficial	Cocos Gram-positivos	42	62
Proteínas receptoras de membrana externa, principalmente transporte de hierro	Haemophilus influenzae	43	51
Proteína de unión a hemoglobina	Haemophilus influenzae	42	50
Proteína B de unión a celulosa	Eubacterium cellulosolvens	45	52
Proteína de adhesión a colágeno	Bacillus thuringiensis serovariedad israelensis	36	44

Excepcionalmente, se observó una estrecha homología estructural entre el engarce OG y la organización global de dominios de pro-MMP-9 y la celulasa de hongos [29, 31], para la cual se propuso que la función del engarce en la celulasa era mediar la unión proteína-celulosa y la migración enzimática en matrices intactas. Esto sugiere que la pro-MMP-9 media su función biológica y actividades enzimáticas por asociación con la superficie celular y/o interacciones con sustratos sólidos (por ejemplo, ECM). Recientemente, Owen y col. describieron la actividad de MMP-9 resistente a TIMP-1 en la superficie celular de neutrófilos [46]. Una forma para conseguir fijar a la célula el dominio de hemopexina de la MMP-9 podría ser a través de interacciones del complejo MT6-MMP/TIMP-1 en la superficie celular. Los datos actuales sugieren que la flexibilidad del dominio OG permite al extremo N de la MMP-9 acceder a las redes de sustratos complejos (por ejemplo, moléculas similares al colágeno) en el entorno pericelular. La estabilización de dichas interacciones proteína-sustrato pueden conseguirse mediante interacciones proteína-proteína no específicas mediadas por secuencias ricas en prolina [47] que residen en el dominio OG de la MMP-9. Por otro lado, se demostró que el dominio similar a hemopexina y el dominio de fibronectina en la pro-MMP-9 unían estoiquiométricamente sustratos con gran afinidad [48, 49]. Esto sugiere que la pro-MMP-9 media sus actividades catalíticas a través de interacciones tanto específicas como no específicas con sus sustratos. En este contexto molecular los dos dominios terminales proporcionarán especificidad de sustrato mientras que el dominio OG flexible se usa para desestabilizar, por ejemplo, la estructura terciaria de los sustratos de tipo colágeno a través de débiles interacciones no específicas.

De manera significativa, la interacción correcta con TIMP-1, LRP-1 y megalina requiere la implicación del dominio OG para conseguir una orientación correcta de los dominios similar a hemopexina y catalítico [19]. El mutante con el dominio OG delecionado mostró afinidad disminuida con respecto a estas moléculas, lo que sugiere que el dominio OG es esencial para regular la biodisponibilidad de la MMP-9 activa. Aunque los resultados de formación de imágenes de molécula sencilla indican que el espaciado entre los dominios terminales no es constante, la forma más o menos globular del dominio OG, obtenida por reconstrucción con el modelo SAXS, garantiza una separación mínima entre los dos dominios, lo que permite la unión de reguladores al dominio C terminal sin impedimento estérico del dominio catalítico N terminal. Dicha flexibilidad del dominio no se observa en la MMP-2. Esto puede explicar por qué la MMP-9 puede unirse directamente a LRP-1 mientras que la MMP-2 requiere la formación del complejo precursor con TIMP-2 [50] o con trombospondina [51] para conseguir unirse a LRP-1 de modo eficaz.

Para ensayar la función del dominio OG en la actividad colagenolítica de la MMP-9 se realizaron ensayos de inhibición *in situ*. Se usó la región bisagra (*hinge region*) anti-MMP-9 (anti-MMP-9hr de tres proveedores diferentes: Sigma, Chemicon y Abcam). Este anticuerpo disponible en el mercado se suscitó contra un péptido dentro del dominio OG. El sustrato utilizado fue colágeno de tipo IV marcado con fluorescencia, que presenta un aumento de fluorescencia después de la degradación. Las Figuras 7A-B muestran que el anticuerpo regula negativamente la actividad colagenolítica, obstaculizando la flexibilidad del dominio OG o por impedimento estérico que altera los contactos enzima-sustrato como se muestra en la zimografía *in situ*.

El colágeno de tipo IV marcado con fluorescencia se solapó sobre las células HT-1080 productoras de MMP-2/9. Tanto la MMP-2 como la MMP-9, producidas por esta línea celular, pudieron degradar el colágeno de tipo IV, sin embargo se observó que más del 70 % de las MMP purificadas eran MMP-9 que presentaban una actividad 4 veces específica hacia el colágeno de tipo IV en relación a la MMP-2. La actividad colagenolítica se examinó en la periferia de las células con (Figura 7A) o sin (Figura 7B) anti-MMP-9hr. Tras la adición del anti-MMP-9hr la actividad colagenolítica era más limitada en comparación con la actividad difundible de la referencia.

Considerado en su conjunto, puede realizarse la hipótesis que al incidir en el dominio OG se reduce la fuerza colagenolítica mientras que la actividad gelatinolítica no se ve afectada.

