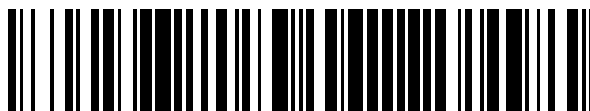


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 437**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

C12N 9/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2007 E 11173352 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2402437**

54 Título: **Procedimientos de cribado de proteasas y proteasas identificadas por los mismos**

30 Prioridad:

05.07.2006 US 818804 P

05.07.2006 US 818910 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.08.2016

73 Titular/es:

CATALYST BIOSCIENCES, INC. (100.0%)

260 Littlefield Avenue

South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

MADISON, EDWIN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 579 437 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

Procedimientos de cribado de proteasas y proteasas identificadas por los mismos

5 Campo de la invención

Se describen procedimientos para identificar proteasas modificadas con especificidad por sustrato modificada u otras propiedades. Los procedimientos criban proteasas candidatas y modificadas poniéndolas en contacto con un sustrato que las atrapa tras la escisión del sustrato.

10 Antecedentes

Las proteasas son enzimas de degradación de proteínas. Debido a que las proteasas pueden interactuar específicamente con e inactivar o activar una proteína diana, se han empleado como agentes terapéuticos. Las proteasas que se producen naturalmente frecuentemente no son agentes terapéuticos óptimos ya que no presentan la especificidad, estabilidad y/o actividad catalítica que las hace adecuadas como agentes bioterapéuticos (véase, por ejemplo, Fernandez-Gacio y col. (2003) Trends in Biotech. 21: 408-414). Entre las propiedades de agentes terapéuticos que son importantes están la falta de inmunogenicidad o inmunogenicidad reducida; especificidad por una molécula diana y efectos secundarios limitados. Las proteasas que se producen naturalmente generalmente carecen de una o más de estas propiedades.

Se han hecho intentos por lograr proteasas con propiedades mejoradas. Entre estos enfoques se incluyen 1) diseño racional, que requiere información sobre la estructura, mecanismos catalíticos y modelado molecular de una proteasa; y 2) evolución dirigida, que es un procedimiento que implica la generación de un diverso repertorio de mutantes para una proteasa, y selección de aquellos mutantes que presentan una característica deseada (Bertschinger y col. (2005) en Phage display in Biotech. and Drug Discovery (Sidhu S, ed), pág. 461-491). Para el anterior enfoque, una falta de información sobre la relación estructura-función de las proteasas limita la capacidad para diseñar racionalmente mutaciones para la mayoría de las proteasas. Se han empleado metodologías de evolución dirigida con éxito limitado.

El cribado para la actividad de proteasa mejorada frecuentemente conduce a una pérdida de selectividad del sustrato y viceversa. Una proteasa terapéutica óptima debería presentar una alta especificidad por un sustrato diana y una alta eficiencia catalítica. Debido a la eficacia limitada de procedimientos disponibles para seleccionar proteasas con especificidad optimizada y actividad optimizada, sigue existiendo la necesidad de desarrollar procedimientos alternativos de selección de proteasas. Por consiguiente, entre los objetos en este documento está proporcionar procedimientos para la selección de proteasas o proteasas mutantes con especificidades y actividades de sustrato deseadas.

Resumen

La presente invención proporciona un polipéptido de la serina proteasa 1 tipo membrana (MT-SP1) modificada o una porción catalíticamente activa del mismo que comprende un reemplazo de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 60(g), basado en la numeración de quimotripsina, por el que la especificidad por sustrato por una proteína del complemento es elevada en comparación con el polipéptido de MT-SP1 que no contiene el reemplazo de aminoácido. En este documento se describen procedimientos para la selección o identificación de proteasas o proteasas mutantes o porciones catalíticamente activas de las mismas con especificidades y actividades de sustrato deseadas o predeterminadas. En particular, en este documento se describen procedimientos de cribado de proteasas que identifican proteasas que tienen una especificidad y/o actividad de sustrato alterada, mejorada u optimizada o alterada de otro modo para un sustrato o sustratos diana. Los procedimientos pueden usarse, por ejemplo, para cribar proteasas que tienen una especificidad y/o actividad de sustrato alterada por un sustrato diana que participa en la etiología de una enfermedad o trastorno. En virtud de la especificidad y/o actividad alterada, normalmente aumentada, por un sustrato diana, las proteasas identificadas o seleccionadas en los procedimientos descritos en este documento son candidatas para su uso como reactivos o agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades o afecciones en las que participa el sustrato diana. En la práctica de los procedimientos descritos en este documento, un conjunto de proteasas o porción catalíticamente activa de las mismas se pone en contacto con un polipéptido de captura de proteasas produciendo la formación de complejos estables del polipéptido de captura de proteasas con proteasas o porción catalíticamente activa de las mismas en el conjunto. En algunos ejemplos, el polipéptido de captura de proteasas se modifica para ser escindido por una proteasa que tiene una especificidad y/o actividad de sustrato predeterminada por un sustrato diana, por ejemplo, un sustrato diana que participa en una enfermedad o trastorno. El procedimiento puede comprender adicionalmente el cribado de los complejos para especificidad por sustrato para la secuencia de escisión del sustrato diana. En tales ejemplos, la proteasa identificada o seleccionada tiene una actividad y/o especificidad alterada hacia el sustrato diana. En un ejemplo, el complejo estable se forma por enlace covalente de una proteasa seleccionada con un polipéptido de captura de proteasas. Las proteasas seleccionadas o porción catalíticamente activa de las mismas se identifican o seleccionan del complejo en los procedimientos descritos en este documento. Los procedimientos descritos en este documento pueden incluir adicionalmente la etapa de separar las proteasas

