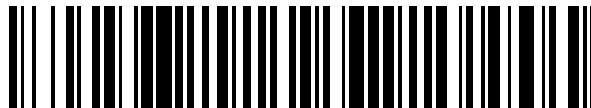


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 548**

51 Int. Cl.:

C07K 14/81 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2004 E 04725742 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 1616007**

54 Título: **Proteínas inhibidoras de una proteasa y su uso**

30 Prioridad:

04.04.2003 US 460345 P

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

26.11.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE LAUSANNE (100.0%)
RUE DE BUGNON 21
1005 LAUSANNE, CH**

72 Inventor/es:

**DEPERTHES, DAVID y
CLOUTIER, SYLVAIN**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 431 548 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

Proteínas inhibidoras de una proteasa y su uso

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a una proteína recombinante inhibidora de una proteasa que comprende una secuencia polipeptídica inhibidora y al menos una secuencia polipeptídica de un sitio de interacción enzima-sustrato específica para una proteasa.

10 Otros objetivos de la invención son proporcionar una secuencia de ADN aislada y purificada que codifica la proteína recombinante inhibidora de una proteasa, un vector de expresión caracterizado porque comprende dicha secuencia de ADN aislada y purificada, una célula huésped eucariota o procariota transformada con este vector de expresión y un método para producir una proteína recombinante inhibidora.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 De todas las proteínas expresadas por los organismos vivos, las proteasas están entre las más críticas en la mediación de las rutas de la vida y la muerte celular. De hecho, las interacciones iniciales entre la proteasa y el sustrato y el posterior clivaje se encuentran en la base de un amplio espectro de eventos biológicos esenciales que incluyen trombosis, coagulación y apoptosis.

20 La proteólisis desregulada o el desequilibrio entre las proteasas y las antiproteasas, se ha buscado intensamente en base a la sospecha de que podría ser un factor clave en muchas patologías en que las proteasas están implicadas, tales como cáncer, enfermedades autoinmunes, inflamación y enfermedades infecciosas. Diferentes estudios realizados con agentes antiproteolíticos en modelos de cáncer y enfermedades inflamatorias (tales como artritis reumatoide y enfisema) han mostrado además un resultado interesante de mejora, fortalecimiento de la terapia antiproteolítica y el papel del equilibrio entre las proteasas y las antiproteasas.

25 Por ejemplo, en cáncer de próstata, que es uno de los cánceres más comunes diagnosticados en hombres americanos, se cree que las proteasas desempeñan un papel fundamental en el comportamiento maligno de las células cancerosas que incluyen un rápido crecimiento tumoral, invasión y metástasis.

30 La proteína calicreína glandular humana (hK2) es una serina proteasa similar a la tripsina expresada predominantemente en el epitelio prostático. Aislada primero del de plasma seminal humano, la hK2 se ha revelado recientemente como un marcador de diagnóstico para el cáncer de próstata (Deperthes y otros 1995 "aislamiento de calicreína prostática hK2, conocida además como hGK-1, en plasma seminal humano" *Biochim Biophys Acta* 1245, 311-6).

35 Además de su papel como marcador, sus actividades proteolíticas sugieren que hK2 puede contribuir a la progresión del cáncer. Se han propuesto varias funciones posibles para esta enzima, que incluyen la activación del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa y la inactivación del inhibidor del activador de plasminógeno-1, la activación de la pro-PSA, la degradación de la fibronectina y la degradación de la proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-BP) (para revisión ver Cloutier y otros, 2004 "Development of recombinant inhibitors specific to human calicreína 2 using phase-display selected substrates" *Eur J Biochem* 3, 607-13).

40 Se mostró recientemente que la calicreína hK2 puede formar un complejo específico con un inhibidor de proteasa, conocido como PI-6, en cánceres y particularmente en cáncer de próstata. Basado en el descubrimiento de este complejo específico, las patentes de Estados Unidos 6,284,873 y 6,472,143 proporcionan un método diagnóstico para determinar la presencia o ausencia de cáncer o necrosis tisular.

45 Al tener en cuenta su expresión específica en el tejido de próstata y la participación de todos sus posibles sustratos en el desarrollo del cáncer, la hK2 se considera además como un objetivo terapéutico (Darson y otros, 1997 "Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker" *Urology* 49, 857-62). Por lo tanto, sería útil el desarrollo de inhibidores de proteasas específicos y duraderos y especialmente los inhibidores de calicreína.

50 Estos candidatos de inhibidores de proteasas se pueden seleccionar entre la familia de la serpina (inhibidores de serina proteasas), que es una gran familia de proteínas implicadas en la regulación de procesos fisiológicos complejos. Estas proteínas de aproximadamente 45 kDa se pueden subdividir en dos grupos, uno que es inhibidor y el otro no inhibidor.

Las serpinas contienen un lazo de sitio reactivo flexible expuesto o lazo de serpina reactivo (RSL), que está implicado en la interacción con la putativa proteínasa objetivo. Después de la unión a la enzima y el clivaje del enlace escindible P1-P1' del RSL, se forma un complejo covalente (Huntington y otros, 2000 "Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation" Nature 407, 923-6). La formación de este complejo induce un importante reordenamiento y de ese modo atrapa irreversiblemente la proteasa objetivo. La especificidad inhibitoria de las serpinas se atribuye en gran parte a la naturaleza de los residuos en las posiciones P1-P1' y la longitud del RSL. Cambiar el dominio RSL o el sitio reactivo de las serpinas es una aproximación para entender el proceso inhibitorio entre una serpina y una enzima y para desarrollar inhibidores específicos (Dufour y otros 2001 "The contribution of arginine residues within the P6-P1 region of alpha 1-antitrypsin to its reaction with furin" J Biol Chem 276, 38971-9 y Plotnick y otros 2002 "The effects of reactive site location on the inhibitory properties of the serpin alpha(1)-antichymotrypsin" J Biol Chem 277, 29927-35).

Varias serpinas tales como el inhibidor de la proteína C, α 2 antiplasmina, antitrombina-III, α 1-antiquimotripsina (ACT), o el inhibidor de proteasa 6 se han identificado como los inhibidores de la hK2 (Saedi y otros, 2001 "La calicreína 2 humana (hK2), pero no el antígeno prostático específico (PSA), rápidamente forma complejos con el inhibidor de proteasa 6 (PI-6) liberado de las células de carcinoma de próstata " Int J Cancer 94, 558-63). La formación relativamente lenta de complejos entre hK2 y ACT se atribuye principalmente a los residuos de Leu 358-Ser 359 en las posiciones P1-P1' del RSL, un enlace peptídico desfavorable para esta enzima de tipo tripsina.

Hasta ahora, se han descrito solamente selecciones de nuevos inhibidores de calicreína, que inhiben específicamente la calicreína de plasma, y su uso en métodos terapéuticos y de diagnóstico (patentes US 6,057,287, US 6,333,402, US 5,994,125, y US 5,795,865). Sin embargo, estas patentes describen la producción de inhibidores que son homólogos a los dominios Kunitz del inhibidor de la tripsina pancreática bovina, y especialmente proteínas que son homólogas a los dominios Kunitz del inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteína (LACI), que inhiben específicamente las calicreínas de plasma.

Otro documento, concretamente US 5,827,662, describe un método para producir inhibidores de proteasa recombinante (variantes de antiquimotripsina) capaces de modular efectivamente la actividad de la serina proteasa. Estos inhibidores siempre comprenden una región de bisagra de un lazo de serpina reactivo (RSL) que tiene las secuencias de aminoácidos modificadas. La región de bisagra es parte del RSL y se extiende a partir de las posiciones P14 a P9.

El documento WO 95/27053, a nombre de la Universidad de Pensilvania, proporciona análogos de la alfa -1-antiquimotripsina que tienen sustituciones de aminoácidos en la posición 358 o las posiciones 356-361. Estos análogos exhiben actividad inhibitoria de quimasa y se usan en la preparación de medicamentos para el tratamiento de inflamación del pulmón, lesión por reperfusión o prevención de coágulos de sangre. No hay indicación de que estos análogos se pueden usar ya sea para la actividad de inhibición de la calicreína o para el tratamiento de cáncer.

Además de ser específico para calicreína del plasma, estos inhibidores son moléculas muy pequeñas y se unen a la calicreína del plasma en una manera reversible. Una de los principales inconvenientes de este enfoque es que el uso de las proteínas que inhiben sus objetivos de una manera reversible tiene el riesgo de que la desunión de la proteasa restaure su actividad.

Por lo tanto, una ventaja de usar inhibidores más grandes, como se describe en la presente descripción, es que esto conduce a la formación de complejos covalentes que inhibe la proteasa objetivo de manera irreversible. Una ventaja adicional de la presente invención es que los grandes complejos covalentes se conoce que se eliminan rápidamente de la circulación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar una proteína inhibitoria de proteasa con alta especificidad por dicha proteasa y su uso en una composición farmacéutica. Esta proteína inhibitoria comprende una secuencia de serpina en donde el lazo P6-P6' de serpina reactivo de dicha secuencia de serpina comprende al menos un sitio activo de sustrato que consiste en una secuencia pentapéptido seleccionada entre SSRTE, KTRSN, ISPRS, GVFRS, GTVRS, ETKRS, LGRSL, RGRSE, RRSID, VSRSP, PFRSS, RSGSV, ARARS, SDRTA, KLRTT, RAAMM, TRAPM, DVRAA, PGRAP, VESRA, ARASE, TLQRV, RLERV, ERVSP, SSPRV, RVGPY, PSARM, RGRMA, TVRMP, LRMP, HRMSS, RPQEL, VRPLE, SGRLA, GTLRF, QWRNS, RNDKL, MRNRA, TRDSR, TGSRD, IMSRQ, LTTSK, PFRKI específica para dicha calicreína, fragmentos biológicamente activos de la misma, una quimera molecular de la misma, y/o una combinación de estas.

Otro objetivo de la invención es proporcionar una secuencia de ADN aislada y purificada que codifica la proteína

recombinante inhibidora de una calicreína, un vector de expresión caracterizado porque comprende dicha secuencia de ADN aislada y purificada y una célula huésped eucariota o procariota transformada con este vector de expresión.

5 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método para producir la proteína recombinante inhibidora de una calicreína. Este método comprende las etapas de

- 10 a) seleccionar una secuencia polinucleotídica que codifica un sitio activo de sustrato específico para dicha calicreína, dicha secuencia consiste en una secuencia pentapéptido seleccionada entre SSRTE, KTRSN, ISPRS, GVFRS, GTVRS, ETKRS, LGRSL, RGRSE, RRSID, VLRSP, PFRSS, RSGSV, ARARS, SDRTA, KLRTT, RAAMM, TRAPM, DVRAA, PGRAP, VESRA, ARASE, TLQRV, RLERV, ERVSP, SSPRV, RVGPY, PSARM, RGRMA, TVRMP, LRMPT, HRMSS, RPQEL, VRPLE, SGRLA, GTLRF, QWRNS, RNDKL, MRNRA, TRDSR, TGSRD, IMSRQ, LTTSK, PFRKI específica para dicha calicreína, una quimera molecular de la misma, y/o una combinación de estas.
- 15 b) introducir dicha secuencia pentapéptido en una secuencia que codifica una secuencia de serpina, para obtener una proteína recombinante inhibidora de dicha calicreína,
- c) permitir la expresión de dicha proteína recombinante inhibidora de dicha calicreína en un sistema de expresión celular bajo condiciones adecuadas,
- d) y recuperar la proteína recombinante inhibidora de dicha calicreína.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 20 **Figura 1** representa un análisis de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras de ACT recombinante purificada. La variante 6.1 (carril 1) y ACT silvestre (carril 2).
- Figura 2** muestra la estequiometría de la inhibición (SI) de hK2 por rACT_{silvestre} y sus variantes. La SI se determinó usando el análisis de regresión lineal para extrapolar la relación I/E (es decir, el intercepto x).
- 25 **Figuras 3 A y B** muestran la formación del complejo entre hK2 y los inhibidores recombinantes. Las flechas indican la hK2 (E), el inhibidor (I), y el complejo hK2-ACT (E-I).
- Figuras 4 A y B** muestran la inhibición de hK2 por rACT_{silvestre} y sus variantes en condiciones de pseudo-primer orden. La interacción de hK2 y las serpinas recombinantes se midió bajo condiciones de pseudo-primer orden por medio del uso del método de la curva de progreso.
- 30 **Figura 5** corresponde a la determinación de la pureza de los inhibidores por análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras de los inhibidores desarrollados en los Ejemplos 1 y 2.
- Figuras 6 A y B** muestran un análisis de transferencia tipo western de la reacción de inhibición entre la ACT recombinante y las calicreínas hK2 humanas (Figura 6A) y el PSA (Figura 6B).
- Figura 7A** muestra las secuencias de ADN y de proteína de MD820
- 35 **Figura 7B** muestra las secuencias de ADN y de proteína de MD62
- Figura 7C** muestra las secuencias de ADN y de proteína de MD83
- Figura 7D** muestra las secuencias de ADN y de proteína de MD67
- Figura 7E** muestra las secuencias de ADN y de proteína de MD61
- Figura 7F** muestra las secuencias de ADN y de proteína de MD518
- 40 **Figura 7G** muestra las secuencias de ADN y de proteína de MDCI
- Figura 8** representa una comparación de las secuencias del RSL de los inhibidores ACT y MD. Los residuos en letra sencilla son comunes a ACT_{silvestre}, los residuos en negrita y subrayados corresponden a una mutación en el RSL de las variantes de ACT. El sitio de clivaje putativo en las serpinas está marcado con un asterisco entre los residuos PIP1'.
- 45 **Figura 9** representa el mapa del vector de expresión pQE9.
- Figura 10A** muestra la inhibición del crecimiento del tumor por MD 62. Las células de cáncer de próstata DU-145 (3×10^6 células), transfectadas con calicreína 2 humana, se implantaron en ratones desnudos y después se trataron con MD 62 (5 o 25 µg/inyección).
- Figura 10B** muestra la inhibición del crecimiento del tumor por MD 67. Las células de cáncer de próstata DU-145 (3×10^6 células), transfectadas con calicreína 2 humana, se implantaron en ratones desnudos y después se trataron con MD 67 (5 o 25 µg/inyección).
- 50 **Figura 11** muestra la inhibición del crecimiento del tumor por MD CI. Las células de cáncer de próstata DU-145 (3×10^6 células), transfectadas con calicreína 2 humana, se implantaron en ratones desnudos y después se trataron con MD CI (5 o 50 µg/inyección).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- La presente invención se refiere a una proteína recombinante inhibidora de una calicreína, que comprende una secuencia de serpina en donde el lazo P6-P6' de serpina reactivo de dicha secuencia de serpina comprende al menos un sitio activo de sustrato que consiste en una secuencia pentapéptido seleccionada entre SSRTE, KTRSN, ISPRS, GVFRS, GTVRS, ETKRS, LGRSL, RGRSE, RRSID, VLRSP, PFRSS, RSGSV, ARARS, SDRTA, KLRTT, RAAMM, TRAPM, DVRAA, PGRAP, VESRA, ARASE, TLQRV, RLERV, ERVSP, SSPRV, RVGPY, PSARM, RGRMA, TVRMP, LRMPT, HRMSS, RPQEL, VRPLE, SGRLA, GTLRF, QWRNS, RNDKL, MRNRA, TRDSR, TGSRD, IMSRQ, LTTSK, PFRKI específica para dicha calicreína, una quimera molecular de la misma, y/o una combinación de estas.
- "Proteína inhibidora quimérica" se refiere a una proteína que comprende dos o más polipéptidos, que son de diferentes orígenes, es decir, que no se producen juntos en la naturaleza.
- Como se usa en la presente descripción, los términos "proteína", "polipéptido", "polipeptídico", "péptido" y "peptídico" se usan de forma intercambiable en la presente descripción para designar una serie de residuos de aminoácidos conectados al otro por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxi de residuos adyacentes.
- La proteína de la invención es un inhibidor de una proteasa y está compuesta de una secuencia polipeptídica inhibidora y de, al menos, una secuencia polipeptídica de un sitio de interacción enzima-sustrato específico para dicha proteasa. La secuencia polipeptídica de un sitio de interacción enzima-sustrato confiere propiedades altamente selectivas del inhibidor hacia una proteasa particular y esta secuencia polipeptídica se selecciona en base a la proteasa que se inhibe.
- Típicamente, esta secuencia polipeptídica de un sitio de interacción enzima-sustrato puede ser una secuencia de sitio activo de sustrato. La "secuencia de sitio activo de sustrato" se refiere a una secuencia encontrada sobre un sustrato y que es un sitio de reconocimiento preferencial por una proteasa. El reconocimiento de la secuencia del sitio activo de sustrato por una proteasa puede conducir a la activación, inactivación o degradación del sustrato y la mayoría de las veces esta interacción de alta afinidad implica no sólo de una secuencia específica sino además su conformación 3-D.
- La presente invención además abarca una quimera molecular de la secuencia del sitio activo de sustrato. Por "quimera molecular" se entiende una secuencia de polinucleótido que puede incluir una porción funcional de la secuencia del sitio activo de sustrato y que se obtendrá, por ejemplo, por las técnicas de química de proteínas conocidas para aquellos con experiencia en la técnica.
- Combinaciones particulares de secuencias del sitio activo de sustrato además se consideran en la presente invención.
- La presente invención además incluye variantes de la secuencia del sitio activo de sustrato. El término "variantes" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácido que difieren en cierta medida de un polipéptido de secuencia nativa, o sea secuencias de aminoácido que varían de la secuencia nativa por sustituciones conservativas de aminoácidos, mediante la cual uno o más aminoácidos se sustituyen por otro con las mismas características y funciones conformacionales. Las variantes de secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones, y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácido de la secuencia de aminoácido nativa. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se definen en la presente descripción como los intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:
- I. Residuos no polares o ligeramente polares, alifáticos, pequeños: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
 - II. Residuos positivamente cargados polares: His, Arg, Lys
 - III. Residuos negativamente cargados polares: y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln
 - IV. Residuos aromáticos, grandes: Phe, Tyr, Trp
 - V. Residuos no polares, alifáticos, grandes: Met, Leu, Ile, Val, Cys.
- Preferentemente el sustrato de la presente invención es una serpina, en este caso la secuencia del sitio activo de sustrato puede ser una secuencia lazo de serpina reactiva, una quimera molecular de la misma, una combinación de estas y/o variantes de estas.
- El "lazo de serpina reactivo" o "lazo de sitio reactivo" o RSL se refiere a un lazo de sitio reactivo flexible, expuesto, encontrado en la serpina y que está implicado en la interacción con la proteasa objetivo putativa. A partir del residuo en el aminoácido al lado del enlace escindible, y alejándose del enlace, los residuos se denominan convencionalmente P1, P2, P3, etc. Los residuos que siguen el enlace escindible se denominan P1', P2', P3', etc. Por lo general, el RSL se compone de 6 a 12 residuos de aminoácidos.