Conclusiones

Este trabajo representa la primera determinación estructural experimental de la pro-MMP-9 humana de longitud completa dada a conocer mediante una novedosa combinación de análisis estructurales. Se utilizó una combinación de formación de imágenes de molécula sencilla y SAXS para deducir un modelo molecular integral proporcionando a esta importante enzima conocimientos estructurales y dinámicos profundos. De manera notable, los resultados de la presente invención demuestran la presencia de un dominio OG flexible y no estructurado que une el núcleo enzimático catalítico y el dominio de hemopexina. Esta estructura otorga a la pro-MMP-9 una arquitectura de dominio exclusiva con respecto a los otros miembros de la familia. Dicha exclusividad estructural puede utilizarse para el diseño de inhibidores selectivos de isoformas para la MMP-9. El diseño de reguladores para la MMP-9 puede dirigirse a restringir la flexibilidad de su dominio, que, en patologías específicas, puede bloquear su actividad patológica.

Se aprecia que, determinadas características de la invención, que para aclarar se describen en el contexto de realizaciones distintas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que por brevedad se describen en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

En la presente solicitud, las citas bibliográficas o identificación de cualquier referencia no deben interpretarse como una admisión de que dicha referencia esté disponible como técnica anterior a la presente invención.

Referencias

1. Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S., y Liotta, L. A. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol.* 9, 541-573.
2. Werb, Z., y Chin, J. R. (1998). Extracellular matrix remodeling during morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 857, 110-118.
3. Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., Deryugina, E. I., Strongin, A. Y., Brocker, E. B., y Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.* 160, 267-277.
4. Maskos, K. (2005). Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie* 87, 249-263.
5. Agrawal, S., Anderson, P., Durbeej, M., van Rooijen, N., Ivars, F., Opdenakker, G., y Sorokin, L. M. (2006). Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 203, 1007-1019.
6. Liu, Z., Shipley, J. M., Vu, T. H., Zhou, X., Diaz, L. A., Werb, Z., y Senior, R. M. (1998). Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. *J Exp Med.* 188, 475-482.
7. Opdenakker, G., Nelissen, I., y Van Damme, J. (2003). Functional roles and therapeutic targeting of gelatinase B and chemokines in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2, 747-756.
8. Van den Steen, P. E., Proost, P., Brand, D. D., Kang, A. H., Van Damme, J., y Opdenakker, G. (2004). Generation of glycosylated remnant epitopes from human collagen type II by gelatinase B. *Biochemistry* 43, 10809-10816.
9. Liu, Z., Zhou, X., Shapiro, S. D., Shipley, J. M., Twining, S. S., Diaz, L. A., Senior, R. M., y Werb, Z. (2000). The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell.* 102, 647-655.
10. Van den Steen, P. E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J., y Opdenakker, G. (2000). Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood.* 96, 2673-2681.
11. Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M. A., Werb, Z., y Rafii, S. (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell.* 109, 625-637.
12. Nelissen, I., Martens, E., Van den Steen, P. E., Proost, P., Ronsse, I., y Opdenakker, G. (2003). Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 cleaves interferon-beta and is a target for immunotherapy. *Brain.* 126, 1371-1381.
13. Yu, Q., y Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14, 163-176.
14. McQuibban, G. A., Gong, J. H., Tam, E. M., McCulloch, C. A., Clark-Lewis, I., y Overall, C. M. (2000). Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289, 1202-1206.
15. Monaco, S., Sparano, V., Gioia, M., Sardella, D., Di Pierro, D., Marini, S., y Coletta, M. (2006). Enzymatic processing of collagen IV by MMP-2 (gelatinase A) affects neutrophil migration and it is modulated by extracatalytic domains. *Protein Sci* 15, 2805-2815.
16. Itoh, T., Matsuda, H., Tanioka, M., Kuwabara, K., Itohara, S., y Suzuki, R. (2002). The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol* 169, 2643-2647.
17. Garg, P., Rojas, M., Ravi, A., Bockbrader, K., Epstein, S., Vijay-Kumar, M., Gewirtz, A. T., Merlin, D., y Sitaraman, S. V. (2006). Selective ablation of matrix metalloproteinase-2 exacerbates experimental colitis: contrasting role of gelatinases in the pathogenesis of colitis. *J Immunol* 177, 4103-4112.
18. Opdenakker, G., Van den Steen, P. E., y Van Damme, J. (2001). Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol.* 22, 571-579.
19. Van den Steen, P. E., Van Aelst, I., Hvidberg, V., Piccard, H., Fiten, P., Jacobsen, C., Moestrup, S. K., Fry, S., Royle, L., Wormald, M. R., Wallis, R., Rudd, P. M., Dwek, R. A., y Opdenakker, G. (2006). The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. *J Biol Chem.* 281, 18626-18637.
20. Wilhelm, S.M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A., y Goldberg, G. I. (1989). SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264, 17213-17221.
21. Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U., Isupov, M., Lindqvist, Y., Schneider, G., y Tryggvason, K. (1999). Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science.* 284, 1667-1670.
22. Elkins, P. A., Ho, Y. S., Smith, W. W., Janson, C. A., D'Alessio, K. J., McQueney, M. S., Cummings, M. D., y Romanic, A. M. (2002). Structure of the C-terminally truncated human ProMMP9, a gelatin-binding matrix metallo-proteinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 1182-1192.
23. Stocker, W., y Bode, W. (1995). Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr Opin Struct Biol.* 5, 383-390.
24. Cha, H., Kopetzki, E., Huber, R., Lanzendorfer, M., y Brandstetter, H. (2002). Structural basis of the adaptive molecular recognition by MMP9. *J Mol Biol* 320, 1065-1079.
25. Van den Steen, P. E., Opdenakker, G., Wormald, M. R., Dwek, R. A., y Rudd, P. M. (2001). Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1528, 61-73.
26. Olson, M. W., Bernardo, M. M., Pietila, M., Gervasi, D. C., Toth, M., Kotra, L. P., Massova, I., Mobashery, S., y Fridman, R. (2000). Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix

- metalloprotease-9. Differential rates for activation by stromelysin 1. *J. Biol. Chem.* 275, 2661-2668.
27. Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M., y Pelletier, S. L. (1992). *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science* (Cambridge, U.K.: Royal Society of Chemistry).
28. Svergun, D. I., y Koch, M. H. (2002). Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Curr Opin Struct Biol* 12, 654-660.
- 5 29. Receveur, V., Czjzek, M., Schulein, M., Panine, P., y Henrissat, B. (2002). Dimension, shape, and conformational flexibility of a two domain fungal cellulase in solution probed by small angle X-ray scattering. *J Biol Chem.* 277, 40887-40892.
30. Violot, S., Aghajari, N., Czjzek, M., Feller, G., Sonan, G. K., Gouet, P., Gerday, C., Haser, R., y Receveur-Brechot, V. (2005). Structure of a full length psychrophilic cellulase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* revealed by X-ray diffraction and small angle X-ray scattering. *J Mol Biol.* 348, 1211-1224.
- 10 31. von Ossowski, I., Eaton, J. T., Czjzek, M., Perkins, S. J., Frandsen, T. P., Schulein, M., Panine, P., Henrissat, B., y Receveur-Brechot, V. (2005). Protein disorder: conformational distribution of the flexible linker in a chimeric double cellulase. *Biophys J.* 88, 2823-2832.
- 15 32. Svergun, D. I., Petoukhov, M. V., y Koch, M. H. (2001). Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys J* 80, 2946-2953.
33. Petoukhov, M. V., Eady, N. A., Brown, K. A., y Svergun, D. I. (2002). Addition of missing loops and domains to protein models by x-ray solution scattering. *Biophys J* 83, 3113-3125.
- 20 34. Garcia De La Torre, J., Huertas, M. L., y Carrasco, B. (2000). Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys J.* 78, 719-730.
- 35 35. Kozin, M. B., y Svergun, D. I. (2001). Automated matching of high- and low-resolution structural models. *Journal of Applied Crystallography* 34, 33-41.
36. Svergun, D., Barberato, C., y Koch, M. H. J. (1995). CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography* 28, 768-773.
- 25 37. Li, X., Romero, P., Rani, M., Dunker, A. K., y Obradovic, Z. (1999). Predicting protein disorder for N-, C-, and internal regions. *Genome Informatics* 10, 30-40.
38. DePristo, M. A., de Bakker, P. I., Lovell, S. C., y Blundell, T. L. (2003). Ab initio construction of polypeptide fragments: efficient generation of accurate, representative ensembles. *Proteins.* 51, 41-55.
- 30 39. DePristo, M. A., De Bakker, P. I., Shetty, R. P., y Blundell, T. L. (2003). Discrete restraint-based protein modeling and the C α -trace problem. *Protein Sci.* 12, 2032-2046.
- 40 40. Lauer-Fields, J. L., Juska, D., y Fields, G. B. (2002). Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. *Biopolymers.* 66, 19-32.
41. Fridman, R., Toth, M., Chvyrkova, I., Meroueh, S. O., y Mobashery, S. (2003). Cell surface association of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Cancer Metastasis Rev.* 22, 153-166.
- 35 42. Overall, C. M. (2002). Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol* 22, 51-86.
43. Rudd, P. M., Mattu, T. S., Masure, S., Bratt, T., Van den Steen, P. E., Wormald, M. R., Kuster, B., Harvey, D. J., Borregaard, N., Van Damme, J., Dwek, R. A., y Opdenakker, G. (1999). Glycosylation of natural human neutrophil gelatinase B and neutrophil gelatinase B-associated lipocalin. *Biochemistry* 38, 13937-13950.
- 40 44. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- 45 45. Schaffer, A. A., Aravind, L., Madden, T. L., Shavirin, S., Spouge, J. L., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., y Altschul, S. F. (2001). Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res.* 29, 2994-3005.
46. Owen, C. A., Hu, Z., Barrick, B., y Shapiro, S. D. (2003). Inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-resistant matrix metalloproteinase-9 on the cell surface of neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29, 283-294.
- 50 47. Williamson, M. P. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J.* 297, 249-260.
48. Collier, I. E., Krasnov, P. A., Strongin, A. Y., Birkedal-Hansen, H., y Goldberg, G. I. (1992). Alanine scanning mutagenesis and functional analysis of the fibronectin-like collagen-binding domain from human 92-kDa type IV collagenase. *J Biol Chem.* 267, 6776-6781.
- 55 49. Roeb, E., Schleinkofer, K., Kernebeck, T., Potsch, S., Jansen, B., Behrmann, I., Matern, S., y Grotzinger, J. (2002). The matrix metalloproteinase 9 (mmp-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist. *J Biol Chem.* 277, 50326-50332.
- 60 50. Emonard, H., Bellon, G., Troeberg, L., Berton, A., Robinet, A., Henriot, P., Marbaix, E., Kirkegaard, K., Patthy, L., Eeckhout, Y., Nagase, H., Hornebeck, W., y Courtoy, P. J. (2004). Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytic clearance of pro-MMP-2.TIMP-2 complex through a thrombospondin-independent mechanism. *J Biol Chem* 279, 54944-54951.
51. Yang, Z., Strickland, D. K., y Bornstein, P. (2001). Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem* 276, 8403-8408.
- 65 52. Masure, S., Proost, P., Van Damme, J., y Opdenakker, G. (1991). Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8. *Eur J Biochem.* 198, 391-398.