complejadas de los miembros de proteasas sin complejar del conjunto. En un ejemplo, el polipéptido de captura de proteasas está marcado para la detección o separación y la separación se efectúa por captura de complejos que contienen el polipéptido de captura de proteasas detectable y la proteasa o porción catalíticamente activa de la misma. La captura puede efectuarse en suspensión, disolución o sobre un soporte sólido. En casos en los que la

5 captura sea por un soporte sólido, el polipéptido de captura de proteasas está unido al soporte sólido, que puede efectuarse antes, durante o después de la puesta en contacto del polipéptido de captura de proteasas con el conjunto de proteasas o porciones catalíticamente activas de las mismas. El soporte sólido puede incluir, por ejemplo, un pocillo de una placa de 96 pocillos. En algunos ejemplos, el polipéptido de captura de proteasas está marcado con biotina. En otros ejemplos, el polipéptido de captura de proteasas puede marcarse con una marca His

10 y la separación puede efectuarse por captura con un agente quelante metálico tal como, pero no se limita a, sulfato de níquel (NiSO_4), cloruro de cobalto (CoCl_2), sulfato de cobre (CuSO_4) y cloruro de cinc (ZnCl_2). El agente quelante metálico puede conjugarse con un soporte sólido tal como, por ejemplo, sobre perlas tales como perlas Sepharose o perlas magnéticas.

15 En los procedimientos descritos en este documento, el procedimiento puede incluir adicionalmente una etapa de amplificar la proteasa o porción catalíticamente activa de la misma en los complejos separados. En algunos ejemplos, la proteasa o porción catalíticamente activa de la misma en el complejo separado está expuesta sobre un fago, y la amplificación se efectúa infectando una célula huésped con el fago. Las células huésped pueden incluir una bacteria, por ejemplo, *E. coli*. La proteasa amplificada, tanto de medio de células bacterianas, periplasma bacteriano, sobrenadante de fagos como de proteína purificada, puede cribarse para especificidad y/o actividad hacia un sustrato diana. Normalmente, el sustrato diana es un polipéptido o secuencia de escisión en un polipéptido que participa en la etiología de una enfermedad o trastorno.

25 En este documento también se describe un procedimiento de multiplexación por el que el conjunto de proteasas se pone en contacto con una pluralidad de polipéptidos de captura de proteasas diferentes, que incluye formas modificadas de los mismos, en el que cada uno de los polipéptidos de captura de proteasas está marcado de forma que pueda detectarse de forma identificable. En tales procedimientos, al menos dos polipéptidos de captura de proteasas están marcados de forma identificable de forma que pueda formarse más de un complejo estable e identificarse más de una proteasa.

30 En los procedimientos descritos en este documento, los procedimientos también incluyen rondas sucesivas de cribado para optimizar la selección de proteasas en las que las proteasas se amplifican tras su identificación o selección en una primera ronda de los procedimientos de cribado en este documento para así producir un segundo conjunto de proteasas o porciones catalíticamente activas de las mismas. El segundo conjunto de proteasas se pone

35 en contacto con un polipéptido de captura de proteasas, que es el mismo o diferente del primer polipéptido de captura de proteasas, para producir un segundo conjunto de complejos estables. Las proteasas en el segundo conjunto de complejos estables se identifican o se seleccionan.

40 En los procedimientos descritos en este documento, el polipéptido de captura de proteasas es una serpina, un miembro de la familia de las alfa-macroglobulinas o un miembro de la familia p35. Una molécula de polipéptido tal usada en los procedimientos descritos en este documento forma un complejo estable por enlace covalente de una proteasa o porción catalíticamente activa de la misma con el polipéptido de captura de proteasas.

45 En un aspecto de los procedimientos descritos en este documento se identifican proteasas que tienen una especificidad por sustrato deseada poniendo en contacto un conjunto de proteasas y/o porciones proteolíticamente activas de proteasas con un polipéptido de captura de proteasas para formar complejos estables del polipéptido de captura de proteasas con una proteasa tras la escisión del polipéptido de captura de proteasas. El polipéptido de captura de proteasas, o forma modificada del mismo, se selecciona para su uso en los procedimientos para los fines de ser escindido por una proteasa que tiene la especificidad por sustrato deseada. En los procedimientos, la

50 proteasa o porción proteolíticamente activa de la misma se identifica para seleccionar una proteasa que tiene una especificidad por sustrato deseada.