ES 2 431 548 T3

Esta secuencia del RSL se puede seleccionar a partir del grupo que comprende la sec. con núm. de ident. 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22, las quimeras moleculares de las mismas, combinaciones de las mismas y/o variantes de las mismas.

5 La secuencia del RSL además se puede seleccionar entre las siguientes posibilidades que se muestran en la Tabla I.

Tabla I

Las posiciones en el RSL que pueden ser cambiadas								
P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
		S	S	R	T	E		
		K	T	R	S	N		
	I	S	P	R	S			
	G	V	F	R	S			
	G	T	V	R	S			
	E	T	K	R	S			
		L	G	R	S	L		
		R	G	R	S	E		
			R	R	S	I	D	
		V	L	R	S	P		
		P	F	R	S	S		
				R	S	G	S	V
	A	R	A	R	S			
		S	D	R	T	A		
		K	L	R	T	T		
				R	A	A	M	M
			T	R	A	P	M	
		D	V	R	A	A		
		P	G	R	A	P		
	V	E	S	R	A			
			A	R	A	S	E	
	T	L	Q	R	V			
	R	L	E	R	V			
			E	R	V	S	P	
	S	S	P	R	V			
				R	V	G	P	Y
	P	S	A	R	M			
		R	G	R	M	A		
		T	V	R	M	P		
			L	R	M	P	T	
			H	R	M	S	S	

Las posiciones en el RSL que pueden ser cambiadas								
P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
				R	P	Q	E	L
			V	R	P	L	E	
		S	G	R	L	A		
	G	T	L	R	F			
		Q	W	R	N	S		
				R	N	D	K	L
			M	R	N	R	A	
			T	R	D	S	R	
	T	G	S	R	D			
	I	M	S	R	Q			
L	T	T	S	K				
	P	F	R	K	I			

La secuencia de aminoácidos de los residuos P4-P3' en el RSL (lazo de serpina reactivo) correspondiente al péptido sustrato potencial
 Los espacios en blanco indican que no hay necesidad de ninguna modificación con el fin de obtener especificidad de sustrato para hK2.

5 Por lo general la proteasa se selecciona del grupo que comprende las enzimas calicreína, quimotripsina (Chtr), uroquinasa (uPA) y elastasa de neutrófilos humana (HNE). Preferentemente, la proteasa es una calicreína humana, con la máxima preferencia esta calicreína humana es hK2 conocida además como hGK-1).

10 La hK2 pertenece a la familia del gen de calicreína que está compuesto de 15 miembros, pero sólo el antígeno prostático específico (PSA o hK3) y hK2 se expresan en un nivel alto en la próstata. Uno de los papeles fisiológicos potenciales de la hK2 es la degradación proteolítica del gel de atrapamiento de esperma que se forma inmediatamente después de la eyaculación, particularmente el clivaje de las semenogelinas y fibronectina. Adicionalmente, se demostró en una prueba *in vitro* que la hK2 puede mejorar la acción mitogénica del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF) por la hidrólisis de las proteínas de unión del IGF. Los estudios *in vitro* además mostraron que la hK2 activa la prouroquinasa, genera sustancias de tipo bradicinina a partir de quinínógenos (activación cruzada potencial de los receptores del EGF a través de los receptores de bradiquinina B2) y convierte el proPSA en una forma activa. Estas actividades de hK2 representan
 15 argumentos a favor de un papel potencial de hK2 en la degradación de proteínas de la matriz extracelular y el consiguiente desprendimiento y migración de las células de cáncer de próstata. Adicionalmente, la hK2 podría mejorar el desarrollo del cáncer de próstata por liberación del factor mitogénico y activación de los receptores de crecimiento.

20 En el caso de que la proteasa inhibida es una cisteína proteasa, entonces esta proteasa se selecciona del grupo que comprende catepsinas (subtipos K, L, y S), prohormona tiol proteinasa y la familia de las caspasas (caspasas 1, 3, 4, y 8).

25 Las cisteína proteasas, que son enzimas proteolíticas que utilizan un residuo de cisteína para su actividad catalítica, se pueden agrupar en al menos 30 familias de proteínas. Cada familia contiene proteínas con secuencias de aminoácidos similares y motivos de secuencia conservados evolutivamente que reflejan las estructuras 3D similares de los miembros de la familia.

La secuencia polipeptídica inhibidora de la proteína recombinante inhibidora es por lo general una serina o una cisteína proteasa.

30 En el caso de que la secuencia polipeptídica inhibidora sea de una serina proteasa entonces esta secuencia polipeptídica inhibidora es preferentemente una secuencia de serpina, fragmentos de la misma, una quimera molecular de la misma, una combinación de la misma y/o variantes de la misma.

Esta secuencia de serpina puede seleccionarse del grupo que comprende la α -1antiquimotripsina (ACT), inhibidor de la

proteína C (PCI), α -1 antiproteinasas (AAT), precursor de la proteína relacionada con la α -1 antitripsina humana (ATR), inhibidor de la α -2-plasmina (AAP), precursor de la antitrombina-III humana (ATIII), inhibidor de proteasa 10 (PI10), precursor de la proteína 2 de unión a colágeno humano (CBP2), inhibidor de proteasa 7 (PI7), leuserpina inhibidor de proteasa 2 (HLS2), inhibidor de la proteasa C1 de plasma humano (C1 INH), inhibidor de la elastasa monocito/neutrófilo (M/NEI), inhibidor del activador del plasminógeno tipo 3 (PAI3), inhibidor de proteasa 4 (PI4), inhibidor de proteasa 5 (PI5), inhibidor de proteasa 12 (PI12), inhibidor del activador del plasminógeno humano tipo 1 precursor endotelial, inhibidor del activador de plasminógeno humano tipo 2 de la placenta (PAI2), precursor del factor derivado del epitelio pigmentado humano (PEDF), inhibidor de proteasa 6 (PI6), inhibidor de proteasa 8 (PI8), inhibidor de proteasa 9 (PI9), antígeno 1 humano asociado al carcinoma de células escamosas (SCCA-1), antígeno 2 humano asociado al carcinoma de células escamosas (SCCA-2), globulina de unión a T4 (TBG), Megsin, e inhibidor de proteasa 14 (PI14), fragmentos de estos, quimeras moleculares de estos, combinaciones de los mismos y/o variantes de estos.

Ya que la mayoría de estas serpinas tiene diferentes nombres, se incluye más abajo una tabla que resume las especificaciones:

Tabla II

Serpina	Número de Acceso	Secuencia RSL
PI o AAT, A1AT_PRECURSOR DE LA ALFA-1-ANTITRIPSINA HUMANA (INHIBIDOR DE LA ALFA-1 PROTEASA) (ALFA-1-ANTIPROTEINASA)	sp P01009	GTEAAGAMFLEAIPMSIPPE
PIL o ATR, A1AU_PRECURSOR DE LA PROTEÍNA RELACIONADA A LA ALFA-1-ANTITRIPSINA HUMANA	sp P20848	GTEATGAPHLEEKAWSKYQT
PLI o AAP, A2AP_PRECURSOR DE LA ALFA-2-ANTIPLASMINA HUMANA (INHIBIDOR DE LA ALFA-2-PLASMINA) (ALFA-2-PI) (ALFA-2-AP)	sp P08697	GVEAAAATSIAMSRMSLSSF
AACT, AACT_PRECURSOR DE LA ALFA-1-ANTIQUIMOTRIPSINA HUMANA (ACT)	sp P01011	GTEASAATAVKITLLSALVE
AT3. ANT3_PRECURSOR ANTITROMBINA III HUMANA (ATIII)	sp P01008	GSEAAASTAWIAGRSLNPN
PI10, BOMA_BOMAPINA HUMANA (INHIBIDOR DE PROTEASA 10)	sp P48595	GTEAAAGSGSEIDIRIVPS
CBP2, CBP2_PRECURSOR DE LA PROTEÍNA 2 DE UNIÓN AL COLÁGENO HUMANA (COLLIGIN 2)	sp P50454	GNPFDQDIYGREELRSPKLF
PI7 o PN1, GDN_PRECURSOR DE NEXINA DERIVADA DE LA GLÍA HUMANA (GDN) (PROTEASA NEXINA I) (PN-1) (INHIBIDOR DE PROTEASA 7)	sp P07093	GTKASAATTAILIARSSPPW
HCF2, HEP2_PRECURSOR DEL COFACTOR DE HEPARINA II HUMANO (HC-II) (INHIBIDOR DE LA PROTEASA LEUSERPINA 2) (HLS2)	sp P05546	GTQATTVTTVGFMLSTQVR
C1NH o C1IN, IC1_PRECURSOR DEL INHIBIDOR DE LA PROTEASA C1 DE PLASMA HUMANA (C1 INH)	sp P05155	GVEAAAASAVISVARTLLVFE
ELANH2 o PI2, ILEU_INHIBIDOR DE LA ELASTASA DE LEUCOCITOS HUMANA (LEI) (ELASTASA MONOCITOS/NEUTRÓFILOS	sp P30740	GTEAAAATAGIATFCMLMPE
INHIBIDOR) (M/NEI) (EI)		
PCI o PLANH3 o PROCI, IPSP_PRECURSOR	sp P05154	GTRRAAATGTIFTFRSARLN

Serpina	Número de Acceso	Secuencia RSL
DEL INHIBIDOR DE LA SERINA PROTEASA DE PLASMA HUMANA (PCI) (INHIBIDOR DE LA PROTEINA C) (INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO-3) (PAI3)		
PI4 o KST, KAIN_PRECURSOR DE LA CALISTATINA HUMANA (INHIBIDOR DE CALICREÍNA) (INHIBIDOR DE PROTEASA 4)	sp P29622	GTEAAAATTFAIKFFSAQTN
PI5, MASP_PRECURSOR DE MASPINA HUMANA (INHIBIDOR DE PROTEASA 5)	sp P36952	GGDSIEVPGARILQHKDELN
PI12, NEUS_PRECURSOR DE NEUROSERPINA HUMANA (INHIBIDOR DE PROTEASA 12)	sp Q99574	GSEAAAVSGMIAISRMAVLY
PAI1 o PLANH1, sp P05121 PAI1_PRECURSOR DEL INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO 1 HUMANO, ENDOTELIAL (PAI-1)	sp P05121	GTVASSSTAVIVSARMAPEE
PAI2 o PLANH2, PAI2_INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO-2 HUMANO, DE PLACENTA (PAI-2) (ARG-SERPINA DE MONOCITOS) (INHIBIDOR DE UROQUINASA)	sp P05120	GTEAAAGTGGVMTGRTGHGG
PEDF, PEDF_PRECURSOR DEL FACTOR DERIVADO DEL EPITELIO PIGMENTADO HUMANO (PEDF) (EPC-1)	sp P36955	GAGTTPSPGLQPAHLTFPLD
PI6 o PTI, PTI6_INHIBIDOR TROMBINA DE PLACENTA HUMANA (ANTIPROTEINASA CITOPLÁSMICA) (CAP) (INHIBIDOR DE PROTEASA 6)	sp P35237	GTEAAAATAAIMMMRCARFV
PI8, PTI8_ANTIPROTEINASA CITOPLÁSMICA 2 HUMANA (CAP2) (CAP-2) (INHIBIDOR DE PROTEASA 8)	sp P50452	GTEAAAATAWRNSRCSRME
PI9, PTI9_ANTIPROTEINASA CITOPLÁSMICA 3 HUMANA (CAP3) (CAP-3) (INHIBIDOR DE PROTEASA 9)	sp P50453	GTEAAAASSCFVVAECCMES
SCCA1, SCC1_ANTÍGENO 1 HUMANO ASOCIADO AL CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (SCCA-1) (PROTEINA T4-A)	sp P295081	GAEAAAATAVVFGSSPAST
SCCA2, SCC2_ANTÍGENO 2 HUMANO ASOCIADO AL CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (SCCA-2) (LEUPIN)	sp P48594	GVEAAAATAWWELSSPST
TBG, THBG_PRECURSOR DE LA GLOBULINA DE UNIÓN A TIROXINA HUMANA (T4-GLOBULINA DE UNIÓN)	sp P05543	GTEAAAVPEVELSDQPENTF
MEGSIN	gi 4505149 ref N P 003775.1	GTEATAATGSNIVEKQLPQS
PI14, pancpin, TSA2004	gi 374282 dbj B AA33766.1	GSEAATSTGIHIPVIMSLAQ

Como un ejemplo de proteínas recombinantes inhibidoras de una calicreína de acuerdo con la invención, los solicitantes

encontraron sorprendentemente 6 nuevas proteínas inhibidoras específicas para la proteasa hK2 como se resume más abajo en la Tabla III, estos inhibidores son:

Tabla III

Inhibidores recombinantes	Otro nombre	sec. con núm. de ident. (proteína)
rACT_{8.20}	MD820	2
rACT_{6.2}	MD62	4
rACT_{8.3}	MD83	6
rACT_{6.7}	MD67	8
rACT_{6.1}	MD61	10
ACT_{5.18}	MD518	12

5

Estas proteínas recombinantes inhibidoras se han obtenido por modificación del RSL de la α 1-antiquimotripsina (rACT), que se sabe que inhibe un gran panel de enzimas humanas tales como quimotripsina, quimasa de mastocitos, catepsina G, calicreínas prostáticas hK2 y PSA (hK3), con el fin de cambiar la especificidad de esta serpina. Las secuencias de péptidos, seleccionadas como sustratos para la enzima hK2 por la tecnología de presentación en fagos como se explica en detalle en el Ejemplo 1, se han usado para reemplazar el enlace escindible y los residuos de aminoácidos vecinos del RSL. Los inhibidores recombinantes se produjeron en bacterias y se purificaron por cromatografía de afinidad.

10

En comparación con el rACT silvestre, que inhibió hK2 muy lentamente (12-16h), los rACTs modificados se mostró que muy rápidamente forman un complejo covalente en pocos minutos. Tres de las seis variantes de rACT fueron específicas para hK2 con altas constantes de asociación (ver las Tablas V y VI). Al incubar con un exceso de inhibidores ($[I]_0/[E]_0$ de 100:1) durante 30 minutos, la hK2 se inhibió completamente por rACT_{6.2}, rACT_{8.3}, rACT_{6.7} y rACT_{6.1}, mientras rACT_{8.20} y rACT_{5.18} inhibieron 95 % y 73 % de la actividad de la enzima, respectivamente. Bajo esta condición, el rACT silvestre no mostró actividad de inhibición hacia la hK2. Entre estas variantes, dos (rACT_{8.3} y rACT_{5.18}) son específicas para hK2, sin inhibir ninguna otra enzima probada. Otras dos variantes, rACT_{6.7} y rACT_{6.2}, inhibieron también PK a 36 % y 100% respectivamente. Como la ACT silvestre, la variante rACT_{8.20} inhibió las dos proteasas de tipo quimotripsina Chtr y PSA pero adicionalmente también PK y HNE. Ninguna de las serpinas recombinantes mostró actividad inhibidora contra la calicreína hK1 y uPA.