53. Towns-Andrews, E., Berry, A., Bordas, J., Mant, G. R., Murray, P. K., Roberts, K., Sumner, I., Worgan, J. S., Lewis, R., y A., G. (1989). Time-resolved X-ray-diffraction station - X-ray optics, detectors, and data acquisition. *Rev Sci Instrum* 60, 2346-2349.
54. Guinier, A., y Fournet, G. (1955). *Small-angle scattering of X-rays* (New York: John Wiley & Sons , Inc.).
- 5 55. Svergun, D. I. (1992). Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. *Journal of Applied Crystallography* 25, 495-503.
56. Ackerman, C. J., Harnett, M. M., Harnett, W., Kelly, S. M., Svergun, D. I., y Byron, O. (2003). 19 A solution structure of the filarial nematode immunomodulatory protein, ES-62. *Biophys J.* 84, 489-500.
- 10 57. Siegel, L. M., y Monty, K. J. (1966). Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochim Biophys Acta* 112, 346-362.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de identificación de un agente para el tratamiento del cáncer y afecciones inflamatorias, comprendiendo el procedimiento determinar si el agente puede interactuar con el dominio O-glucosilado (OG) de la MMP-9, siendo dicho agente un supuesto regulador negativo de la actividad colagenolítica de la MMP-9 y ensayar dicho agente para determinar la capacidad de regular negativamente la actividad colagenolítica de la MMP-9.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha determinación se efectúa comparando una estructura del agente con una estructura del dominio OG de la MMP-9.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha determinación se efectúa poniendo en contacto dicho agente con un dominio OG aislado de la MMP-9.
- 10 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho agente comprende un anticuerpo.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho agente comprende una molécula pequeña.
6. Un anticuerpo que interactúa específicamente con el dominio OG de la MMP-9 para regular negativamente la actividad colagenolítica de dicha MMP-9 para su uso en el tratamiento del cáncer y de trastornos inflamatorios.
7. El anticuerpo de la reivindicación 6, que es un anticuerpo humanizado.
- 15 8. El anticuerpo de la reivindicación 7, que se formula en una composición farmacéutica.