El conjunto de proteasas usado en los procedimientos descritos en este documento es cualquier conjunto de proteasas o porciones catalíticamente activas de las mismas e incluyen miembros con al menos, aproximadamente

55 o igual a 5, 10, 50, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 o más miembros diferentes. En algunos aspectos, las proteasas son serina y/o cisteína proteasas. En los procedimientos descritos en este documento, el conjunto de proteasas o porciones catalíticamente activas de las mismas están expuestas para ponerse en contacto con un polipéptido de captura de proteasas. En un ejemplo, la proteasa o porción proteolíticamente activa de la misma está expuesta sobre un soporte sólido, superficie celular, o sobre una superficie de un microorganismo. La proteasa puede exponerse sobre

60 levadura, bacterias, un virus, un fago, un ácido nucleico, una molécula de ARNm o sobre ribosomas. Si la proteasa o porción proteolíticamente activa de la misma está expuesta sobre un microorganismo, el microorganismo incluye, pero no se limita a, *E. coli*, *S. cerevisiae* o un virus tal como un fago M13, fd o T7, o un baculovirus. En los procedimientos descritos en este documento, las proteasas o porciones proteolíticamente activas de las mismas se exponen en una biblioteca de exposición sobre fago y el conjunto de proteasas es una biblioteca de exposición

65 sobre fago de proteasas. En algunas realizaciones, las proteasas se proporcionan en los conjuntos tales como por exposición, como porciones proteolíticamente activas de una proteasa de longitud completa. En algunos ejemplos, el

contacto de un conjunto de proteasas con un polipéptido de captura de proteasas es en una mezcla homogénea.

En este documento se describe un procedimiento de selección de proteasas en el que al menos dos polipéptidos de captura de proteasas diferentes se ponen en contacto con el conjunto, pero en el que sólo uno de los polipéptidos de captura de proteasas está detectablemente marcado. El polipéptido de captura de proteasas que está detectablemente marcado permite la captura de complejos estables que contienen el polipéptido de captura de proteasas detectable y una proteasa o porción catalíticamente activa de la misma. En algunos ejemplos de este procedimiento, el uno o varios polipéptidos de captura de proteasas que no están marcados detectablemente están presentes en exceso en la reacción en comparación con el polipéptido de captura de proteasas detectablemente marcado. En los procedimientos, la marca es cualquier marca para la detección de la misma, tal como una marca fluorescente o una marca de epítipo tal como una marca His. En otros ejemplos, la marca detectable es biotina.

El conjunto de proteasas para el que se hace la selección en los procedimientos descritos en este documento incluye cualquier conjunto de proteasas. En algunos ejemplos, las proteasas son serina o cisteína proteasas. El conjunto de proteasas incluye aquellas que son miembros de la familia de las quimotripsinas y la subtilisina de serina proteasas o de las caspasas de la familia de la papaína de cisteína proteasas. Las proteasas incluyen cualquier proteasa, o porción catalíticamente activa de la misma, expuesta en la Tabla 7. En algunos ejemplos, la proteasa o porción catalíticamente activa de la misma son conjuntos de las proteasas activador del plasminógeno de urocinasa (u-PA), las proteasas activador tisular del plasminógeno (t-PA), o las proteasas MT-SP1.

Los polipéptidos de captura de proteasas usados en los procedimientos descritos en este documento son serpinas, miembros de la familia p35, miembros de la familia de las alfa-macroglobulinas o cualquier forma modificada de las mismas. Un polipéptido de captura de proteasas usado en los procedimientos descritos en este documento incluye, pero no se limita a, inhibidor 1 del plasminógeno (PAI-1), antitrombina (AT3) o alfa 2-macroglobulina, o formas modificadas de los mismos. Formas modificadas de un polipéptido de captura de proteasas usado en los procedimientos descritos en este documento incluyen aquellas que contienen reemplazo, deleciones o sustituciones de aminoácidos en el sitio reactivo del polipéptido de captura de proteasas. En algunos ejemplos, la modificación es una cualquiera o más reemplazos de aminoácidos correspondientes a una secuencia de escisión de un sustrato diana. El sustrato diana puede ser cualquier proteína que participe en una etiología de una enfermedad o trastorno. Ejemplos de sustratos diana incluyen, pero no se limitan a, un VEGFR, una secuencia de escisión de t-PA, o una proteína del complemento. Por ejemplo, sustratos diana incluyen, pero no se limitan a, VEGFR2 o proteína del complemento C2. La secuencia de escisión de un sustrato diana incluye, pero no se limita a, cualquiera expuesta en cualquiera de SEC ID N°: 389, 479 y 498. En algunos aspectos descritos en este documento, el polipéptido de captura de proteasas es una serpina y el uno o más reemplazos de aminoácidos están en el bucle del sitio reactivo del polipéptido de serpina. El uno o más reemplazos en el bucle del sitio reactivo (RSL) incluyen aquellos en una cualquiera o más de las posiciones P4-P2'. A modo de ejemplo de tales serpinas usadas en los procedimientos descritos en este documento se exponen algunas en cualquiera de SEC ID N°: 497, 499, 610 y 611. En otro ejemplo, el polipéptido de captura de proteasas es una alfa 2-macroglobulina y el uno o más reemplazos de aminoácidos están en la región cebo del polipéptido. Las proteasas identificadas o seleccionadas en los procedimientos descritos en este documento contra un polipéptido de captura de proteasas modificado pueden cribarse o seleccionarse para especificidad por sustrato alterada por el sustrato diana con respecto a un sustrato no diana. En tales ejemplos, el sustrato no diana incluye un sustrato de la proteasa molde correspondiente. Normalmente, la especificidad por sustrato de la proteasa identificada o seleccionada aumenta 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces o más.