15

20

Además, los solicitantes encontraron que el reemplazo de los residuos P3-P3' situados en la estructura RSL del rACT_{silvestre} por el pentapéptido sustrato que codifica para el RSL del inhibidor de la proteína C (PCI) conduce a la producción de un inhibidor recombinante (MDCI) que es capaz de inhibir las calicreínas hK2 y hK3.

25

Por lo tanto, el inhibidor recombinante de una proteasa se puede seleccionar del grupo que comprende MD820, MD62, MD61, MD67 y MDCI. Preferentemente esta proteína recombinante inhibidora es MD62 o MD61.

30

Se sabe que un valor de la estequiometría de inhibición (SI) superior a uno generalmente se interpreta como un comportamiento de sustrato de serpina. En este esquema, después de la formación de un complejo de Michaelis inicial y el clivaje en el RSL, la mayor parte del complejo se descompone en la enzima activa y el inhibidor clivado que se inactiva definitivamente. Los solicitantes analizaron las reacciones de ACT variantes-hK2 para los clivajes del inhibidor no formadores de complejos, al incubar las muestras en un exceso de 10:1 veces de inhibidor a proteasa. Estas condiciones, cerca o por debajo de los valores de SI calculados de las variantes de ACT probadas (ver la Tabla VI), normalmente favorecen la proteólisis de las serpinas o los complejos serpinas- proteasas. Sorprendentemente, los solicitantes observaron una discrepancia a esta hipótesis, ya que no se observó la degradación de las ACTs variantes por hK2 a pesar de los altos valores de SI. Sin desear estar ligado por la teoría, una posible explicación para la falta de degradación de ACT es la condición bajo la cual se llevó a cabo la determinación de SI. Los complejos ACTs-hK2 covalentes se forman *in vitro* muy lentamente. Esto está de acuerdo con nuestra observación de que después de 30 minutos de incubación a 25°C no se detecta inhibición de hK2 con ACT silvestre (Tabla V) y que, incluso después de una incubación prolongada a 37°C, la hK2 fue sólo parcialmente unida con ACT silvestre (Figura 3).

35

40

45

Los solicitantes evaluaron además la especificidad de estos nuevos inhibidores hacia otras proteasas. La evaluación se llevó a cabo en las mismas condiciones para todas las proteasas (condiciones pseudo-fisiológicas) con el fin de garantizar una mejor traducción para aplicaciones adicionales *in vivo*. La permutación del sitio de clivaje del RSL para los sustratos

seleccionados por presentación en fagos de hK2 ha cambiado la ACT silvestre en inhibidores altamente sensibles para hK2. Adicionalmente, dos de estos inhibidores mostraron una reactividad única con hK2 y no con otras enzimas estudiadas que se conoce que se dirigen a sustratos biológicos similares, tales como la calicreína de plasma, hK1, PSA, uroquinasa (uPA), y elastasa de neutrófilos humana (HNE). Según el conocimiento de los solicitantes, este es el primer informe que menciona el desarrollo de un inhibidor específico de hK2.

Curiosamente, rACT_{8,20} (MD820) inhibe además de hK2 también quimotripsina, y más débilmente calicreína de plasma y elastasa humana lo que representa una amplia especificidad de inhibición.

La secuencia polipeptídica inhibidora de la proteína recombinante inhibidora además se puede seleccionar de una cisteína proteasa ya que hay ahora un número de casos bien documentados de la inhibición de las cisteína proteasas por serpinas (Gel/ins P.G. W., 2002 "Serpins structure, mechanism, and function" in Chem. Rev, 102, 4751-4803). Estos ejemplos incluyen la inhibición de las catepsinas K, L y S por la serpina antígeno 1 del carcinoma de células escamosas, la inhibición de la prohormona tior proteinasa por la α -1antiquimotripsina, y la inhibición de los miembros de la familia de las caspasas, que incluyen caspasa 1 (enzima de conversión de la interleucina 1 β), caspasa 3, y caspasa 8 por la serpina viral crmA y caspasas 1, 4 y 8 por la serpina PI9 humana.

Cuando se emplean técnicas recombinantes para preparar una proteína recombinante inhibidora de una proteasa de acuerdo con la presente invención, se usan preferentemente las moléculas de ácido nucleico o fragmentos de los mismos que codifican los polipéptidos.

Por lo tanto, la presente invención se refiere además a una secuencia de ADN purificada y aislada que codifica la proteína recombinante inhibidora de una proteasa como se describió anteriormente.

"Una secuencia de ADN purificada y aislada" se refiere al estado en que estará la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante inhibidora de una proteasa de la invención, o el ácido nucleico que codifica esa proteína recombinante inhibidora de una proteasa, de acuerdo con la presente invención. El ácido nucleico, estará libre o sustancialmente libre del material con el que se asocia naturalmente tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su ambiente natural, o el medio ambiente en el que se preparan (por ejemplo cultivos de células) cuando la preparación es por la tecnología del ADN recombinante realizada *in vitro* o *in vivo*.

El ADN que se puede usar en la presente descripción es cualquier secuencia de polidesoxinucleótido, que incluye, por ejemplo, ADN de cadena doble, ADN de cadena sencilla, ADN de cadena doble en donde una o ambas cadenas están compuestas de dos o más fragmentos, ADN de cadena doble en donde una o ambas cadenas tienen un esqueleto de enlaces fosfodiéster ininterrumpido, ADN que contiene una o más porciones de cadena simple y una o más porciones de cadena doble, ADN de cadena doble en donde las cadenas de ADN son totalmente complementarias, ADN de cadena doble en donde las cadenas de ADN son sólo parcialmente complementarias, ADN circular, ADN covalentemente cerrado, ADN lineal, ADN reticulado covalentemente, ADNc, ADN químicamente sintetizado, ADN semi-sintético, ADN biosintético, ADN aislado naturalmente, ADN digerido por enzima, ADN cortado, ADN marcado, tal como ADN radiomarcado y ADN marcado con fluorocromo, ADN que contiene una o más especies de ácido nucleico de origen no natural.

Las secuencias de ADN que codifican la proteína recombinante inhibidora de una proteasa, o un fragmento de esta, puede sintetizarse por técnicas químicas estándar, por ejemplo, el método del fosforéster o a través de métodos de síntesis automatizados y métodos PCR.

La secuencia de ADN aislada y purificada que codifica la proteína recombinante inhibidora de acuerdo con la invención puede producirse además por técnicas enzimáticas. Así, las enzimas de restricción, que escinden moléculas de ácido nucleico en secuencias de reconocimiento predefinidas pueden usarse para aislar secuencias de ácido nucleico de moléculas de ácido nucleico más grandes que contienen la secuencia de ácido nucleico, tal como ADN (o ARN) que codifica la proteína recombinante inhibidora o para un fragmento de esta.

La presente invención además abarca un ácido nucleico en forma de un polirribonucleótido (ARN), que incluye, por ejemplo, ARN de cadena sencilla, ARN de cadena doble, ARN de cadena doble en donde una o ambas cadenas se componen de dos o más fragmentos, ARN de cadena doble en donde una o ambas cadenas tienen un esqueleto de enlaces fosfodiéster ininterrumpido, ARN que contiene una o más porciones de cadena sencilla y una o más porciones de cadena doble, ARN de cadena doble en donde las cadenas de ARN son totalmente complementarias, ARN de cadena doble en donde las cadenas de ARN son sólo parcialmente complementarias, ARN reticulado covalentemente, ARN digerido por enzima, ARN cortado, ARNm, ARN químicamente sintetizado, ARN semi-sintético, ARN biosintético, ARN aislado naturalmente, ARN marcado, tal como ARN radiomarcado y ARN marcado con fluorocromo, ARN que contiene una o más especies de ácido nucleico de origen no natural.

La secuencia de ADN aislada y purificada que codifica un inhibidor recombinante de una proteasa se selecciona preferentemente del grupo que comprende sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 5, sec. con núm. de ident.: 7, sec. con núm. de ident.: 9, sec. con núm. de ident.: 1 y sec. con núm. de ident.: 13.

5

La presente invención incluye además variantes de las secuencias antes mencionadas, o sea secuencias de nucleótido que varían de la secuencia de referencia por sustituciones de nucleótidos conservativas, con lo cual uno o más nucleótidos son sustituidos por otro con las mismas características.

10

Aún en otro aspecto de la presente invención se proporciona un vector de expresión que comprende la secuencia purificada y aislada que codifica la proteína recombinante inhibidora de una proteasa como se describió anteriormente. La selección de un vector de expresión depende directamente, como se conoce bien en la técnica, en las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo, expresión de la proteína recombinante inhibidora y la célula huésped a transformar o transfectar.

15

Además, el vector de expresión puede comprender adicionalmente un promotor operativamente unido a la secuencia de ADN aislada y purificada. Esto significa que la secuencia de ADN aislada y purificada unida que codifica la proteína recombinante inhibidora de una proteasa de la presente invención está bajo control de una secuencia reguladora adecuada que permite la expresión, es decir, la transcripción y traducción de la secuencia de ADN aislada y purificada insertada.

20

Como se usa en la presente descripción, el término "promotor" designa cualquiera de las secuencias reguladoras adicionales como se conocen en la técnica, por ejemplo, un promotor y/o un potenciador, sitios de poliadenilación y uniones de empalme empleados por lo general para la expresión del polipéptido o puede incluir adicionalmente una o más secuencias separadas para direccionalizar y opcionalmente puede codificar un marcador seleccionable. Los promotores que pueden usarse siempre que esos promotores sean compatibles con la célula huésped son por ejemplo promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus polio, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma (tal como virus del papiloma bovino), virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (tal como el promotor temprano inmediato de citomegalovirus murino o humano), un retrovirus, virus de la hepatitis B, y virus del simio 40 (tal como los promotores tempranos o tardíos de SV 40) o promotores obtenidos a partir de promotores mamíferos heterólogos, tales como el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina o promotores de choque térmico.

25

30

Los potenciadores que pueden usarse son, por ejemplo, las secuencias potenciadoras conocidas a partir de genes mamíferos (globina, elastasa, albúmina, a-fetoproteína, e insulina) o potenciadores a partir de un virus de célula eucariota, por ejemplo, el potenciador SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el polio, y los potenciadores de adenovirus.

35

Una amplia variedad de combinaciones huésped/vector de expresión pueden emplearse para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético. Los vectores adecuados incluyen los derivados del SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, los plásmidos de E. coli col EI, pCRI, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADN de fago, por ejemplo, numerosos derivados del fago X, por ejemplo, NM989, y otro ADN de fago, por ejemplo, M13 y ADN de fago de cadena sencilla filamentoso; plásmidos de levadura tales como el plásmido 2 μ o derivados de los mismos; vectores útiles en células eucariotas, tales como los vectores útiles en células de insecto o de mamífero; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, tales como plásmidos que se han modificado para emplear ADN de fago u otras secuencias de control de expresión; y similares.

40

45

Con la máxima preferencia el vector de expresión es pQE-9.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una célula huésped eucariota o procariota transformada o transfectada con un vector de expresión descrito en la presente.

50

El término "célula transfectada" o "célula transformada" o "célula transfectada/transformada" significa la célula en la cual el ADN extracelular se introduce y así alberga el ADN extracelular. El ADN se puede introducir en la célula de modo que el ácido nucleico se replique, ya sea como un integrante cromosómico o como un elemento extra cromosómico.

55

La transformación o transfección de células huésped eucariotas o procariotas adecuadas con un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN aislada y purificada de acuerdo con la invención se realiza por métodos bien conocidos que típicamente dependen del tipo de vector usado. Con respecto a estos métodos, ver por ejemplo, Maniatis y otros 1982, Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory y los métodos comercialmente disponibles.

Las proteínas recombinantes inhibitoras descritas en la presente descripción se producen preferentemente, por vía recombinante, en un sistema de expresión celular.

5 Una amplia variedad de células huésped unicelulares son útiles para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucariotas y procariotas bien conocidos, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hongos tales como levaduras, y células animales, tales como CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1. Las células I, B-W y L-M, células de riñón de mono verde africano (por ejemplo, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, y BMT10), células de insecto (por ejemplo, Sf9), y células humanas y células vegetales en cultivo de tejido. Preferentemente, la célula huésped es una célula bacteriana, con mayor preferencia una célula de *E. coli*.

La presente invención se dirige además a una composición farmacéutica que comprende la proteína recombinante inhibitora como se describe en la presente descripción como un agente activo, opcionalmente en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

15 Preferentemente, además de al menos una proteína recombinante inhibitora como se describe en la presente descripción, la composición farmacéutica puede contener uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como excipientes, portadores y/o auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en la preparación que se puede usar farmacéuticamente.

20 Los portadores, excipientes, o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como octadecildimetilbencil cloruro de amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metilo o propilparabén; catacol; resorcina; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos que aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo los complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos, tal como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).

30 La forma de administración de la composición farmacéutica puede ser sistémica o tópica. Por ejemplo, la administración de una composición de este tipo puede ser varias rutas parenterales tales como subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, rutas bucales o a través de un dispositivo implantado, y puede ser además suministrada por medios peristálticos.

35 La composición farmacéutica que comprende una proteína recombinante inhibitora, como se describe en la presente descripción, como un agente activo puede incorporarse o impregnarse además en una matriz bioabsorbible, donde la matriz se administra en forma de una suspensión de la matriz, un gel o un soporte sólido. Adicionalmente la matriz puede estar compuesta por un biopolímero.

40 Las preparaciones de liberación sostenida pueden prepararse. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, dichas matrices son en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilo-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de Estados Unidos núm. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y [gamma] etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT(TM) (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

45 Las formulaciones que se usan para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por ejemplo mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

50 Se entiende que la dosificación adecuada de una proteína recombinante inhibitora de la presente invención será dependiente de la edad, sexo, salud, y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, y la naturaleza del efecto deseado.

La forma de dosificación adecuada dependerá de la enfermedad, la proteína recombinante inhibitora, y el modo de

administración; las posibilidades incluyen tabletas, cápsulas, pastillas, pastas dentales, supositorios, inhaladores, soluciones, pomadas y depósitos parenterales.

5 Ya que la presente invención además abarca las modificaciones de aminoácidos de los aminoácidos de la proteína recombinante inhibidora, esto puede ser útil para la reticulación de la proteína recombinante inhibidora con una matriz insoluble en agua u otros portadores macromoleculares, o para mejorar la solubilidad, la adsorción, y la permeabilidad a través de la barrera de sangre del cerebro. Tales modificaciones se conocen bien en la técnica y alternativamente pueden eliminar o atenuar cualquier posible efecto secundario indeseable de la proteína y similares.

10 Aunque la composición farmacéutica preferida de la presente invención comprende una proteína recombinante inhibidora como un agente activo, una composición farmacéutica alternativa puede contener una secuencia de ADN aislada y purificada que codifica la proteína recombinante inhibidora de una proteasa, como se describe en la presente descripción, como un agente activo. Esta composición farmacéutica puede incluir solo la secuencia de ADN aislada y purificada, un vector de expresión que comprende dicha secuencia de ADN aislada y purificada o una célula huésped previamente transfectada con un vector de expresión descrito en la presente descripción. En este último ejemplo, la célula huésped se aislará preferentemente del paciente a tratar para evitar cualquier problema de antigenicidad. Estas aproximaciones de terapia celular y génica son especialmente bien seguidas por los pacientes que requieren administración repetida de la composición farmacéutica, ya que dicha secuencia de ADN aislada y purificada, vector de expresión o célula huésped previamente transfectada con un vector de expresión puede incorporarse en la célula del paciente quien producirá después la proteína endógenamente.

La presente descripción proporciona además un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con la proteólisis en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero la composición farmacéutica como se describe en la presente descripción.

25 El presente método para tratar o prevenir un trastorno asociado con la proteólisis puede ser útil en caso de que el trastorno sea un trastorno en el cual la actividad de la calicreína hK2 es perjudicial tal como un cáncer, un trastorno autoinmune, un trastorno inflamatorio tal como la hipertrofia postática benigna, o un trastorno infeccioso.

30 El término "cáncer" se refiere a o describe la afección fisiológica en mamíferos que está típicamente caracterizada por el crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres, que pueden tratarse, incluyen pero sin limitarse a cáncer de próstata, cáncer de mama o un cáncer metastásico.