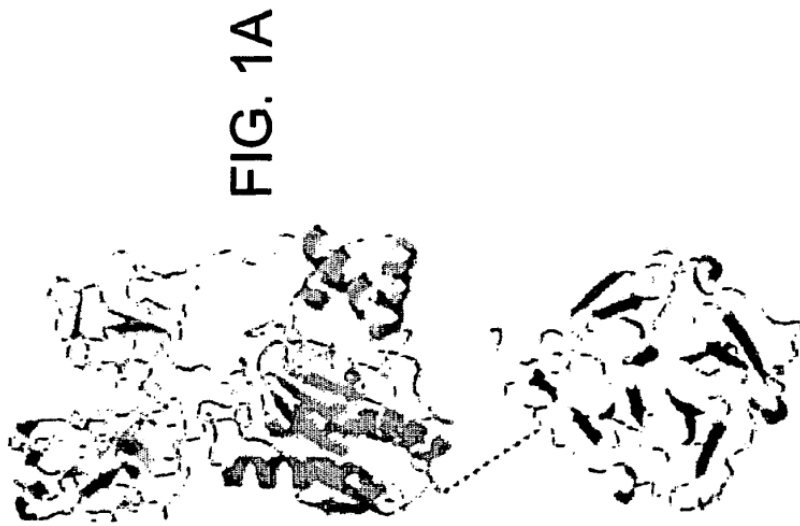


FIG. 1A

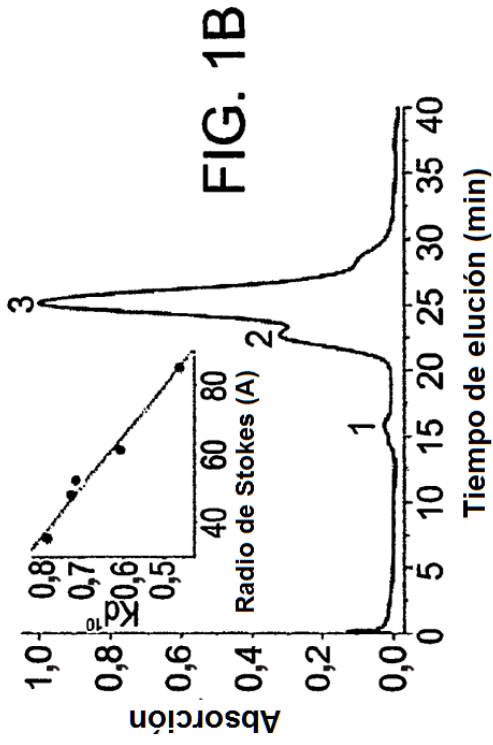


FIG. 1B

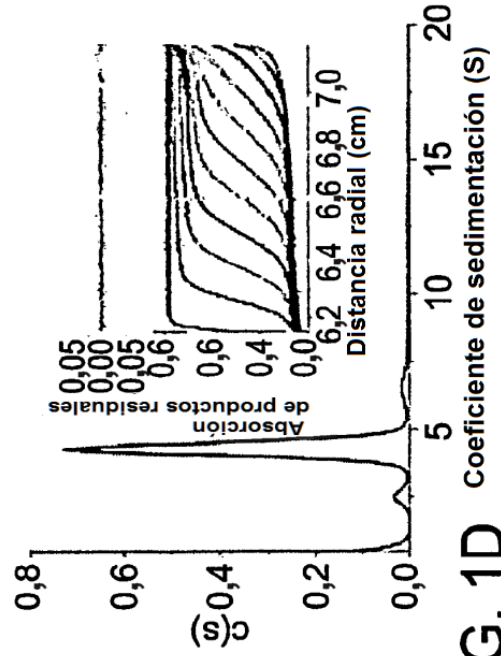


FIG. 1D

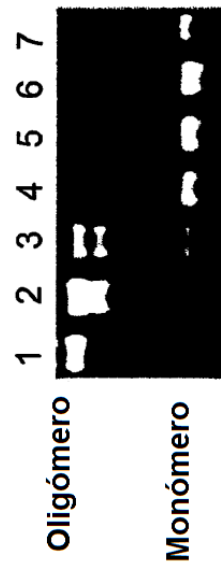


FIG. 1C

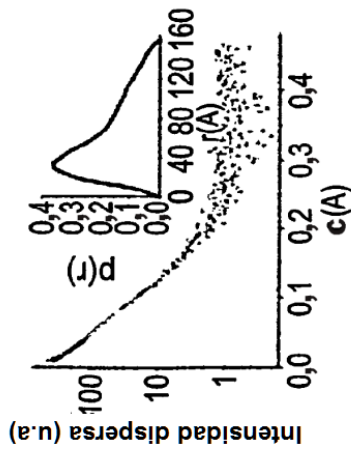


FIG. 2A

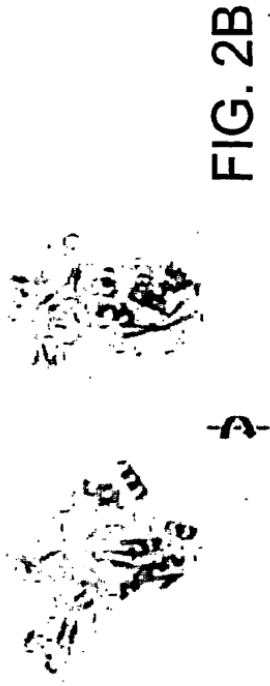


FIG. 2B