Los procedimientos descritos en este documento incluyen aquellos que son iterativos en los que el procedimiento de identificación y/o selección de proteasas con una especificidad por sustrato deseada se repite o se realiza una pluralidad de veces. En tales procedimientos, una pluralidad de proteasas diferentes puede identificarse en la primera iteración, o la primera ronda, del procedimiento. En otros ejemplos, después de la primera iteración se genera y se prepara una pluralidad de proteasas basándose en las proteasas identificadas seleccionadas en la primera ronda de iteración. Adicionalmente, en algunos ejemplos, las secuencias de aminoácidos de proteasas seleccionadas identificadas en la primera ronda o iteración y/o en rondas sucesivas se comparan para identificar puntos calientes. Puntos calientes son aquellas posiciones que son reconocidas como un locus modificado en rondas múltiples tal como se produce en al menos 2, 3, 4, 5 o más proteasas identificadas, tal como en comparación con una proteasa natural o molde de un conjunto de proteasas modificadas usadas en el procedimiento.

En el procedimiento en este documento también se describe otra etapa de, después de identificar una proteasa o proteasas, preparar un segundo conjunto de proteasas, en el que una proteasa identificada usa un molde para hacer más mutaciones en la secuencia de proteasa o porción catalíticamente activa de la misma de forma que miembros del segundo conjunto (se basen en) contengan polipéptidos que tienen mutaciones de las proteasas identificadas y mutaciones adicionales; luego poner en contacto el segundo conjunto con un polipéptido de captura de proteasas que es tanto idéntico como diferente de la captura de proteasas usada para aislar la primera proteasa o proteasas, en la que la captura de proteasas se modifica para ser escindida por una proteasa que tiene la especificidad por sustrato deseada; e identificar proteasa(s) o porción (porciones) proteolíticamente activa(s) de una proteasa del conjunto en un complejo, por lo que la(s) proteasa(s) identificada(s) tiene(n) mayor actividad o especificidad hacia el sustrato deseado que la primera proteasa identificada. El segundo conjunto puede contener mutaciones aleatorias o

dirigidas en comparación con la secuencia de aminoácidos de la(s) proteasa(s) molde(s) identificada(s) o porción proteolíticamente activa de una proteasa. Las mutaciones dirigidas incluyen, por ejemplo, posiciones de puntos calientes tales como las posiciones 30, 73, 89 y 155, basándose en la numeración de la quimotripsina, en una serina proteasa tal como u-PA.

En la práctica de los procedimientos, la reacción para formar complejos estables puede modularse controlando uno o más parámetros. Tales parámetros son cualquiera que altere la tasa o grado de reacción o eficiencia de la reacción tal como, pero no se limitan a, tiempo de reacción, temperatura, pH, fuerza iónica, concentración de bibliotecas y concentración de polipéptido de captura de proteasas.

Las reacciones pueden realizarse en presencia de un competidor de la reacción entre un polipéptido de captura de proteasas y una proteasa o porción proteolíticamente activa de la misma para así potenciar la selectividad de la(s) proteasa(s) identificada(s) o porción (porciones) proteolíticamente activa(s). Los competidores incluyen, por ejemplo, suero o plasma. Tal como suero humano o plasma humano, un extracto de células o de tejido, un fluido biológico tal como orina o sangre, una forma natural purificada o parcialmente purificada (u otra forma modificada) de la captura de proteasas. A modo de ejemplo de tales competidores es una forma natural purificada o parcialmente purificada de un polipéptido de captura de proteasas o unas o más variantes específicas de un polipéptido de captura de proteasas.

Se describen procedimientos iterativos para desarrollar o seleccionar o identificar una proteasa o porción proteolíticamente activa de la misma con especificidad/selectividad y/o actividad por al menos dos secuencias de escisión. Los procedimientos incluyen las etapas de: a) poner en contacto un conjunto de proteasas y/o porciones proteolíticamente activas de proteasas con un primer polipéptido de captura de proteasas para formar, tras la escisión del polipéptido de captura de proteasas por la proteasa o porción proteolíticamente activa de la misma, complejos estables que contienen el polipéptido de captura de proteasas con una proteasa o porción catalíticamente activa de la misma en el conjunto, en el que la puesta en contacto se efectúa en presencia de un competidor; b) identificar o seleccionar proteasas o porciones proteolíticamente activas de las mismas que forman complejos con el primer polipéptido de captura de proteasas; c) poner en contacto proteasas o porción proteolíticamente activa de las mismas que forman complejos con el primer polipéptido de captura de proteasas con un segundo polipéptido de captura de proteasas en presencia de un competidor; y d) identificar o seleccionar proteasas o porciones proteolíticamente activas de las mismas que forman complejos con el primer polipéptido de captura de proteasas. Las dos secuencias de escisión pueden estar en un sustrato diana o pueden estar en dos sustratos diana diferentes. La proteasa identificada, seleccionada o desarrollada o porción proteolíticamente activa de la misma tiene especificidad por sustrato y/o actividad de escisión por al menos dos secuencias de escisión diferentes en uno o dos sustratos diana diferentes. El primer y segundo polipéptidos de captura de proteasas pueden ser iguales o diferentes. Normalmente, el primer y segundo polipéptidos de captura de proteasas usados en el procedimiento son diferentes y cada uno se modifica para ser escindido por una proteasa que tiene la especificidad por sustrato predeterminada por sustratos diana diferentes. El procedimiento pueden incluir adicionalmente repetir las etapas a) y b) o a)-d) al menos una vez más hasta que se aísle una proteasa con una especificidad por sustrato deseada o predeterminada y actividad de escisión por al menos dos secuencias de reconocimiento. La especificidad por sustrato y la actividad de escisión normalmente son elevadas en comparación con una proteasa molde.