35 En métodos preferidos, el mamífero es un paciente humano, y la proteína recombinante inhibidora administrada se selecciona de los ejemplos de serpina recombinante de la Tabla III, que inhiben específicamente la proteasa hK2.

40 Abarcado por el alcance de la presente invención está además el uso de la composición farmacéutica descrita en la presente descripción para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno asociado a la proteólisis en un mamífero en caso de que el trastorno sea un trastorno en el cual la actividad de la calicreína hK2 sea perjudicial tal como un cáncer, un trastorno autoinmune, un trastorno inflamatorio tal como la hipertrofia prostática benigna, o un trastorno infeccioso.

Los ejemplos de cánceres incluyen pero sin limitarse a cáncer de próstata, cáncer de mama o un cáncer metastásico.

45 Las proteínas recombinantes inhibidoras de la invención generalmente se usarán en una cantidad para alcanzar el propósito pretendido. Para usar para tratar o prevenir un trastorno, las proteínas recombinantes inhibidoras o las composiciones farmacéuticas de estas, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad eficaz para mejorar o prevenir los síntomas, o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien aceptado dentro de las capacidades de las personas expertas en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada que se proporciona en la presente descripción.

50 Para la administración sistémica, una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración circulante que incluye la IC50 como se determina en el cultivo celular. Esta información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos.

Las dosis iniciales además se pueden estimar a partir de los datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que se conocen bien en la técnica. Alguien con experiencia ordinaria en la técnica podría optimizar fácilmente la

administración a humanos en base a los datos en animales y, por supuesto, dependerá del sujeto que se trata, del peso del sujeto, la gravedad del trastorno, la forma de administración y del criterio del médico que prescribe.

La presente invención abarca además un método para producir una proteína recombinante inhibidora de una proteasa, dicho método comprende las etapas de

- a) seleccionar una secuencia polinucleotídica que codifica un sitio de interacción enzima-sustrato específico para una proteasa,
- b) introducir dicha secuencia polinucleotídica en una secuencia que codifica una proteína inhibidora de una serina o cisteína proteasa, para obtener una secuencia recombinante,
- c) permitir la expresión de dicha secuencia recombinante en un sistema de expresión celular bajo condiciones adecuadas,
- d) y recuperar la proteína recombinante inhibidora de una proteasa.

La selección de una secuencia polinucleotídica que codifica un sitio activo de sustrato específico para una proteasa se puede hacer por las siguientes técnicas diferentes tales como, por ejemplo, la presentación de los sustratos para la selección de la proteasa tal como un retrovirus de leucemia murina que presenta un péptido directamente de células vivas así se evita el paso en bacterias (Buchholz y otros, 1998) o un método similar, usando genotecas de virus Sindbis quiméricos que además se empleó para la selección in vivo de los sitios de clivaje de la proteasa usando células de mamífero transfectadas con la enzima de interés (Pacini y otros, 2000 " In vivo selection of protease cleavage sites by using chimeric Sindbis virus libraries" J. Virol. 74, 22: 10563-70).

Además se contempla un sistema de levadura, GASP (ensayo genético para la proteólisis específica de sitio) que consiste en la fusión de sustratos aleatorios a una proteína integral de membrana, que permite la unión del sustrato a la membrana de la levadura, donde los factores de transcripción citoplasmáticos se pueden unir al promotor de un gen reportero (Kang y otros, 2001 "An improved strategy for a genetic assay for site-specific proteolysis" Mol. Cell. 30; 11(2): 263-6).

Recientemente han surgido una serie de genotecas químicas combinatorias para determinar la especificidad de sustrato de las proteasas. Estas incluyen genotecas combinatorias de sustrato fluorogénico y genotecas combinatorias sintéticas de exploración posicional.

Otro método, llamado genoteca de péptido inmovilizado, permite la determinación de la especificidad de sustrato relativa (k_{cat}/K_m) para cada miembro de la genoteca mediante la medición de la intensidad de fluorescencia en la fase de solución y para identificar el enlace escindible por secuenciación de Edman (Hu y otros, 2002 "Rapid determination of substrate specificity of clostridium histolyticum beta-collagenase using an immobilized peptide library" J. Biol. Chem. 8, 277 (10):8366-71).

En caso de que la especificidad de sustrato de una proteasa se determine por la tecnología de presentación en fago, una genoteca de péptidos aleatorios presentados en fago con diversidad exhaustiva se genera y se tamiza con la proteasa purificada. Este técnica conocida se adaptó al caso específico como se describe en la presente descripción con el fin de construir una genoteca aleatoria presentada en fago que incluyó todas las posibles combinaciones de aminoácidos de una longitud definida de aminoácidos. Así se construyen grandes genotecas mediante la presentación de secuencias aleatorias en la extremo de fagos filamentosos, después se amplifican y se tamiza con respecto a una proteasa para ensayar rápidamente su especificidad.

De acuerdo con los Ejemplos 1 y 2, los solicitantes construyeron una genoteca de pentámeros que contiene 1.8×10^8 transformantes independientes que podría entonces considerarse completa porque, en teoría, se representaron todas las secuencias de los 3.2×10^6 pentámeros aleatorios posibles. Las secuencias de los fagos confirmaron adicionalmente la aleatoriedad de los insertos de pentámeros. Después el fago que presenta los pentapéptidos aleatorios se fusionan a un ligando (6x His) y se inmovilizan en un soporte de afinidad, en este caso la matriz de Ni-NTA. Después de la incubación con la proteasa, (en el caso de los Ejemplos 1 y 2 la proteasa fue hK2) los fagos que expresan los sustratos sensibles se liberan de la fase sólida. Los fagos liberados se usan para infectar las bacterias F-positivas para valorarlos y amplificarlos. Estos fagos después se purifican por precipitación, se amplifican y después se inmovilizan a un soporte de afinidad para proceder a una siguiente ronda de selección. Esta selección de pentapéptidos se ha repetido 8 veces en total con el fin de obtener la secuencia polinucleotídica altamente específica. Los fagos de la última ronda se clonan mediante la siembra en platos de Petri y el ADN de los fagos individuales se amplifica en la región que codifica un sitio activo de sustrato para determinar las secuencias clivadas por la enzima.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican un sitio activo de sustrato después se introducen en una secuencia que codifica un inhibidor de una serina proteasa, por ejemplo en una secuencia que codifica rACT, a fin de obtener una secuencia recombinante. Dos sitios de restricción silentes *Sac II* y *Mlu I* previamente se incorporaron 18 bp corriente arriba y

18 bp corriente abajo del codón P 1 en el dominio RSL de rACT que permitieron la subclonación de la secuencia polinucleotídica seleccionada que codifica un sitio activo de sustrato.

5 Los inhibidores recombinantes, por ejemplo, se producen en cepas de E.coli TG1 en condiciones de cultivo adecuadas. Las condiciones de cultivo adecuadas pueden comprender entre 10-40°C durante 10-30 horas en dependencia de los inhibidores recombinantes a expresar. Sorprendentemente, los solicitantes han mostrado que en el caso de los Ejemplos 1 y 2, una temperatura de 16°C durante 16h permite la expresión y la producción de variantes completamente intactas de rACTs.

10 Finalmente, los inhibidores recombinantes se pueden recuperar ya sea a partir del medio de cultivo, cuando el inhibidor recombinante se secreta, o se extrae a partir del sistema de expresión de células cuando el inhibidor recombinante no se secreta, y se purifica por técnicas conocidas en la técnica tales como cromatografía en líquido de alto rendimiento, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, ultrafiltración, intercambio iónico y similares. Las condiciones reales usadas para purificar un inhibidor recombinante particular dependerán, en parte, de factores tales como la carga neta, hidrofobicidad, hidrofiliidad, etc., y resultarán evidentes a aquellos con experiencia en la técnica.

15 Para la purificación por cromatografía de afinidad, se puede usar cualquier anticuerpo que específicamente se una al inhibidor recombinante o a la cola de His. Otras moléculas de afinidad tales como Ni²⁺-nitrilotriacético conectadas a perlas de agarosa y que se unen específicamente a la cola de His además se contemplan en la presente invención.

20 Las proteínas recombinantes inhibidoras después se pueden ensayar adicionalmente para su capacidad para inhibir la actividad de la proteasa. Esto se puede hacer por cualquier método convencional tal como el método de Scatchard (Scatchard, 1949 Ann NY Acad Sci 51: 660-669). Este método describe un método clásico de medición y análisis de unión que se ha aplicado a la unión de proteínas y requiere proteína relativamente pura y la capacidad de distinguir la proteína unida de la no unida.

25 Un segundo método apropiado para medir la afinidad de las proteínas recombinantes inhibidoras para enzimas, es medir la capacidad de las proteínas recombinantes inhibidoras para retardar la acción de la enzima. Este método requiere, en dependencia de la velocidad a la que la enzima cliva los sustratos y la disponibilidad de sustratos cromogénicos o fluorogénicos, proteínas recombinantes inhibidoras relativamente puras.

30 Preferentemente, las proteínas recombinantes inhibidoras de la presente invención inhiben la actividad de la proteasa con una afinidad mayor que sus homólogos silvestres.

35 Las proteínas recombinantes inhibidoras descritas en la presente descripción se producen preferentemente, por vía recombinante, en un sistema de expresión celular. Este sistema puede ser una célula huésped eucariota o una procariota.

40 Una amplia variedad de células huésped unicelulares son útiles para expresar las proteínas recombinantes inhibidoras de esta invención. Estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucariotas y procariotas bien conocidos, tales como cepas de E. coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces, hongos tales como levaduras, y células animales, tales como CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1. Las células I, B-W y L-M, células de riñón de mono verde africano (por ejemplo, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, y BMT10), células de insecto (por ejemplo, Sf9), y células humanas y células vegetales en cultivo de tejido. Preferentemente, la célula huésped es una célula bacteriana seleccionada del grupo que comprende el género Bacillus, Escherichia, Salmonella, y Erwinia. Con mayor preferencia la célula huésped bacteriana es una célula E. coli.

45 La transformación o transfección de células huésped eucariotas o procariotas adecuadas con un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN aislada y purificada de acuerdo con la invención se realiza por métodos bien conocidos que típicamente dependen del tipo de vector usado. Con respecto a estos métodos, ver por ejemplo, Maniatis y otros 1982, Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory y los métodos comercialmente disponibles.

50 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un kit diagnóstico para la detección de una proteasa, *in vivo* o *in vitro*, en una muestra que comprende una secuencia de ADN aislada y purificada seleccionada del grupo que comprende la sec. con núm. de ident.: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, una secuencia complementaria de estas, fragmentos de estas, y/o variantes de estas.

55 Alternativamente, la presente invención contempla además un kit diagnóstico para la detección de una proteasa en una muestra que comprende una proteína recombinante inhibidora de una proteasa de acuerdo con la presente invención. Dicha proteína recombinante inhibidora de una proteasa puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que comprende MD820, MD 62, MD 61, MD67 y MD CI.

Como se usa en la presente descripción, el término "espécimen" se refiere a cualquier muestra adecuada que puede contener una proteasa, o una secuencia que codifica para una proteasa, a la que se puede unir la proteína recombinante inhibidora o la secuencia de ADN purificada y aislada que codifica para dicha proteína recombinante inhibidora.

5 El kit diagnóstico puede incluir un sistema que permite la detección de una proteasa en donde la detección de la señal dependerá de la cantidad de proteasa presente. La señal se puede detectar visualmente o instrumentalmente. Las posibles señales pueden incluir la producción de color, fluorescente, productos luminiscentes, alteración de las características de absorción o emisión de radiación por un componente o producto de ensayo, y precipitación o aglutinación de un producto
10 componente. Dicho componente puede ser una etiqueta, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo, una enzima, una coenzima, un sustrato de enzima, un compuesto denso de electrones, o una partícula aglutinable y se pueden acoplar ya sea a la proteína recombinante inhibidora o a la secuencia de ADN aislada y purificada presente en este kit diagnóstico.

15 Por último, la presente descripción proporciona además un método de tratamiento o prevención de un trastorno asociado con la proteólisis en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una composición farmacéutica que comprende una serpina silvestre recombinante como un agente activo.

20 El método de tratamiento o prevención de un trastorno asociado con la proteólisis antes mencionado puede ser útil en caso de que el trastorno es un trastorno en el que la actividad de la calicreína hK2 es perjudicial tal como un cáncer, un trastorno autoinmune, un trastorno inflamatorio tal como la hipertrofia prostática benigna, o un trastorno infeccioso.

La descripción anterior se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos, son, sin embargo, ilustrativos de los métodos de la práctica de la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

EJEMPLOS

25 Ejemplo 1:

Desarrollo de inhibidores ACT recombinantes específicos para la hK2 humana usando sustratos seleccionados de la presentación en fago.

Material

30 La hK2 y hK3 (PSA) se purificaron a partir de semen humano como se describió previamente (Frenette G, Gervais Y, Tremblay RR, Dube JY. 1998 "Contamination of purified prostate-specific antigen preparations by calicreína hK2" J Urol 159, 1375-8), los anticuerpos monoclonales anti-hK2 y anti-PSA fueron un regalo del profesor RR Tremblay, Laval University, Canadá. La quimotripsina humana (Chtr), activador del plasminógeno uroquinasa (uPA), calicreína humana hK1, calicreína de plasma humana (PK), elastasa de neutrófilos humana (HNE) y ACT comercial (α 1-antiquimotripsina de plasma humana) se adquirieron de Calbiochem. Z-Phe-Arg-AMC, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, Z-Gly-Gly-Arg-AMC, MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC se adquirieron de Calbiochem. El sustrato fluorescente CFP-TFRSA-YFP se desarrolló como se describió previamente
35 (Mahajan NP y otros, 1999 "Novel mutant green fluorescent protein protease substrates reveal the activation of specific caspases during apoptosis" Chem Biol 6, 401-9). El ADNc para la α 1-antiquimotripsina humana (ACT) fue un generoso regalo del Dr. Harvey Rubin (Universidad de Pensilvania).

Mutagénesis dirigida al sitio

40 Después de la subclonación del ADNc de ACT en el vector de expresión pQE-9 (Qiagen, Alemania, Figura 9) y la introducción de una cola de His₆ en el N-terminal de rACT_{silvestre}, dos sitios de restricción *Sac* II y *Mlu* I, se incorporaron 18 bp corriente arriba y 18 bp corriente abajo del codón P 1 en el dominio RSL respectivamente. Estos sitios se crearon por mutación silente usando los oligonucleótidos 5'-GTGATTTTGACCGCGGTGGCAGCAG-3' para el sitio *Sac* II y 5'-GCACAATGGTACGCGTC TCCACTAATG-3' para *Mlu* I y según el protocolo de mutagénesis QuickChange proporcionado
45 por Stratagene.

Construcción de la genoteca de presentación en fago del sustrato

Las genotecas de sustrato en fago se generaron usando un fagémido pH0508b modificado (Lowman y otros.,1991 "Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display" Biochemistry 12, 10832-8). La construcción consiste

de una cola de His₆ en cada extremo de una región rica en la repetición Gly-Gly-Gly-Ser- que precede al dominio carboxilo-terminal (codones 249-406) del gen III de M 13. Los pentámeros aleatorios se generaron por extensión por PCR de extensión de los oligonucleótidos molde con sitios de restricción adecuados colocados en ambos lados de los codones degenerados:

5 5'TGAGCTAGTCTAGATAGGTGGCGGTNNSNNSNNSNNSNNSGGGTTCGACGTCGGT
 CATAGCAGTCGCTGCA-3' (donde N es cualquier nucleótido y S es G o C) usando los cebadores biotinilados 5'
 correspondientes a las regiones flanqueantes:
 5'TGAGCTAGTCTAGATAGGTG-3' y 5'-TGCAGCGACTGCTATGA-3'. Los moldes de la PCR se digirieron y purificaron
 como se describió previamente (Smith G.P, Scott J.K. 1993 "Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous
 phage" Methods Enzymol. 217, 228-57), se insertaron en el vector pH0508b digerido XbaI/Sall, y se electroporó en XL1-Blue
 10 (F⁻). La extensión de la genoteca se estimó a partir de la eficiencia de transformación determinada por la siembra de una
 pequeña porción de las células transformadas sobre platos de Luria-Bertani que contenían ampicilina y tetraciclina (100 y 15
 µg·ml⁻¹, respectivamente). El resto de las células transformadas se usaron para preparar una genoteca de fago por la
 incubación durante toda la noche mediante la adición de un fago auxiliar M13K07 a una concentración que da una
 15 multiplicidad de infección de 100 unidades formadoras de placa (p.f.u.) por ml. Los fagos se recogieron a partir del
 sobrenadante y se purificaron por precipitación con poli-(etilenglicol). De éstos, 200 clones se seleccionaron arbitrariamente
 para secuenciación para verificar la aleatorización de la genoteca.