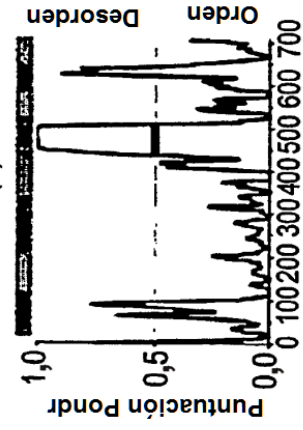


FIG. 2C



FIG. 2D

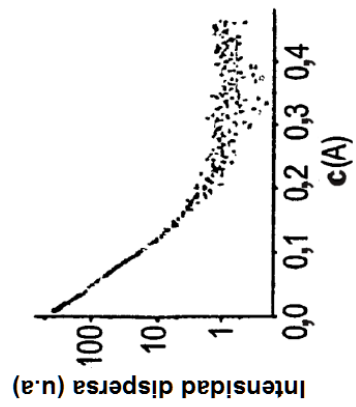


FIG. 2E

FIG. 3A

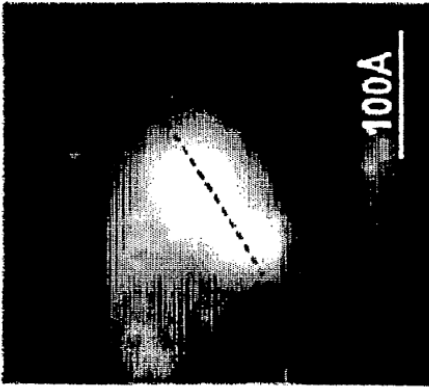


FIG. 3D

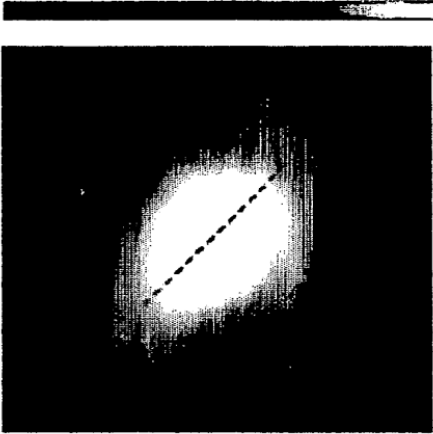


FIG. 3B



FIG. 3E



FIG. 3C

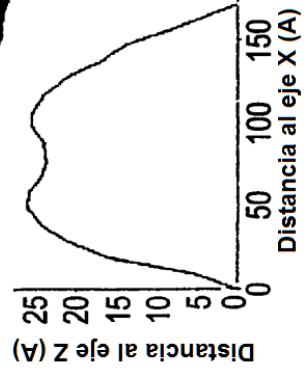


FIG. 3F