Los competidores para su uso en los procedimientos descritos en este documento incluyen algo con lo que el polipéptido de captura de proteasas pueda interactuar, normalmente con menor estabilidad que una proteasa diana. Los competidores incluyen, pero no se limitan a, suero, plasma, suero humano o plasma humano, un extracto de células o de tejido, un fluido biológico tal como orina o sangre, una forma natural purificada o parcialmente purificada de la captura de proteasas y una o más variantes específicas de un polipéptido de captura de proteasas.

También se describen procedimientos de selección de proteasas que incluyen las etapas de: a) poner en contacto un conjunto de proteasas o porciones proteolíticamente activas de las mismas con un primer polipéptido de captura de proteasas para formar, tras la escisión del polipéptido de captura de proteasas, complejos covalentes del polipéptido de captura de proteasas con cualquier proteasa o porción catalíticamente activa de la misma en el conjunto; b) separar las proteasas complejadas del (de los) polipéptido(s) de captura de proteasas sin complejar; c) aislar o seleccionar o identificar las proteasas complejadas; d) generar un segundo conjunto de proteasas o porciones proteolíticamente activas de proteasas basándose en las proteasas seleccionadas; y e) repetir las etapas a) - c) poniendo en contacto el segundo conjunto de proteasas o porciones proteolíticamente activas de las mismas con un segundo polipéptido de captura de proteasas que es diferente del primer polipéptido de captura de proteasas para formar complejos; separar los complejos; y aislar, seleccionar o identificar proteasas complejadas. El primer y segundo polipéptidos de captura de proteasas pueden modificarse para contener dos secuencias de reconocimiento de sustratos diana diferentes, por lo que la proteasa identificada o seleccionada tiene especificidad y alta actividad de escisión por al menos dos secuencias de reconocimiento. Estos procedimientos pueden repetirse una pluralidad de veces. En estos procedimientos, el conjunto de proteasas o porciones proteolíticamente activas de las mismas puede ponerse en contacto con el primer y/o segundo polipéptidos de captura de proteasas en presencia de un competidor (véase antes).

En cualquiera de los procedimientos de selección de proteasas descritos en este documento, los conjuntos pueden contener proteasas modificadas. Las modificaciones en las proteasas pueden ser aleatorias o dirigidas o en una región diana del polipéptido.

- 5 En este documento se proporcionan polipéptidos de MT-SP1 modificados identificados por los procedimientos en este documento. Tales polipéptidos modificados incluyen cualquiera que tenga un reemplazo de aminoácido Y60(g)S en una posición correspondiente a una posición 60(g) basado en la numeración de quimotripsina y que tiene opcionalmente una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas de entre D23E, I41F, I41T, L52M, T56K, H71R, F93L, N95K, F97Y, F97L, T98P, F99L, A126T, V129D, P131S, I136T, I136V, H143R, T144I, I154V, N164D, T166A, L171F, P173S, F184(a)L, Q192H, S201I, Q209L, Q221(a)L, R230W, F234L y V244G, basándose en la numeración de la quimotripsina, en un polipéptido de MT-SP1 expuesto en SEC ID N°: 253. En algunos ejemplos, las modificaciones son en una porción catalíticamente activa de una MT-SP1 que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 505. En otros ejemplos, las modificaciones son en un polipéptido de MT-SP1 que comprende además una modificación correspondiente a la modificación de C122S en un polipéptido de MT-SP1 expuesto en SEC ID N°: 253, basándose en la numeración de la quimotripsina, por ejemplo, una MT-SP1 expuesta en SEC ID N°: 507 ó 517. Los polipéptidos de MT-SP1 modificados proporcionados en este documento pueden incluir adicionalmente una o más modificaciones correspondientes a Q175R o D217V en un polipéptido de MT-SP1 expuesto en SEC ID N°: 253. Cualquiera de los polipéptidos de MT-SP1 anteriormente modificados presenta modificaciones que aumentan una o ambas de la especificidad por una proteína del complemento C2 o actividad hacia una proteína del complemento C2.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen los polipéptidos de MT-SP1 modificados según las presentes reivindicaciones. Las composiciones farmacéuticas contienen excipientes farmacéuticamente aceptables, y pueden formularse por cualquier vía de administración adecuada que incluye, pero no se limita a, administración sistémica, oral, nasal, pulmonar, local y tópica. También se proporcionan kits que contienen cualquiera de las composiciones farmacéuticas, un dispositivo para administración de la composición y, opcionalmente, instrucciones para la administración.