Tamizaje de la genoteca de pentapéptidos presentada en fago

20 Esta nueva genoteca de pentapéptidos se sometió a ocho rondas de tamizaje con hK2. Cien microlitros de Ni²⁺-ácido
 nitrilotriacético acoplado a perlas de sefarosa (resina Ni²⁺-ácido nitrilotriacético) se lavó con 10 ml NaCl/P_i que contenía 1
 mg·ml⁻¹ BSA. Las partículas de fago (10¹¹) se añadieron a la resina Ni²⁺-ácido nitrilotriacético equilibrada y se dejó que se
 uniera con agitación suave durante 3 h a 4 °C. La resina se lavó posteriormente (NaCl/P_i/BSA 1 mg·ml⁻¹, 5 mM imidazol,
 0.1% Tween 20) para eliminar los fagos no unidos y después se equilibró en NaCl/P_i. El fago sustrato se expuso a 27 nM
 25 (concentración final) de hK2 durante 45 min a 37 °C. Además se realizó una selección de control sin proteasa. Los fagos
 clivados liberados en sobrenadante se amplificaron usando la *Escherichia coli* XL1-Blue y después se usaron para rondas
 posteriores de selección. Después de ocho rondas de cribado, se seleccionaron aproximadamente 15 clones individuales de
 la quinta sexta y octava ronda de selección y los ADN de plásmido se aislaron y secuenciaron en la región que codifica para
 el sustrato.

Construcción y expresión de ACT silvestre recombinante y sus variantes.

30 Seis variantes, que corresponden a un cambio en el lazo del sitio reactivo en posiciones entre P3 y P3' (Ver la Tabla IV más
 abajo), se generaron por PCR de extensión de los oligonucleótidos de molde:

rACT_{8,20}, 5'-TACCGCGGTCAAATCACCCCTCCGTTCTCGAGCAGTGGAGACGCGTGA-3';
 rACT_{6,3}, 5'-TACCGCGGTCAAATCACCCAGGAGGTCTATCGATGTGGAGACGCGTGA-3';
 rACT_{8,3}, 5'-TACCGCGGTCAAATCAGGGGGAGATCTGAGTTAGTGAGACGCGTGA-3';
 35 rACT_{6,7}, 5'-TACCGCGGTCAAATCAAGCTTAGAACAACATTAGTGGAGACCGCTGA-3';
 rACT_{6,1}, 5'-TACCGCGGTCAAATCATGACAAGATCTAACTTAGTGGAGACGCGTGA-3';
 rACT_{5,18}, 5'-TACCGCGGTCAAATCACCCGAGCGTGTCTCGCCCGTGAGACGCGTGA-3'

40 (donde las secuencias subrayadas codifican nuevos sitios de clivaje en el lazo de sitio reactivo), usando cebadores
 correspondientes a las regiones flanqueantes: 5'-TACCGCGGTCAAATC-3' y 5'-TCACGCGTGTCCAC-3'. Los productos de
 la PCR se digirieron con las enzimas de restricción *Sac II* y *Mlu I* y después se subclonaron en la construcción de rACT_{silvestre}
 digerida. Las serpinas recombinantes se produjeron en la cepa de *E. coli* TG1. Las células se cultivaron a 37°C en medio 2 x
 TY (16g triptona, 10g extracto de levadura, 5g NaCl por l) que contenía 100µg/ml de ampicilina a A₆₀₀=0.5. Después se
 45 añadió isopropiltio-β-galactósido (IPTG) a una concentración final de 0.5mM y se permitió la expresión de las serpinas
 recombinantes durante 16h a 16°C. Las células de cultivo se cosecharon por centrifugación, se resuspendieron en
 PBS frío y después se pasaron a través de una prensa francesa para recuperar el total de proteínas citoplásmicas solubles.
 Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y se añadieron al sobrenadante perlas de agarosa de afinidad de Ni²⁺-
 ácido nitrilotriacético durante 90 min a 4°C para unir las serpinas recombinantes. La resina se lavó posteriormente con
 50 50mM Tris pH 8.0, 500mM NaCl, 25mM imidazol y las proteínas unidas se eluyeron durante 10min con 50mM Tris pH 8.0,
 500mM NaCl y 150mM imidazol. Una vez que la purificación se completó, rACT se dializó contra 50mM Tris pH 8.0, 500mM
 NaCl, 0,05 % Tritón X-100 durante 16h a 4°C. La concentración de proteína se determinó para cada purificación por el
 ensayo de Bradford y se normalizó por densitometría de geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie (Laemmli UK.
 1970 "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" Nature 227, 680-5).

55

Tabla IV

Alineación del RSL (lazo serpiente reactivo) de la serpiente recombinante α 1-antiquimotripsina (ACT) y sus variantes.														
Serpina	Péptido sustrato seleccionado ^a	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5	P'6	
rACT _{silvestre}		V	K	I	T	L	L*	S	A	L	V	E	T	
rACT _{8.20}	LR↓SRA	V	K	I	T	<u>L</u>	<u>R*</u>	S	<u>R</u>	<u>A</u>	V	E	T	
rACT _{6.2}	RR↓SID	V	K	I	T	<u>R</u>	<u>R*</u>	S	<u>I</u>	<u>D</u>	V	E	T	
rACT _{8.3}	RGR↓SE	V	K	I	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>R*</u>	S	E	L	V	E	T	
rACT _{6.7}	KLR↓TT	V	K	I	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>R*</u>	T	T	L	V	E	T	
rACT _{6.1}	MTR↓SN	V	K	I	<u>M</u>	T	<u>R*</u>	S	<u>N</u>	<u>A</u>	V	E	T	
ACT _{5.18}	ER↓VSP	V	K	I	T	<u>E</u>	<u>R*</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	V	E	T	

^a Péptidos sustrato seleccionados mediante la calicreína hK2 usando una genoteca de pentapéptidos aleatorios presentados en fago. Los residuos en letra sencilla son comunes a rACT_{silvestre}, los residuos en negrita y subrayados corresponden a los péptidos sustrato reubicados en el RSL de las variantes de ACT. El enlace escindible por hK2 en los péptidos sustrato se designa por ↓ y el sitio de clivaje putativo en las serpinas se marca por asteriscos entre los residuos P1-P1'.

Ensayos de inhibición y estequiometría de la inhibición (SI)

Los valores de la estequiometría de la inhibición (SI) se determinaron para la inhibición de rACT_{silvestre} y sus variantes con hK2 y otras enzimas diferentes. Una prueba inicial se realizó con un exceso molar de rACT (100 veces) sobre las enzimas hK2, PSA, hK1, quimotripsina (Chtr), calicreína de plasma (PK), uroquinasa (uPA) y elastasa de neutrófilos humana (HNE). La reacción se llevó a cabo durante 30min a 25°C (90 min a 37°C para PSA) en tampón de reacción (50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0,05% tritón X-100, 0,01% BSA) y la actividad enzimática residual se midió mediante la adición de sustratos fluorescentes (Z-Phe-Arg-AMC para hK1, hK2 y PK, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC para Chtr, Z-Gly-Gly-Arg-AMC para uPA, MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC para HNE, y CFP-TFRSA-YFP para PSA). La actividad de la enzima en presencia de inhibidores se comparó a la reacción no inhibida. Para las reacciones en las que se observó una inhibición, la SI se determinó mediante la incubación de diferentes concentraciones de serpinas recombinantes. Usando el análisis de regresión lineal de la actividad fraccional (velocidad de reacción de la enzima inhibida / velocidad de reacción de la enzima no inhibida) vs. la relación molar del inhibidor a la enzima ($[I_0]/[E_0]$), se obtuvo la estequiometría de la inhibición, correspondiente al intercepto de la abscisa.

15 Cinética

Las constantes de velocidad de asociación para las interacciones de hK2, quimotripsina, PK y HNE con diferentes rACTs se determinaron bajo condiciones de pseudoprimer orden usando el método de la curva de progreso (Morrison JF, Walsh CT. 1988 " The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors" Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol 61, 201-301). En estas condiciones, una cantidad fija de enzima (2 nM) se mezcló con diferentes concentraciones del inhibidor (0-800 nM) y un exceso de sustrato (10µM). Cada reacción se realizó en amortiguador de reacción (50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0,05% tritón X-100, 0,01% BSA) a 25°C durante 45min y se midió la velocidad de formación de producto usando un lector de fluorescencia de microplacas de 96 pocillos FLx800 (Biotek, Estados Unidos). En este modelo, la inhibición se considera que es irreversible en el transcurso de la reacción y el progreso de la actividad de la enzima se expresa por la formación de producto (P), a partir de una velocidad (v_2) y se inhibe con el tiempo (t) a una velocidad de primer orden (k_{obs}), constante de velocidad que sólo depende de la concentración del inhibidor.

$$P = (v_2/k_{obs}) \times [1 - e^{(-k_{obs}t)}] \quad \text{eq 1}$$

Para cada inhibidor, una k_{obs} se calculó, para cuatro concentraciones diferentes de los inhibidores, por regresión no lineal de los datos usando la Ecuación 1. Mediante la representación gráfica de la k_{obs} vs. la concentración del inhibidor $[I]$, se determinó una constante de velocidad de segundo orden, k' , igual a la pendiente de la curva ($k' = \Delta k_{obs} / \Delta [I]$). Debido a la competencia entre el inhibidor y el sustrato, la Ecuación 2 más abajo se usa para corregir la constante k' de velocidad de segundo orden que tiene en cuenta la concentración de sustrato $[S]$ y la K_m de la enzima por su sustrato, que da la k_a .

$$k_a = (1 + [S] / K_m) \times k' \quad \text{eq 2}$$

Las K_m de hK2 para Z-FR-AMC, quimotripsina para Suc-AAPF-AMC, PK para Z-FR-AMC y HNE para MeOSuc-AAPV-AMC fueron 67 μ M, 145 μ M, 170 μ M y 130 μ M respectivamente.

Análisis de transferencia tipo western de formación del complejo y degradación del inhibidor.

La calicreína hK2 se incubó 3 horas a 37°C con diferentes ACTs recombinantes a una $[I]_o:[E]_o$ relación de 100:1 en 50mM Tris, 200mM NaCl, 0,05% tritón X-100. Las muestras de proteína se calentaron a 95°C durante 5min, se separaron por SDS-PAGE (12% acrilamida, relación T:C 19:1) y después se electrotransfirieron sobre nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Pharmacia). La hK2 libre y los complejos hK2-ACT se detectaron usando un anticuerpo monoclonal anti-hK2 de ratón y un anticuerpo secundario de cabra-anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina. La transferencia de tipo western se visualizó usando el kit de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech). La hK2 además se incubó con ACT_{8.3} o ACT_{6.7} 30min a 25°C (condiciones cinéticas) a una $[I]_o:[E]_o$ relación de 10:1 en 50mM Tris, 200mM NaCl, 0,05% tritón X-100. Las proteínas se detectaron por transferencia de tipo western, usando anticuerpo monoclonal anti-His₆ seguido por la detección con el anticuerpo secundario y el protocolo descrito anteriormente.

Producción de ACTs silvestre recombinante soluble y variantes

La serpina α 1-antiquimotripsina silvestre se usó para desarrollar inhibidores específicos de la calicreína hK2. Los residuos P3-P3' ubicados en la estructura de RSL de rACT_{silvestre} se reemplazaron por pentapéptidos sustrato, previamente seleccionados por la tecnología de presentación en fagos como se describió anteriormente. Las seis variantes de rACT mostradas en la Tabla I, se diseñaron y construyeron. El enlace escindible en los péptidos sustrato se alineó de acuerdo con Leu-358-Ser-359 en el RSL de la serpina. El rACT_{silvestre} y sus variantes se expresaron en *E.coli* TG1 como proteínas de fusión que contenían una cola de His en la posición N-terminal. Cada uno de ellos se produjo a baja temperatura lo que permitió la acumulación de la proteína principalmente en forma soluble activa. Purificada bajo condiciones naturales, el nivel de producción varió entre 1.0 a 2.5 mg/l. La pureza de las serpinas purificadas, tales como por ejemplo la variante 6.1 (carril 1) y la ACT silvestre (carril 2), como se estimó por análisis de SDS-PAGE es más que 98% (Figura 1).

Las variantes de rACT son principalmente específicas para la calicreína hK2

Un panel de enzimas que incluye la elastasa de neutrófilos humana, las proteinasas (Chtr, PSA or hK3) de tipo quimotripsina y (hK2, hK1, PK, uPA) de tipo tripsina, se tamizaron para determinar la especificidad inhibidora de las variantes de rACT (Tabla V).

Tabla V

Perfil inhibitorio de rACT _{silvestre} y sus variantes.						
ACT _{8.20} (LR↓SRA) ^a	ACT _{6.2} (RR↓SID) ^a	ACT _{8.3} (RGR↓SE) ^a	ACT _{6.7} (KLR↓TT) ^a	ACT _{6.1} (MTR↓SN) ^a	ACT _{5.18} (ER↓VSP) ^a	ACT _{WT} (LL↓SA) ^a
MD820	M D 62	MD 83	MD 67	MD 61	MD518	
Proteasa		Inhibición % ^b				
hK2	95	100	100	100	100	73
						0

Perfil inhibitorio de rACT _{silvestre} y sus variantes.							
ACT _{8.20} (LR↓SRA) ^a	ACT _{6.2} (RR↓SID) ^a	ACT _{8.3} (RGR↓SE) ^a	ACT _{6.7} (KLR↓TT) ^a	ACT _{6.1} (MTR↓SN) ^a	ACT _{5.18} (ER↓VSP) ^a		ACT _{WT} (LL↓SA) ^a
MD820	M D 62	MD 83	MD 67	MD 61	MD518		
Chtr	66	0	0	0	0	0	100
Pk	54	100	0	36	100	0	0
HNE	30	0	0	0	60	0	15
PSA (hK3)	45	0	0	0	0	0	80
hK1	0	0	0	0	0	0	0
Uroquinasa	0	0	0	0	0	0	0

^a La secuencia de aminoácidos clivada en el RSL (lazo de serpiente reactiva) de ACTs recombinante que corresponde al péptido sustrato seleccionado por hK2.

^b La proteasa y las serpinas se incubaron durante 30 min a 25°C (90 min a 37° para PSA) a una $[I]_0/[E]_0$ relación de 100:1. El porcentaje de inhibición se corresponde con $100 \times (1 - (\text{velocidad en presencia de inhibidor} / \text{velocidad de control no inhibido}))$.

5 Al incubar con un exceso de inhibidores ($[I]_0/[E]_0$ de 100: 1) durante 30 minutos, la hK2 se inhibió completamente por rACT_{6.2}, rACT_{8.3}, rACT_{6.7} y rACT_{6.1}, mientras que rACT_{8.20} y rACT_{5.18} inhibieron 95 % y 73 % de la actividad de la enzima, respectivamente. Bajo esta condición, rACT silvestre no mostró actividad de inhibición hacia la hK2. Entre estas variantes, dos (rACT_{8.3} y rACT_{5.18}) son específicas para hK2, sin inhibir ninguna otra enzima probada. Dos otras variantes, rACT_{6.7} y rACT_{6.2}, inhibieron también PK a 36 % y 100% respectivamente. Como ACT silvestre, la variante de rACT_{8.20} inhibió las dos proteasas de tipo quimotripsina Chtr y PSA pero además PK y HNE. Ninguna de las serpinas recombinantes mostró actividad inhibitoria contra la calicreína hK1 y uPA.

Las estequiometrías de inhibición de ACTs variantes para hK2 se mejoran drásticamente en comparación con ACT silvestre

La determinación de la estequiometría del inhibidor se llevó a cabo en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica para todas las enzimas para asegurar la comparación más valiosa. La ACT silvestre recombinante dio un valor de SI de 2 (Tabla VI) con la quimotripsina que fue idéntico al valor obtenido con ACT comercial en condiciones similares (datos no mostrados).

Tabla VI

Comparación de los valores de estequiometría de la inhibición y las constantes de velocidad de segundo orden (k_a) para la reacción de rACT _{silvestre} y sus variantes con hK2 y otras proteinasas.														
	ACT _{8.20} (LR↓SRA) ^c MD820		ACT _{6.2} (RR↓SID) MD62		ACT _{8.3} (RGR↓SE) MD83		ACT _{6.7} (KLR↓TT) MD67		ACT _{6.1} (MTR↓SN) MD61		ACT _{5.18} (ER↓VSP) MD518		ACT _{WT} (LL↓SA) ^c	
	SI	$(k_a)^b M_{1s^{-1}}$	SI	$k_a^b M_{1s^{-1}}$	SI	$k_a^b M_{1s^{-1}}$	SI	$k_a^b M_{1s^{-1}}$	SI	$k_a^b M_{1s^{-1}}$	SI	$k_a^b M_{1s^{-1}}$	SI	$k_a^b M_{1s^{-1}}$
Proteasa														
hK2	105	1779	25	6261	34	2439	9	8991	19	3442	139	595	-	-
Chtr	134	905	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	61295
Pk	150	424	18	6217	-	-	277	201	16	8024	-	-	-	-
HNE	334	158	-	-	-	-	-	-	159	1192	-	-	-	-

^a Los valores de SI informados se determinaron usando el análisis de regresión lineal para extrapolar la relación I/E (Ver la Figura 1).