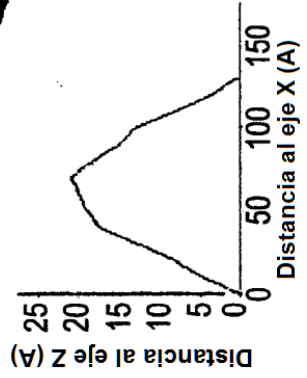


FIG. 4A

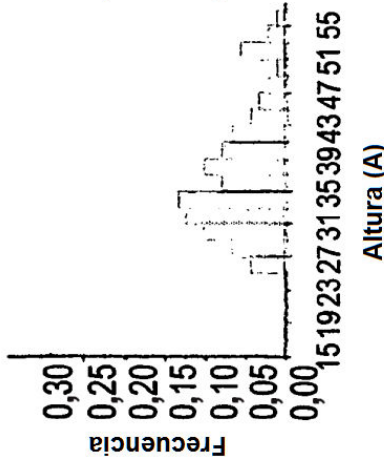


FIG. 4B

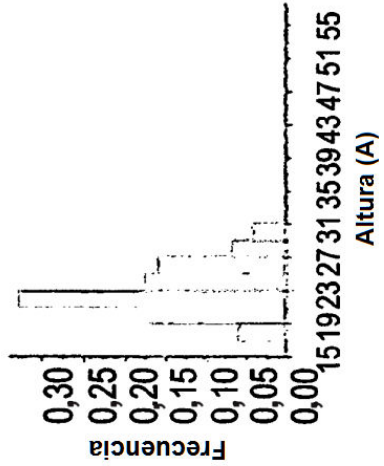


FIG. 4C

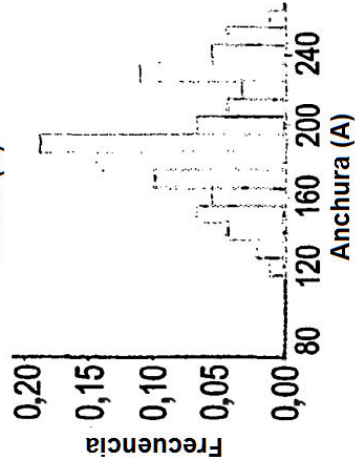


FIG. 4D

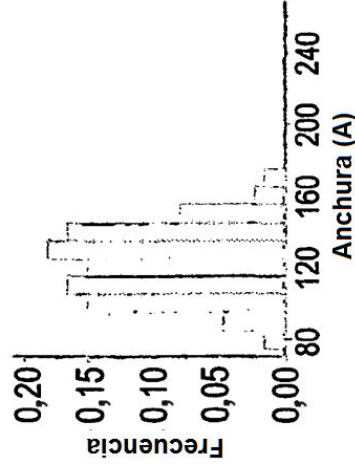


FIG. 4E

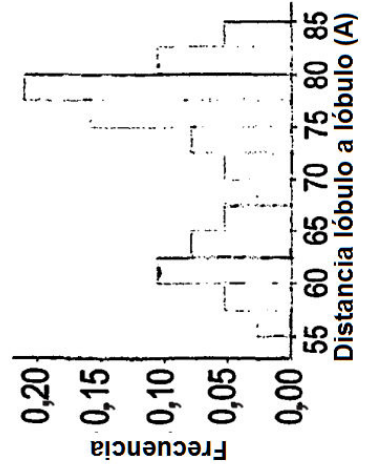


FIG. 4F