Se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos que codifican las proteasas MT-SP1 modificadas y porciones catalíticamente activas de las mismas según las presentes reivindicaciones. También se proporcionan vectores que contienen las moléculas de ácidos nucleicos y células que contienen las moléculas de ácidos nucleicos o vectores.

En este documento se proporcionan composiciones farmacéuticas según las presentes reivindicaciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección que está mediada por una proteína del complemento, particularmente C2. Tales enfermedades y afecciones incluyen septicemia, artritis reumatoide (AR), glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP), esclerosis múltiple (EM), miastenia grave (MG), asma, enfermedad inflamatoria del intestino, lesión de tejido inflamatoria aguda mediada por inmunocomplejos (IC), enfermedad de Alzheimer (EA), lesión por isquemia-reperfusión y síndrome de Guillan-Barre. En algunos ejemplos, la lesión por isquemia-reperfusión se produce por un acontecimiento o tratamiento tal como, pero no se limita a, infarto de miocardio (IM), accidente cerebrovascular, angioplastia, injerto de derivación de la arteria coronaria, derivación cardiopulmonar (DCP) y hemodiálisis. El tratamiento se efectúa administrando una composición que contiene las proteasas MT-SP1 modificadas que presentan especificidad por sustrato, particularmente elevada en comparación con la forma sin modificar, por C2. En otros ejemplos, la enfermedad o afecciones resultan del tratamiento de un sujeto. Por ejemplo, el tratamiento puede producir lesión por isquemia-reperfusión mediada por complemento. Tales tratamientos incluyen, pero no se limitan a, angioplastia o injerto de derivación de la arteria coronaria. En tales ejemplos, una proteasa MT-SP1 modificada se administra antes del tratamiento de un sujeto. Los polipéptidos de MT-SP1 modificados pueden administrarse poniendo en contacto un fluido corporal o muestra de tejido *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

50 Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** representa el mecanismo de inhibición de una proteasa por una serpina y la generación de un complejo inhibido estable. Tras el contacto, una serpina (**I**) y la proteasa (**E**) forman inicialmente un complejo similar a Michaelis no covalente (**EI**). Esto va seguido de escisión del enlace P1-P1' escindible y ataque nucleófilo por la serina catalítica de una proteasa en un carbonilo del bucle del sitio reactivo (RSL) de una serpina y formación de un producto intermedio de acil-enzima covalente (**EI[#]**). El producto inhibidor covalente cinéticamente capturado (**EI⁺**) es el resultado de la inserción de RSL, translocalización de proteasas, distorsión de sitios activos de proteasas y deformación de la estructura completa de la proteasa. La vía no inhibidora secundaria libera producto de escisión normal, serpina (**I^{*}**) y proteasa reactiva (**E**).

60 Descripción detallada

Esquema

- 65 A. Definiciones
B. Procedimiento para cribar proteasas

C. Polipéptidos de captura de proteasas

1. Serpinas: Estructura, función y expresión
2. Catálisis de proteasas, mecanismo inhibidor de serpinas y formación del producto intermedio de acil-enzima

a. Serpinas a modo de ejemplo

- i. PAI-1
- ii. Antitrombina (AT3)

3. Otros polipéptidos de captura de proteasas

- a. p35
- b. Alfa-macroglobulinas (aM)

4. Competidores de polipéptidos de captura de proteasas
5. Polipéptidos de captura de proteasas variantes

D. Proteasas

1. Proteasas candidatas

a. Clases de proteasas

- i. Serina proteasas (a) MT-SP1

E. Proteasas modificadas y conjuntos para el cribado

1. Generación de proteasas variantes

- a. Mutagénesis al azar
- b. Mutagénesis dirigida

2. Formas quiméricas de proteasas variantes
3. Bibliotecas combinatorias y otras bibliotecas

- a. Bibliotecas de exposición sobre fago
- b. Bibliotecas de exposición sobre la superficie celular
- c. Otras bibliotecas de exposición

F. Procedimientos para poner en contacto, aislar e identificar proteasas seleccionadas

1. Cribado iterativo
2. Proteasas seleccionadas a modo de ejemplo

G. Procedimientos de evaluación de la actividad y especificidad de la proteasa

H. Procedimientos de producción de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de captura de proteasas (es decir, serpinas) o variantes de los mismos o proteasas/proteasas modificadas

1. Vectores y células
2. Expresión

- a. Células procariotas
- b. Células de levadura
- c. Células de insecto
- d. Células de mamífero
- e. Plantas