Comparación de los valores de estequiometría de la inhibición y las constantes de velocidad de segundo orden (k_a) para la reacción de rACT _{silvestre} y sus variantes con hK2 y otras proteinasas.														
	ACT _{8.20} (LR↓SRA) ^c MD820		ACT _{6.2} (RR↓SID) MD62		ACT _{8.3} (RGR↓SE) MD83		ACT _{6.7} (KLR↓TT) MD67		ACT _{6.1} (MTR↓SN) MD61		ACT _{5.18} (ER↓VSP) MD518		ACT _{WT} (LL↓SA) ^c	
	SI	$(k_a)^b M$ s^{-1}	SI	$k_a^b M$ s^{-1}	SI	$k_a^b M$ s^{-1}	SI	$k_a^b M$ s^{-1}	SI	$k_a^b M$ s^{-1}	SI	$k_a^b M$ s^{-1}	SI	$k_a^b M$ s^{-1}
Proteasa														
^b Las constantes de velocidad de segundo orden para las reacciones serpinas-proteinasas se midieron bajo condiciones de pseudo-primero o segundo orden como se describe en "Procedimiento experimental". ^c La secuencia de aminoácido de los residuos P3-P3' en el RSL (lazo de serpina reactivo) de la ACT recombinante corresponden al péptido sustrato seleccionado por la hK2 -, No hay actividad inhibidora detectable.														

- 5 Con el fin de determinar los valores de SI de todas las variantes recombinantes, los solicitantes incubaron la hK2 (5nM) con diferentes concentraciones (6.25-500nM) de rACT_{8.20} (x), rACT_{6.2} (□), rACT_{8.3} (Δ), rACT_{6.7} (0), rACT_{6.1} (✖), rACT_{5.18} (○), rACT_{silvestre} (+), a 25°C por 30 min en amortiguador de reacción. Las actividades residuales (velocidad) para hK2, se ensayaron por adición del sustrato fluorescente (10μM) Z-FR-AMC. La velocidad fraccional corresponde a la relación de la velocidad de la enzima inhibida (v_i) a la velocidad del control no inhibido (v_o). La SI se determinó usando el análisis de regresión lineal para extrapolar la relación I/E (es decir, el intercepto x).
- 10 Como se muestra en la Figura 2 todas las variantes de ACT de nueva construcción mostraron valores de SI con hK2 menor que ACT silvestre. De estas variantes, rACT_{6.7}, rACT_{6.1} y rACT_{6.2} tuvieron los valores más bajos de estequiometría de la inhibición para hK2 (9, 19 y 25 respectivamente). Mientras rACT_{6.2} y rACT_{6.1} además tuvieron los valores más bajos de SI (18 y 16) para PK, la SI para rACT_{6.7} fue mucho mayor (277). Las dos ACTs recombinantes específicas para hK2, rACT_{8.3} y rACT_{5.18} tuvieron una mayor relación SI de 34 y 139, respectivamente. El valor de SI del inhibidor rACT_{8.20} fue superior a 100 para todas las proteasas probadas que incluye hK2.
- 15

La ACTs variante forma complejos estables con hK2 sin degradación de los inhibidores

- 20 La hK2 se incubó 3h a 37°C con rACT_{8.20}, rACT_{6.2}, rACT_{8.3}, rACT_{6.7}, rACT_{6.1}, rACT_{5.18} y rACT silvestre, en una relación I:E de 100:1. El análisis de transferencia tipo western de los productos de la reacción de rACTs con hK2 (rACT_{8.20} (carril 1), rACT_{6.2} (carril 2), rACT_{8.3} (carril 3), rACT_{6.7} (carril 4), rACT_{6.1} (carril 5), rACT_{5.18} (carril 6) y rACT silvestre (carril 7)), se realizó bajo condiciones reductoras usando un anticuerpo anti-hK2 de ratón para determinar el destino de los inhibidores después de la interacción con la enzima. La Figura 3A muestra que cuando la hK2 se incubó con las variantes de ACT, la hK2 (E) libre desapareció por completo para formar un complejo covalente (EI). Este complejo covalente demostró una alta estabilidad ya que no se descompuso en un período de incubación de 16 horas (datos no mostrados). La ACT silvestre inhibió más lentamente la hK2, que estaba principalmente no unida después de 3 horas de incubación. Los valores de SI elevados, medidos con hK2 no se debían a la degradación no formadora de complejos de las variantes de ACT inhibitoras.
- 25

- 30 Además en ACT_{8.3} (carril 1) o ACT_{6.7} (carril 3) se incubaron con hK2 (carril 2 y 4 respectivamente en la transferencia de tipo western) bajo condiciones cinéticas (30min a 25°C) a una relación I:E de 10:1. La formación del complejo se analizó por transferencia de tipo western en condiciones reductoras usando un monoclonal anti-cola de his de ratón (Figura 3B). Todos los proteínas inhibitoras o bien formaron complejos con hK2 o estaban presente como la forma no clivada, lo que indicaba que la posible ruta del sustrato para la interacción serpina-enzima es marginal.

Las ACTs variantes mostraron las más altas constantes de asociación con hK2

- 35 La velocidad de la reacción inhibitora con la ACTs variante se determinó para cada proteasa que mostraba reactividad con estos inhibidores. Para ese fin, la interacción de hK2 y las serpinas recombinantes se midió en condiciones de pseudo-primero orden usando el método de la curva de progreso. La hK2 (2nM) y el sustrato Z-FR-AMC (10μM) se añadieron a cantidades variables (20n-800nM) de los inhibidores rACT_{8.20}(◇), rACT_{5.18} (+) (Figura 4A) y los inhibidores rACT_{6.2}(○), rACT_{8.3} (□) rACT_{6.7} (Δ), rACT_{6.1} (x) (Figura 4B). Las curvas de progreso representativas se sometieron a análisis de regresión no lineal usando eq 1 y la velocidad (k_{obs}) se representó gráficamente contra las concentraciones de serpina. Después de la determinación de la k_{obs} , las constantes de asociación (k_a) se calcularon usando la K_m de las proteasas por sus correspondientes sustratos

(Tabla VI). El valor de k_a de la ACT silvestre con quimotripsina fue idéntico a los datos publicados (Cooley y otros, 2001 "The serpin MNEI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites" Biochemistry 40, 15762-70). El rACT recombinante_{6,7} mostró una mayor k_a ($8991 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) con hK2 mientras que la obtenida con PK fue 45 veces inferior. En contraste, rACT recombinante_{6,2} dio equivalente k_a con hK2 y PK lo que demostró una falta de discriminación entre las dos proteasas. Los valores de k_a de los inhibidores recombinantes específicos de hK2, rACT_{8,3} y rACT_{5,18} fueron inferiores, 2439 y $595 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente, mientras que ACT no específica_{8,20} exhibió una k_a de $1779 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, para hK2, superior en comparación con Chtr, PK y HNE. Una de las serpinas recombinantes, rACT_{6,1}, reaccionó a una velocidad más alta con PK que con hK2.

Ejemplo 2

10 Desarrollo de inhibidores ACT recombinantes específicos para las proteasas hK2 y hK3 humanas.

Los residuos P3-P3' ubicados en la estructura RSL de rACT_{silvestre} se reemplazaron por el pentapéptido sustrato de codificación para el RSL del inhibidor de la proteína C (PCI) (Tabla VII) como se describe en el Ejemplo 1.

Tabla VII

Alineación de RSL (lazo de serpina reactivo) de las serpinas recombinantes ACT, PCI y ACT _{PCI} .													
Serpina	Secuencia de aminoácido	Secuencias RSL											
		P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5	P'6
rACT _{Silvestre}	Secuencia de aminoácido	V	K	I	T	L	L	S	A	L	V	E	T
	Secuencia de ADN (codón)	GTC	AAA	ATC	ACC	CTC	CTT	TCT	GCA	TTA	GTG	GAG	GTC
rPCI _{Silvestre}	Secuencia de aminoácidos	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L	N	S
rACT _{PCI} (MD CI)	Secuencia de aminoácidos	V	K	I	T	E	R	S	A	L	V	E	T
	ADN (codón)	GTC	AAA	ATC	ACC	TTT	AGA	TCT	GCA	TTA	GTG	GAG	GTC

Los residuos en letra sencilla son comunes a rACT_{silvestre}, residuos en negrita y subrayados corresponden a péptidos sustrato reubicados en RSL de las variantes ACT. El enlace escindible en los péptidos sustrato se designa por ↓ y el sitio de clivaje putativo en las serpinas se marca por asteriscos entre los residuos P1-P1'.

En resumen, para producir la proteína recombinante ACT_{PCI} (MDCI), las células TG1 se transformaron con las correspondientes construcciones seguido por el crecimiento en medios de cultivo adecuados. Las células después se indujeron a una densidad óptima para expresar inhibidores recombinantes durante 16h a 16°C. El inhibidor recombinante ACT_{PCI} se extrajo del citoplasma de bacterias y se separó por cromatografía de afinidad usando la columna de Ni-NTA como se describió para el ejemplo anterior.

Análisis de la expresión de ACT recombinante por SDS-PAGE.

La pureza de los diferentes inhibidores desarrollados en el Ejemplo 1 y 2 se probó por análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras como se muestra en la Figura 5.

25 Evaluación de los inhibidores.

Estos inhibidores se analizaron adicionalmente para evaluar su especificidad y afinidad para inhibir las calicreínas hK2 y hK3 humanas (Figuras 6) y la calicreína de plasma, tripsina, uroquinasa, elastasa, trombina, hK14 y calicreína 8 humana (Tabla VIII). Estas dos enzimas poseen diferentes especificidades enzimáticas (hK2: tipo tripsina, hK3: tipo quimotripsina) pero ACT las inhibe de forma natural. Mientras que ACT se considera que es el inhibidor natural de la hK3 en circulación en sangre, su inhibición de la hK2 es más débil.

Análisis de la reacción inhibitoria entre rACTs y las calicreínas humanas se realizaron por transferencia de tipo western como se muestra en las Figuras 6. Para cada una de las variantes de ACT, se incubó 1 µg de inhibidor con 100 ng de hK2 o de hK3 durante 1 hora a 37°C bajo condiciones fisiológicas.

5 Los resultados de la detección usando el anticuerpo monoclonal 9D5 anti hK2 se muestran en la Figura 6 A.

Línea 1: sólo hK2, 2 : ACT comercial + hK2, 3 : ACT silvestre + hK2, 4 : MD820 + hK2, 5 : MDCl + hK2, 6 : MD62 + hK2, 7 : MD61 + hK2,

10 La Figura 6 B muestra la detección del complejo hK3-ACT usando el anticuerpo anti-His (cola presente en las proteínas ACT recombinantes).

Línea 1: PSA, 2: PSA + ACT, 3: ACT silvestre + PSA, 4 : MD820 + PSA, 5 : MDCl + PSA, 6 : MD62 + PSA, 7 : MD61 + PSA.

15 Los cambios de aminoácidos dentro del lazo reactivo usando secuencias de sustrato seleccionadas para la especificidad de hK2 transformó ACT en un inhibidor altamente específico para hK2 (MD820, MD61, MD62) sin inhibir hK3. Estos resultados confirman los anteriormente mostrados en la Tabla IV. Sólo MDCl, basado en el lazo reactivo del inhibidor de la Proteína C (PCI) es capaz de inhibir

Proteasa	Inhibición % ^b	SI	k_a $M^{-1}s^{-1}$
Quimotripsina	98	1	86216
Calicreína piasmática	100	4.6	25900
Tripsina	100	1	1126025
Uroquinasa	0	-	-
Elastasa	0	-	-
Trombina	0	-	-
hK14	100	3.2	287000
Calicreína 8 Humana	~25	~180	
ambas calicreínas probadas (hK2 y hK3).			

20

MD61 y MD62 son inhibidores con afinidad muy alta por hK2 que inhiben toda la proteína hK2 en menos de 3 minutos (en las mismas condiciones) en comparación con la α 1-antiquimotripsina silvestre o comercial, que requiere más de 12 horas de incubación para inhibir la misma cantidad de hK2 (datos no mostrados). **Tabla VIII Perfil inhibidor de MDCl.**

25

Ejemplo 3 :

Inhibición del crecimiento del tumor por inhibidores MD

3.1 Inhibición del crecimiento del tumor por inhibidores MD62 y MD 67

30

La línea celular DU-145 de adenocarcinoma de próstata humano independiente de andrógenos se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo. La tecnología retroviral se usó para obtener las células DU145 transfectadas con el gen hK2 (DU145/hK2).

35

Las células DU145/hK2 en crecimiento exponencial se recogieron y se resuspendieron a una concentración de 7.5×10^7 células/ml en DMEM (Invitrogen) que contenía 1 o 10 µg de inhibidores. Esta suspensión de células se mezcló con matrigel (BD Biosciences) a una relación 1:2 y se inyectó por vía subcutánea (3×10^6 células/40 µl) en los flancos derecho e izquierdo de ratones desnudos suizos, atímicos, machos de 8 semanas de edad (dos ratones/grupo). Cada ratón se inoculó en dos sitios.

En los días 6, 12 y 18 después de la inoculación del tumor, 50 o 10 µg de MD62, MD67 o 100 µg o 10 µg de ACT-silvestre se

inyectaron por vía subcutánea. En los días 24, 30, 33, 36, 39 y 41 después de la inoculación del tumor, 25 o 5µg de inhibidores (MD62 and MD67) o 50 µg o 5 µg de ACT-silvestre se inyectaron por vía subcutánea.

5 **Figura 10A** muestra la inhibición del crecimiento del tumor por MD 62. Las células de cáncer de próstata DU-145 (3×10^6 células), transfectadas con caliceína 2 humana, se implantaron en ratones desnudos y después se trataron con MD 62 (5 o 25µg/inyección).

10 **Figura 10B** muestra la inhibición del crecimiento del tumor por MD 67. Las células de cáncer de próstata DU-145 (3×10^6 células), transfectadas con caliceína 2 humana, se implantaron en ratones desnudos y después se trataron con MD 67 (5 o 25µg/inyección).

3.2 Inhibición del crecimiento del tumor por el inhibidor MDCl.

15 La línea celular DU-145 de adenocarcinoma de próstata humano independiente de andrógenos se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo. La tecnología retroviral se usó para obtener las células DU145 transfectadas con el gen hK2 (DU145/hK2).

20 Las células DU145/hK2 en crecimiento exponencial se recogieron y se resuspendieron a una concentración de 7.5×10^7 células/ml en DMEM (Invitrogen) que contenía 1 o 10µg de inhibidores. Esta suspensión de células se mezcló con matrigel (BD Biosciences) a una relación 1:2 y se inyectó por vía subcutánea (3×10^6 células/40µl) en los flancos derecho e izquierdo de ratones desnudos suizos, atímicos, machos de 8 semanas de edad (dos ratones/grupo). Cada ratón se inoculó en dos sitios.

25 En los días 6, 12 y 18 después de la inoculación del tumor, 100µg o 10µg de MDCl o ACT-silvestre se inyectaron por vía subcutánea. En los días 24, 30, 33, 36, 39 y 41 después de la inoculación del tumor, 50 µg o 5 µg de MDCl o ACT-silvestre se inyectaron por vía subcutánea.

30 **La Figura 11** muestra la inhibición del crecimiento del tumor por MD Cl. Las células de cáncer de próstata DU-145 (3×10^6 células), transfectadas con caliceína 2 humana, se implantaron en ratones desnudos y después se trataron con MD Cl (5 o 50ug/inyección).