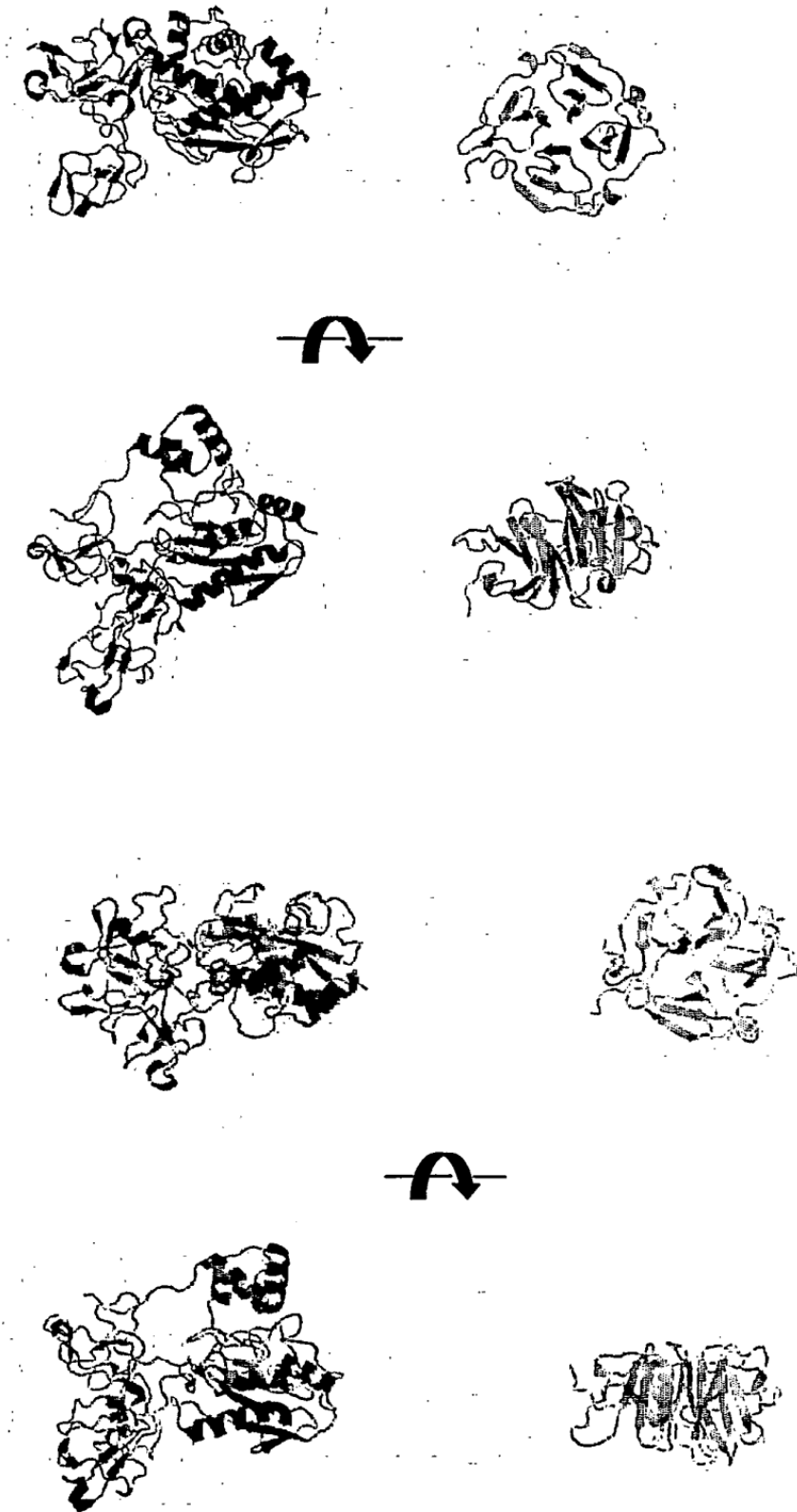


FIG. 5B

FIG. 5A

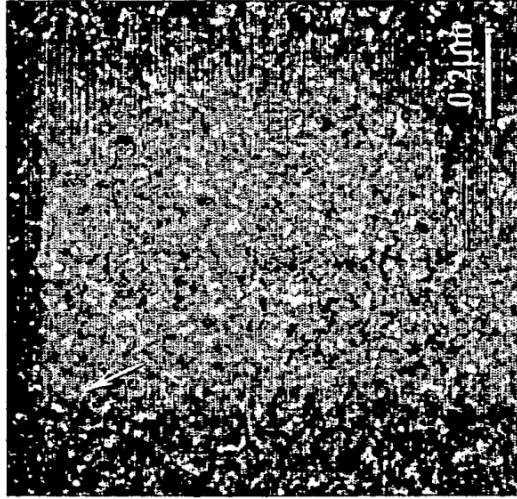


FIG. 6C

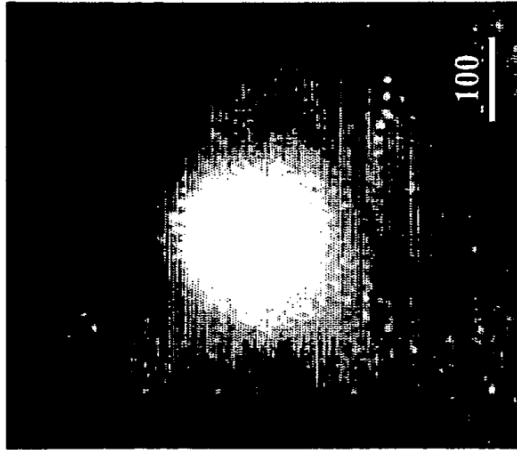


FIG. 6B

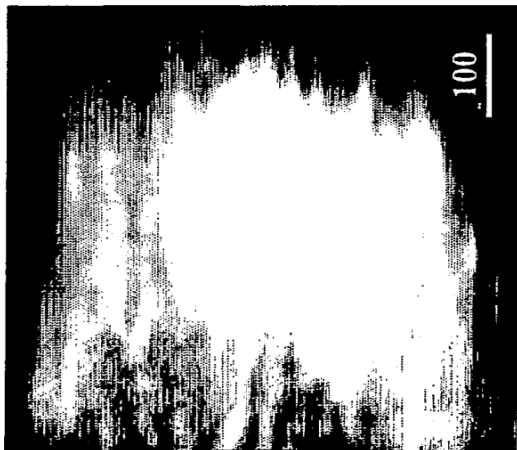


FIG. 6A

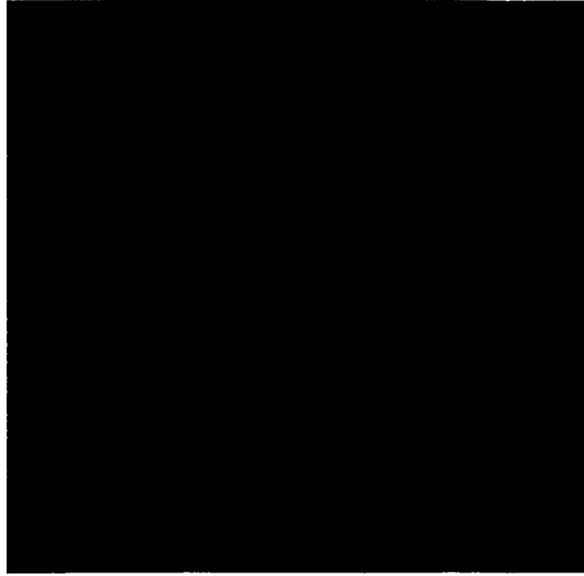


FIG. 7B

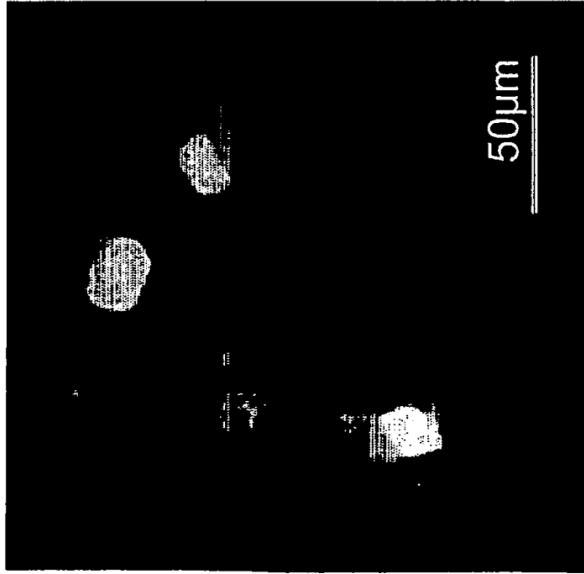


FIG. 7A