3. Técnicas de purificación
4. Proteínas de fusión
5. Secuencias de nucleótidos

I. Preparación, formulación y administración de polipéptidos de proteasas seleccionados

1. Composiciones y administración

2. Expresión *in vivo* de proteasas seleccionadas y terapia génica

a. Administración de ácidos nucleicos

- i. Vectores – episómicos e integrantes
- ii. Cromosomas artificiales y otros procedimientos de administración de vectores no víricos
- iii. Liposomas y otras formas encapsuladas y administración de células que contienen ácidos nucleicos

b. Administración *in vitro* y *ex vivo*

c. Administración sistémica, local y tópica

2. Terapias de combinación

3. Artículos de fabricación y kits

J. Procedimientos a modo de ejemplo de tratamiento con polipéptidos de proteasas seleccionados Procedimientos a modo de ejemplo de tratamiento para polipéptidos de MT-SP1 seleccionados que escinden dianas de proteínas del complemento

a. Enfermedades inflamatorias inmunomediadas

b. Enfermedad neurodegenerativa

c. Enfermedad cardiovascular

K. Ejemplos

A DEFINICIONES

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto en la materia a la que pertenece la(s) invención (invenciones). En el supuesto caso de que haya una pluralidad de definiciones para términos en este documento, prevalecen aquellos en esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección tal, se entiende que tales identificadores pueden cambiar y la información particular en internet puede ir y venir, pero puede encontrarse información equivalente buscando en internet. La referencia a la misma demuestra la disponibilidad y la disseminación pública de tal información.

Como se usa en este documento, una “captura de proteasas” o “polipéptido de captura de proteasas” se refiere a un sustrato que es escindido por una proteasa y que, tras la escisión, forma un complejo estable con la proteasa para así capturar las proteasas a medida que la proteasa pasa a un estado de transición real para formar un complejo enzimático, inhibiéndose así la actividad de las proteasas y capturándolas. Por tanto, las capturas de proteasas son inhibidores de proteasas. Las capturas de proteasas son polipéptidos o moléculas que incluyen residuos de aminoácidos que son escindidos por una proteasa de forma que tras la escisión se forma un complejo estable. El complejo es suficientemente estable para permitir la separación de los complejos de la captura sin reaccionar o de la captura que tiene interacciones menos estables con las proteasas. Las capturas de proteasas incluyen cualquier molécula, sintética, modificada o que se produzca naturalmente, que es escindida por la proteasa y, tras la escisión, forma un complejo con la proteasa para permitir la separación de la proteasa reaccionada o complejo de la captura sin reaccionar. A modo de ejemplo de tales capturas de proteasas son serpinas, serpinas modificadas, moléculas que presentan un mecanismo similar a serpinas tales como, por ejemplo, p35 y cualquier otra molécula que sea escindida por una proteasa y capture la proteasa como un complejo estable tal como, por ejemplo, alfa-2-macroglobulina. Como capturas de proteasas también están incluidas polipéptidos sintéticos que son escindidos por una proteasa (o porción proteolíticamente activa de la misma) y, tras la escisión, forman un complejo estable con la proteasa o porción proteolíticamente activa de la misma.

Como se usa en este documento, serpinas se refieren a un grupo de proteínas estructuralmente relacionadas que inhiben proteasas tras la escisión de su sitio reactivo por una proteasa produciendo la formación de un producto intermedio de acil-enzima estable y la captura de la proteasa en un complejo covalente estable. Las serpinas incluyen variantes alélicas y de especies y otras variantes, siempre y cuando la molécula de la serpina inhiba una proteasa formando un complejo covalente estable. Las serpinas también incluyen fragmentos truncados o contiguos de aminoácidos de un polipéptido de serpina de longitud completa que incluye mínimamente al menos una porción suficiente del bucle del sitio reactivo (RSL) para facilitar la inhibición de proteasas y la formación de un complejo covalente estable con la proteasa. Serpinas a modo de ejemplo se exponen en la Tabla 2 y/o tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquier de SEC ID N°: 1-38, variantes alélicas o porciones truncadas de las mismas.

Como se usa en este documento, una serpina “mutante” o “variante” se refiere a una serpina que contiene modificaciones de aminoácidos, particularmente modificaciones en el bucle del sitio reactivo de la serpina. Las modificaciones pueden ser reemplazo, delección o sustitución de uno o más aminoácidos correspondientes a las

posiciones $P_n-P_{15}-P_{14}-P_{13}...P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'...P_n'$. Normalmente, la serpina contiene reemplazos de aminoácidos en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más posiciones de aminoácidos en el bucle del sitio reactivo con respecto a una serpina natural. Lo más normalmente, las sustituciones son en uno o más aminoácidos correspondientes a las posiciones P4-P2'. Por ejemplo, para la serpina PAI-1 a modo de ejemplo expuesta en SEC ID N°: 11 pueden modificarse las posiciones P4-P1' (VSARM) correspondientes a las posiciones de aminoácidos 366-370 en SEC ID N°: 11. El Ejemplo 1 describe la modificación de los residuos de aminoácidos de VSARM a RRVRM o PFGRS.

Como se usa en este documento, un “enlace escindible” se refiere al enlace en un polipéptido escindido por una proteasa y se indica por el enlace formado entre la posición P1-P1' en la secuencia de escisión de un sustrato.

Como se usa en este documento, sitio reactivo se refiere a la porción de la secuencia de un sustrato diana que es escindida por una proteasa. Normalmente, un sitio reactivo incluye la secuencia del enlace escindible de P1-P1'.