REIVINDICACIONES

1. Una proteína recombinante inhibidora de una calicreína, que comprende una secuencia de serpina en donde el lazo P6-P6' de serpina reactivo de dicha secuencia de serpina comprende al menos un sitio activo de sustrato que consiste en una secuencia pentapéptido seleccionada entre SSRTE, KTRSN, ISPRS, GVFRS, GTVRS, ETKRS, LGRSL, RGRSE, RRSID, VLRSP, PFRSS, RSGSV, ARARS, SDRTA, KLRTT, RAAMM, TRAPM, DVRAA, PGRAP, VESRA, ARASE, TLQRV, RLERV, ERVSP, SSPRV, RVGPY, PSARM, RGRMA, TVRMP, LRMP, HRMSS, RPQEL, VRPLE, SGRLA, GTLRF, QWRNS, RNDKL, MRNRA, TRDSR, TGSRD, IMSRQ, LTTSK, PFRKI específica para dicha calicreína una quimera molecular de la misma, y/o una combinación de estas.
2. La proteína recombinante inhibidora de una calicreína de la reivindicación 1, **caracterizada porque** la calicreína es una proteína calicreína hK2.
3. La proteína recombinante inhibidora de una calicreína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizada porque** la secuencia de serpina se selecciona del grupo que comprende la α -1antitripsina (ACT), inhibidor de la proteína C (PCI), α -1antiproteínasa (AAT), precursor de la proteína relacionada con la α -1antitripsina humana (ATR), inhibidor de la α -2-plasmina (AAP), precursor de la antitrombina-III humana (ATIII), inhibidor de proteasa 10 (PI 10), precursor de la proteína 2 de unión a colágeno humano (CBP2), inhibidor de proteasa 7 (PI7), leuserpina inhibidor de proteasa 2 (HLS2), inhibidor de la proteasa C1 de plasma humano (C1 INH), inhibidor de la elastasa monocito/neutrófilo (M/NEI), inhibidor del activador del plasminógeno tipo 3 (PAI3), inhibidor de proteasa 4 (PI4), inhibidor de proteasa 5 (PI5), inhibidor de proteasa 12 (PI12), inhibidor del activador del plasminógeno humano tipo 1 precursor endotelial, inhibidor del activador de plasminógeno humano tipo 2 de la placenta (PAI2), precursor del factor derivado del epitelio pigmentado humano (PEDF), inhibidor de proteasa 6 (PI6), inhibidor de proteasa 8 (PI8), inhibidor de proteasa 9 (PI9), antígeno 1 humano asociado al carcinoma de células escamosas (SCCA-1), antígeno 2 humano asociado al carcinoma de células escamosas (SCCA-2), globulina de unión a T4 (TBG), Megsin, e inhibidor de proteasa 14 (PI14), fragmentos biológicamente activos de estos, quimeras moleculares de estos, y/o combinaciones de los mismos.
4. La proteína recombinante inhibidora de una calicreína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** dicha proteína recombinante inhibidora de una calicreína se selecciona del grupo que comprende la sec. con núm. de ident. 2, 4, 8, 10 y 14.
5. La proteína inhibidor recombinante de una calicreína de la reivindicación 4, **caracterizada porque** dicha proteína recombinante inhibidora de una calicreína es la sec. con núm. de ident. 4 u 8.
6. La proteína inhibidor recombinante de una calicreína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** la al menos una secuencia de sitio activo de sustrato específica para dicha calicreína es un péptido sustrato seleccionado por calicreína usando una genoteca pentapéptido aleatorio de exhibición de fago.
7. Una secuencia de ADN aislada y purificada que codifica la proteína recombinante inhibidora de una calicreína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
8. La secuencia de ADN aislada y purificada de la reivindicación 7, **caracterizada porque** dicha secuencia se selecciona del grupo que comprende la sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 5, sec. con núm. de ident.: 7, sec. con núm. de ident.: 9, sec. con núm. de ident.: 11 y sec. con núm. de ident.: 13.
9. Un vector de expresión **caracterizado porque**, comprende la secuencia de ADN aislada y purificada de las reivindicaciones 7 u 8.
10. El vector de expresión de la reivindicación 9, **caracterizado porque** comprende además un promotor operativamente unido a la secuencia de ADN aislada y purificada.
11. Una célula huésped eucariota o procariota transfectada con el vector de expresión de las reivindicaciones 9 o 10.
12. Una composición farmacéutica **caracterizada porque**, comprende la proteína recombinante inhibidora de una calicreína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como un agente activo, y opcionalmente en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

13. Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 12, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno asociado a la proteólisis en un mamífero.
- 5 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** el trastorno es un trastorno en el que la actividad de la calicreína hK2 es perjudicial.
- 10 15. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 13 o 14, **caracterizado porque** el trastorno es un cáncer, un trastorno autoinmune, un trastorno inflamatorio o un trastorno infeccioso.
- 15 16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado porque** el cáncer es cáncer de próstata, cáncer de mama o un cáncer metastásico.
17. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado porque** el trastorno inflamatorio es hipertrofia prostática benigna.
18. Un método para producir la proteína inhibidor recombinante de una calicreína de la reivindicaciones 1 a 6, que comprende las etapas de
- 20 a) seleccionar una secuencia polinucleotídica que codifica un sitio activo de sustrato específico para dicha calicreína, dicha secuencia consiste en una secuencia pentapéptido seleccionada entre SSRTE, KTRSN, ISPRS, GVFRS, GTVRS, ETKRS, LGRSL, RGRSE, RRSID, VLRSP, PFRSS, RSGSV, ARARS, SDRTA, KLRTT, RAAMM, TRAPM, DVRAA, PGRAP, VESRA, ARASE, TLQRV, RLERV, ERVSP, SSPRV, RVGPY, PSARM, RGRMA, TVRMP, LRMPT, HRMSS, RPQEL, VRPLE, SGRLA, GTLRF, QWRNS, RNDKL, MRNRA, TRDSR, TGSRD, IMSRQ, LTTSK, PFRKI específica para dicha calicreína, fragmentos biológicamente activos de estas, una quimera molecular de la misma, y/o una combinación de estos,
- 25 b) introducir dicha secuencia pentapéptido en una secuencia que codifica una secuencia de serpina, para obtener una proteína recombinante inhibidora de dicha calicreína,
- 30 c) permitir la expresión de dicha proteína recombinante inhibidora de dicha calicreína en un sistema de expresión celular bajo condiciones adecuadas,
- d) y recuperar la proteína recombinante inhibidora de dicha calicreína.
19. El método de la reivindicación 18, **caracterizado porque** las condiciones adecuadas consisten en cultivar el sistema de expresión celular a una temperatura entre 10-40°C durante 10-30 horas.
- 35 20. El método de la reivindicación 19, **caracterizado porque** las condiciones adecuadas consisten en una temperatura de 16°C durante 16 horas.
- 40 21. El método de la reivindicaciones 18 a 20, **caracterizado porque** la etapa d) se alcanza por la separación después de la extracción de la proteína recombinante inhibidora de dicha calicreína a partir del sistema de expresión celular.
22. El método de la reivindicación 21, **caracterizado porque** la separación de la proteína recombinante inhibidora de dicha calicreína se alcanza por cromatografía de afinidad.
- 45 23. El método de las reivindicaciones 18 a 22, **caracterizado porque** la proteína recombinante inhibidora de dicha calicreína se ensaya adicionalmente para su capacidad para inhibir la actividad de dicha calicreína.
24. El método de las reivindicaciones 18 a 22, **caracterizado porque** el sistema de expresión celular es una célula bacteriana.
- 50 25. Un kit diagnóstico para la detección de una calicreína en un espécimen **caracterizado porque**, comprende cualquier secuencia de ADN adecuada aislada y purificada, seleccionada del grupo de sec. con núm. de ident.: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, y/o una secuencia complementaria de la misma.
- 55 26. Un kit diagnóstico para la detección de una calicreína en una muestra **caracterizado porque**, comprende la proteína recombinante inhibidora de una calicreína de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6.

Figura 1

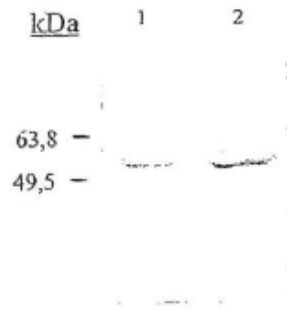


Figura 2

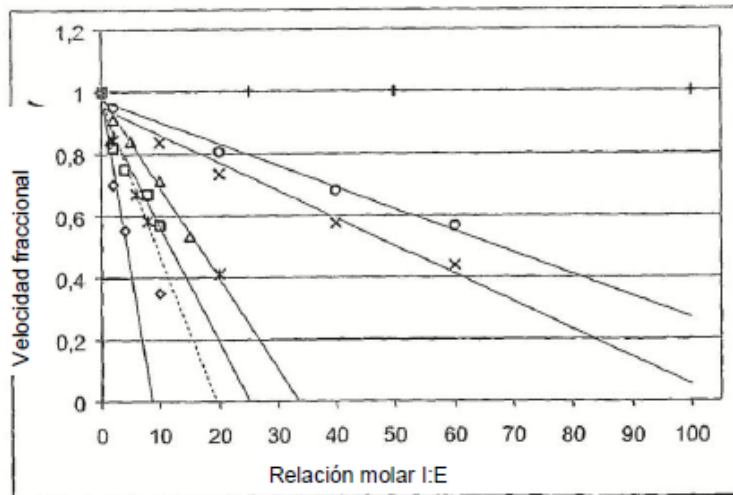


Figura 3

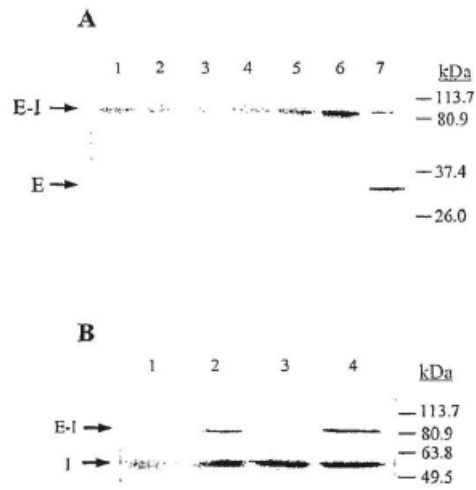


Figura 4

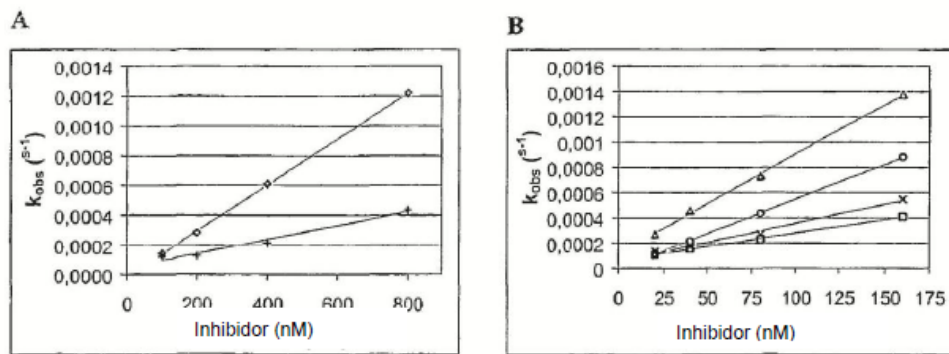


Figura 5

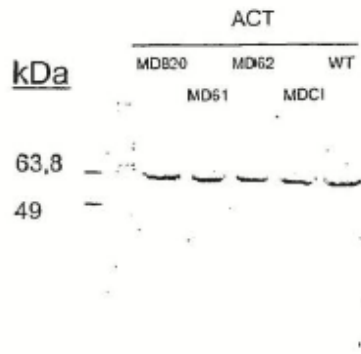


Figura 6

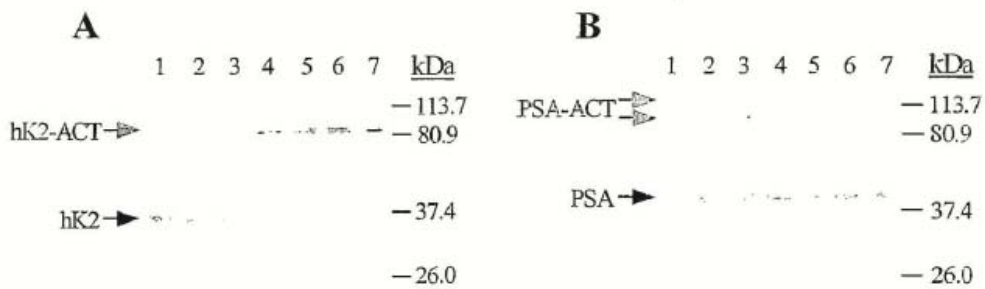


Figura 7A

Itálica: codón de iniciación ATG

Negrita: cola de His

Subrayado: secuencia de ADN diferente a la secuencia de ACT_{silvestre}

Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación del RSL

Secuencia de ADN de las variantes ACT: MD 820

Sec. con núm. de ident.: 1

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAAATACCACCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACCGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTGGGGGAAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGACCTGTGAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAAATCACCTCCGTTCTCGAGCAGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Secuencia de proteína de las variantes ACT: MD 820

Sec. con núm. de ident.: 2

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
 SPLSISTALAFLSLGAHNNTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRRLNQSDELQLSMGN
 AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNTRGKITDLIKDLDSQT
 MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
 YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNLDILLQL
 GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVKAVLDVFEEGTEASAATAVKITLRSRÄVETRTIVRF
 NRPFLMIIIVPTDTONIFFMSKVTNPKQA*

Figura 7B

Itálica: codón de iniciación ATG

Negrita: cola de His

Subrayado: secuencia de ADN diferente a la secuencia de ACT_{silvestre}

Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación del RSL

Secuencia de ADN de la variante ACT: MD 62

Sec. con núm. de ident.: 3

*ATG**GAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACCTTGACGAGGAGA*
*ATCTG**ACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT*
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAAATCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAAATGGAAGTGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCTGGTGAATACATCTTCTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAAGTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGACCTGTGAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCACCAGGAGGCTATCGATGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Secuencia de proteína de la variante ACT: MD 62

Sec. con núm. de ident.: 4

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLPKAPDKNVI
SPLSISTALAFSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRPTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNKTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPPDPQDTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKITRRSIVETRTIVRF
*NRPFMIIVPTDTQNIFFMSKVTPKQA**

Figura 7C

Itálica: codón de iniciación ATG

Negrita: cola de His

Subrayado: secuencia de ADN diferente a la secuencia de ACT_{silvestre}

Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación del RSL

Secuencia de ADN de la variante ACT: MD 83

Sec. con núm. de ident.: 5

*ATG***A**GAGAGGATCCCAT**CACCATCACCATCACT**CTAGACACCCTAACAGCCC**ACTT**GACGAGGAGA
 ATCTGACCCAGGAGA**ACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT**
 GGACTTCGCTTT**CAGCCTGTACAAGCAGTTAGT**CCTGAAGGCC**CTGATAAGAATGTCATCTTC**
 TCCC**ACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCTGA**
 CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAAT**CACCAGAG**
 CT**TC**CAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
 GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTT**CACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT**
 ATGGCTCCGAGGCCTT**TGCCACTGACTTT**CAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
 CTACGTGAAGAATGGA**ACTAGGGGGAAAATC**ACAGATCTGATCAAGGACCTT**GACTCGCAGACA**
 ATGATGGTCTGGTGAAT**TACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG**
 ATA**CTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT**
 GCATCACCTGACTATA**CCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG**
 TACACAGGCAATGCCAGCGCACT**CTTCATCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG**
 CCATGCTGCTCC**CAGAGACCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGSTGA**
 GCTCTACCTGCCAAAGTTT**TCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG**
 GGCATTGAGGAAGCCTT**CACCAGCAAGGCTGACCTGT**CAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
 CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTT**GATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC**
 TGCCACCGCGGTCAA**AAATCAGGGGGAGATCTGAGTTAGTGGAGACCGTACCATTGTGCGTTT**
 AACAGGCCCTTCTGATGAT**CATTGTCCCTACAGACACCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG**
 TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Secuencia de proteína de la variante ACT: MD 83

Sec. con núm. de ident.: 6

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVI**F**
 SPLS**I**STALAPLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLR**TLNQSSDELQLSMGN**
 AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKN**GTRGKITDLIKDLSQT**
 MMVLVNY**I**FFKAKWEMPFD**PQDTHQSRFYLS**KKKWVMP**MMSLHHLTI**PYFRDEELSCTV**VELK**
 YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFS**ISR**DYNLN**NDILLQL**
 GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKI**RGRSELVETRTIVRF**
 NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKV**TNPKQA***

Figura 7D

Itálica: codón de iniciación ATG

Negrita: cola de His

Subrayado: secuencia de ADN diferente a la secuencia de ACT_{silvestre}

Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación del RSL

Secuencia de ADN de la variante ACT: MD 67

Sec. con núm. de ident.: 7

*ATG*GAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
 ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
 GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
 TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAAATACCACCCTGA
 CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
 CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
 GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACCGAGGATGCCAAGAGGCTGT
 ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
 CTACGTGAAGAATGGAAC TAGGGGGAAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
 ATGATGGTCTTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
 ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
 GCATCACCTGACTATACTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGCTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
 TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGGAAG
 CCATGCTGCTCCAGAGACCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
 GCTCTACCTGCCAAAGTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
 GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
 CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
 TGCCACCGCGGTCAAATCAAGCTTAGAACAACATTAGTGGAGACCGGTACCATTGTGCGTTTC
 AACAGGCCCTTCTGATGATCATTTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
 TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Secuencia de proteína de la variante ACT: MD 67

Sec. con núm. de ident.: 8

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
 SPLSISTALAFSLSLGAHNTTLEILKGLKFNLTETSEAEIHQS FQHLLRRLNQS SDELQLSMGN
 AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKLI NDYVKNTRGKI TDLIKDLDSQT
 MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKVVMPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVVELK
 YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
 GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKA VLDVFBEGTEASAATAVKIKLRTTLVETRTIVRF
 NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

Figura 7F

Itálica: codón de iniciación ATG

Negrita: cola de His

Subrayado: secuencia de ADN diferente a la secuencia de ACT_{silvestre}

Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación del RSL

Secuencia de ADN de las variantes ACT: MD 518

Sec. con núm. de ident.: 11

*ATG***GAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCAC***TTGACGAGGAGA*
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
*GGACTTCGCTTTCA***GCCTGTACAAGCAGTTAGTCCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC***T*
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACCGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATAACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGACCTGTGAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCACCGAGCGTGTCTCGCCCGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCAAGCAAGCCTAA

Secuencia de proteína de las variantes ACT: MD 518

Sec. con núm. de ident.: 12

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFSLSLGAHNTTLEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNLQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
GIEBAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKITTERVSRVETRTIVRF
*NRPFMLIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA**

Figura 7G

Itálica: codón de iniciación ATG

Negrita: cola de His

Subrayado: secuencia de ADN diferente a la secuencia de ACT_{silvestre}

Subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación del RSL

Secuencia de ADN de la variante ACT: MD CI

Sec. con núm. de ident.: 13

ATG**A**GAGAGG**GAT**CCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCC**TAA**CAGCCC**ACT**TGACGAGG**GAGA**
ATCTGACCCAGGAGAA**CC**AAGACCGAGGGACACAGTGGACCTCGGAT**T**AGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTT**C**AGCCTGTACAAGCAGTTAGTCTTGAAGGCCCTGATAAGAA**T**GT**CAT**CT**T**C
TCCCCACTGAGC**A**CTCCACC**G**CC**T**TGGCC**T**CTCTGCTCTGGGGGCC**C**ATAATACCACC**T**GA
CAGAGAT**T**CTCAAAGCC**T**CAAGTTCAACCTCA**CGG**AGACT**T**CTGAGGCAGAA**A**TT**C**ACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCC**T**CAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAA**A**T
GCCATGTTTGTCAAAGAGCA**ACT**CAGTCTGCTGGACAGGTT**C**ACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCC**T**TGCCACTGACTTT**C**AGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCT**CAT**CAACGA
CTACGTGAAGAATGGAACTAGGGGGAA**A**ATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCGGTGAAT**T**ACATCTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTT**G**ACCC**CC**AA**G**
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAA**AA**AGTGGGTAATGGT**G**CCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATA**CC**TACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTT**C**ATCCTCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAA**G**
CCATGCTGCTCC**C**AGAGACCC**T**GAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTT**C**AGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTT**C**ACCAGCAAGGCTGACCTGT**C**AGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCC**C**AGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGTATGTA**TT**TGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACC**G**CGGTCAA**AA**ATCACCTTTAGATCTGCATTAGTGGAGACCGCTACCA**TT**TGTGCGTTT**C**
AACAGG**CC**CTTCTGATGATCAT**T**GTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTT**C**ATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Secuencia de proteína de las variantes ACT: MD CI

Sec. con núm. de ident.: 14

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLV**L**KAPDKNV**I**F
SPL**S**I**S**TAL**A**FL**S**LGAHNT**L**TE**L**LKGLKFN**L**ET**S**E**A**E**I**HQ**S**FQHL**L**R**T**LN**Q**S**S**DE**L**Q**L**SM**G**N
AMFV**K**E**Q**LS**L**LD**R**FT**E**DA**K**RL**Y**GE**A**F**A**T**D**F**Q**D**S**AA**K**KL**I**ND**V**K**N**G**T**R**G**K**I**T**D**L**I**K**D**L**S**Q**T**
MM**V**L**V**N**Y****I**F**F**K**A**K**W**E**M**P**F**D**P**Q**D**TH**Q**S**R**F**Y**LS**K**K**W**V**M**V**P**M**S**L**H**H**L**T**I**P**Y**F**R**DE**E**LS**C**T**V**VE**L**K
YT**G**NA**S**AL**F**IL**P**D**Q**DK**M**EE**V**E**A**ML**L**P**E**T**L**K**R**WR**D**SL**E**PRE**I**GE**L**Y**L**PK**F**S**I**SR**D**YN**L**ND**I**LL**Q**L
GIE**E**A**F**T**S**K**A**D**L**SG**I**T**G**ARN**L**AV**S**Q**V**V**H**K**A**V**L**D**V**EE**G**TE**A**SA**A**T**A**V**K**I**T**FR**S**Á**L**V**E**TR**T**I**V**RF
NRP**F**LM**I**I**V**PT**D**T**Q**NI**F**F**M**SK**V**T**N**PK**Q**A*

Figura 8

Serpina	Secuencia	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5
ACT _{silvestre}	Proteína (a.a) Sec. con núm. de ident.: 15	V	K	I	T	L	L*	S	A	L	V	E
	ADN (codón)	GTC	AAA	ATC	ACC	CTC	CTT	TCT	GCA	TTA	GTG	GAG
MD820	Proteína (a.a) Sec. con núm. de ident.: 16	V	K	I	T	L	<u>R*</u>	S	<u>R</u>	<u>A</u>	V	E
	ADN (codón)	GTC	AAA	ATC	ACC	CTC	<u>CGT</u>	TCT	<u>CGA</u>	<u>GCA</u>	GTG	GAG
MD62	Proteína (a.a) Sec. con núm. de ident.: 17	V	K	I	T	<u>R</u>	<u>R*</u>	S	<u>I</u>	<u>D</u>	V	E
	ADN (codón)	GTC	AAA	ATC	ACC	<u>AGG</u>	<u>AGG</u>	TCT	<u>ATC</u>	<u>GAT</u>	GTG	GAG
MD83	Proteína (a.a) Sec. con núm. de ident.: 18	V	K	I	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>R*</u>	S	<u>E</u>	L	V	E
	ADN (codón)	GTC	AAA	ATC	<u>AGG</u>	<u>GGG</u>	<u>AGA</u>	TCT	<u>GAG</u>	TTA	GTG	GAG
MD67	Proteína (a.a) Sec. con núm. de ident.: 19	V	K	I	<u>I</u>	L	<u>R*</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	L	V	E
	ADN (codón)	GTC	AAA	ATC	<u>AAG</u>	CTI	<u>AGA</u>	<u>ACA</u>	<u>ACA</u>	TTA	GTG	GAG
MD61	Proteína (a.a) Sec. con núm. de ident.: 20	V	K	I	<u>M</u>	<u>I</u>	<u>R*</u>	S	<u>N</u>	<u>A</u>	V	E
	ADN (codón)	GTC	AAA	ATC	<u>ATG</u>	<u>ACA</u>	<u>AGA</u>	TCT	<u>AAC</u>	<u>GCA</u>	GTG	GAG
MD518	Proteína (a.a) Sec. con núm. de ident.: 21	V	K	I	T	<u>E</u>	<u>R*</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	V	E
	ADN (codón)	GTC	AAA	ATC	ACC	<u>GAG</u>	<u>CGT</u>	<u>GTC</u>	<u>TCG</u>	<u>CCC</u>	GTG	GAG
MDCI	Proteína (a.a) Sec. con núm. de ident.: 22	V	K	I	T	<u>E</u>	<u>R*</u>	S	A	L	V	E
	ADN (codón)	GTC	AAA	ATC	ACC	<u>ITI</u>	<u>AGA</u>	TCT	GCA	TTA	GTG	GAG

Figura 9

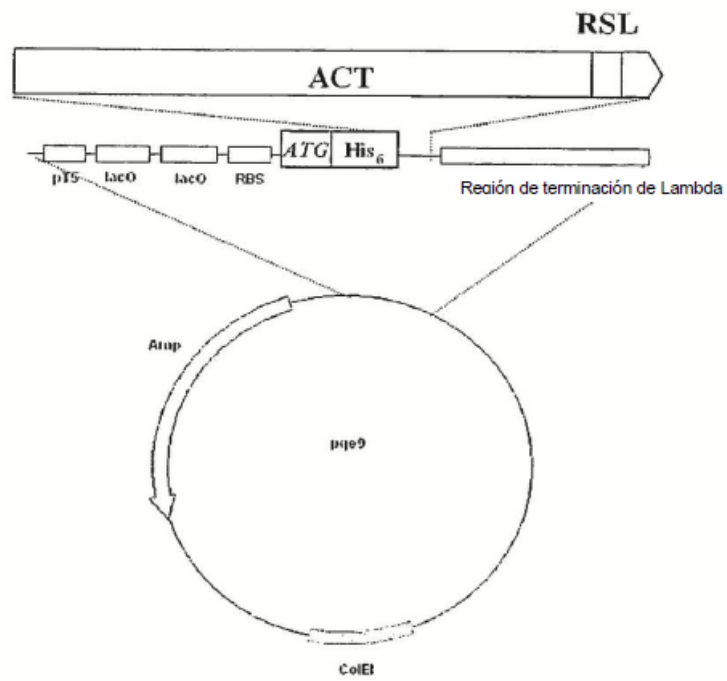


Figura 10 A

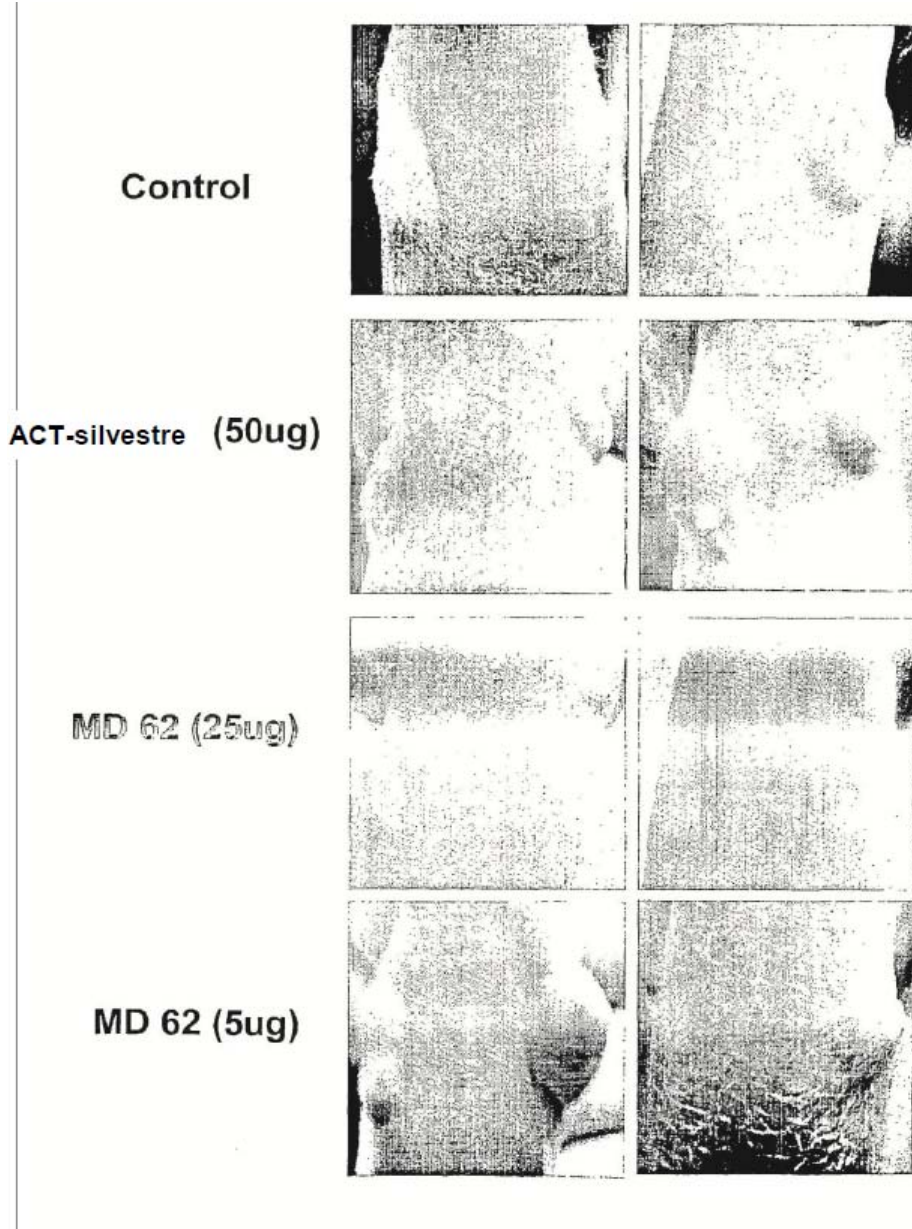


Figura 10 B

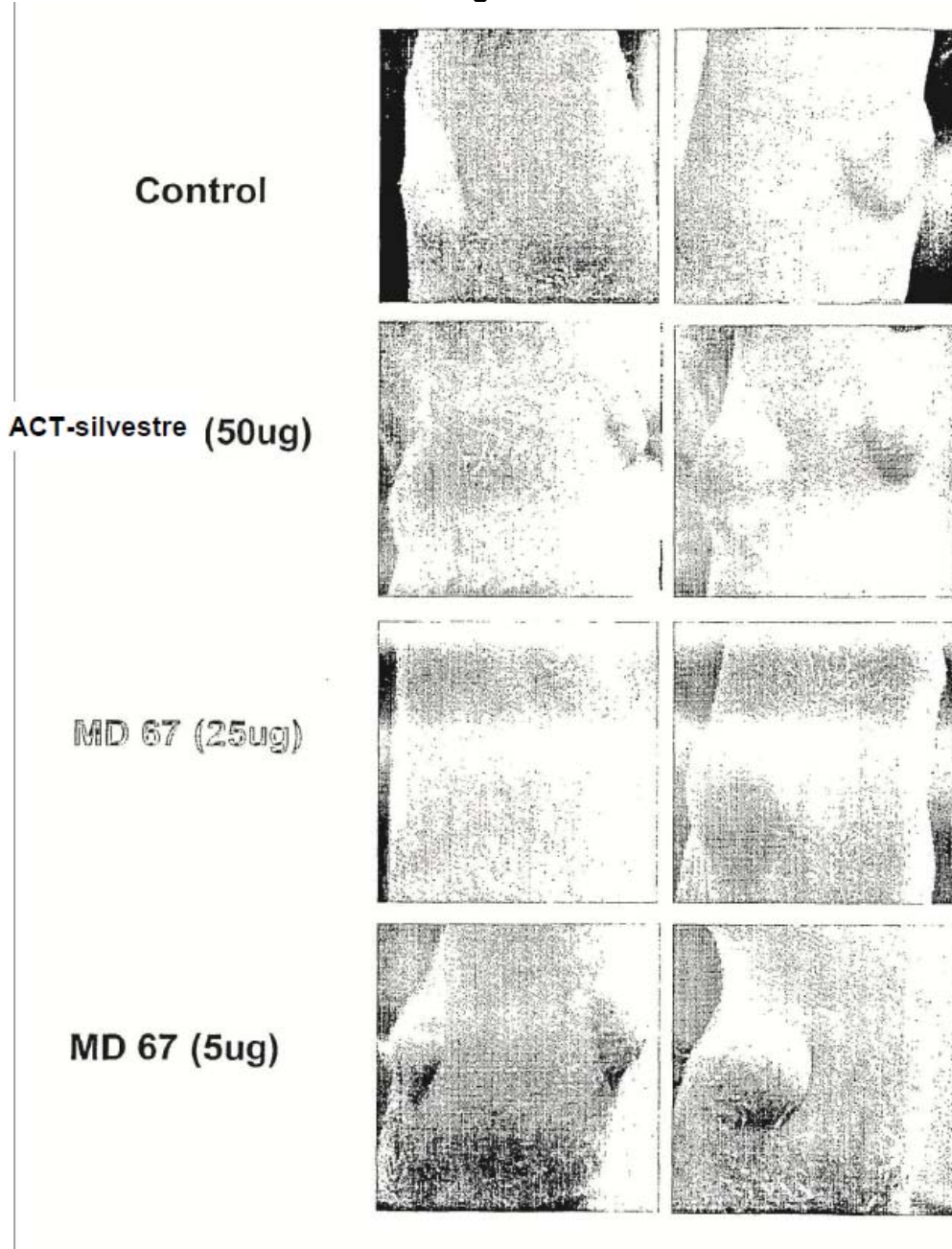


Figura 11