Como se usa en este documento, bucle del sitio reactivo (RSL; también llamado bucle del centro reactivo, RCL) se refiere a una secuencia de aminoácidos en una molécula de serpina (normalmente 17 a 22 aminoácidos contiguos) que sirve de sitio de reconocimiento de la proteasa y generalmente contiene los únicos determinantes o determinantes primarios de la especificidad de la proteasa. La escisión de la secuencia de RSL y los cambios conformacionales de la misma son responsables de la captura de la proteasa por la molécula de serpina en un complejo covalente estable. Para los fines en este documento, uno cualquiera o más aminoácidos en el bucle RSL de una serpina pueden modificarse para corresponderse con las secuencias de escisión en una proteína diana deseada. Tales serpinas modificadas, o porciones de las mismas que contiene la secuencia de RSL variante, pueden usarse para seleccionar proteasas con especificidad por sustrato alterada.

Como se usa en este documento, reparto se refiere al procedimiento por el que las serpinas se reparten en un complejo de serpina-proteasa estable frente a serpinas escindidas. El motivo del reparto en serpinas se refiere a la naturaleza de la vía inhibidora, que resulta de una gran translocalización del bucle del sitio reactivo escindido a través de la superficie de la serpina. Si la proteasa tiene tiempo para disociarse (es decir, desacilar el complejo de enzima-proteasa) antes de adoptar la localización inhibida, entonces se produce el reparto. Por tanto, el resultado de una interacción serpina-proteasa dada depende de la razón de reparto entre las vías inhibidoras (k_4) y de sustrato (k_5) (tal como se representa en la Figura 1), que se representa por la estequiometría de inhibición ($SI = 1 + k_5/k_4$); inhibidores buenos tienen el valor de 1 debido a que la mayoría de las moléculas de serpina se reparten en la formación del complejo y k_5/k_4 es próximo a 0. Sin embargo, si el bucle RSL no se inserta suficientemente rápido en la proteasa, se produce el reparto y la reacción avanza directamente al producto escindido.

Como se usa en este documento, eficiencia catalítica o k_{cat}/k_m es una medida de la eficiencia con la que una proteasa escinde un sustrato y se mide en condiciones en estado estacionario como es muy conocido para aquellos expertos en la materia.

Como se usa en este documento, la constante de velocidad de segundo orden de la inhibición se refiere a la constante de velocidad para la interacción de una proteasa con un inhibidor. Generalmente, la interacción de una proteasa con un inhibidor tal como una captura de proteasas, tal como una serpina, es una reacción de segundo orden proporcional al producto de la concentración de cada reactivo, el inhibidor y la proteasa. La constante de velocidad de segundo orden para la inhibición de una proteasa por un inhibidor de unión estrecho o irreversible o una captura de proteasas es una constante que, cuando se multiplica por la concentración de enzima y la concentración de inhibidor, da la tasa de inactivación de enzima por un inhibidor particular. La constante de velocidad para cada par de captura de proteasas y enzima refleja únicamente su interacción. Como una reacción de segundo orden, un aumento en la constante de velocidad de segundo orden significa que la interacción entre una proteasa seleccionada modificada y el inhibidor es más rápida en comparación con la interacción de una proteasa sin modificar y el inhibidor. Por tanto, un cambio en la constante de velocidad de segundo orden refleja un cambio en la interacción entre los componentes, la proteasa e/o inhibidor, de la reacción. Un aumento de la constante de velocidad de segundo orden cuando se criban proteasas puede reflejar una modificación seleccionada deseada en la proteasa.

Como se usa en este documento, producto intermedio de acil-enzima se refiere al producto intermedio covalente formado durante la primera etapa en la catálisis entre un sustrato y una serina esencial en el centro catalítico de una serina proteasa (normalmente Ser195, basándose en la numeración de la quimotripsina). La reacción avanza del siguiente modo: el -OH de la serina ataca el carbono del carbonilo en la posición P1 del sustrato, el nitrógeno de la histidina acepta el hidrógeno del -OH de la serina, y un par de electrones del doble enlace del oxígeno del carbonilo se mueve al oxígeno. Esto produce la generación de un producto intermedio tetraédrico negativamente cargado. Ahora se rompe el enlace que une el nitrógeno y el carbono en el enlace peptídico del sustrato. Los electrones covalentes que crean este enlace se mueven para atacar el hidrógeno de la histidina, rompiendo así la conexión. Los electrones que se movieron previamente del doble enlace del oxígeno del carbonilo regresan del oxígeno negativo para volver a crear el enlace produciendo la formación de un producto intermedio de acil-enzima covalente. El producto intermedio de acil-enzima se hidroliza por agua, produciendo la desacilación y la formación de un sustrato escindido y enzima libre.

Como se usa en este documento, un conjunto de proteasas se refiere a un conjunto que contiene al menos 10 proteasas diferentes y/o porciones proteolíticamente activas de las mismas, y que generalmente contiene al menos 50, 100, 500, 1000, 10^4 , 10^5 o más miembros. Los conjuntos normalmente contienen proteasas (o porciones proteolíticamente activas de las mismas) que van a cribarse para especificidad por sustrato. En los conjuntos se incluyen proteasas que se producen naturalmente (o porciones proteolíticamente activas de las mismas) y/o proteasas modificadas (o porciones proteolíticamente activas de las mismas). Las modificaciones incluyen mutaciones al azar a lo largo de la longitud de las proteasas y/o modificaciones en regiones elegidas como diana o seleccionadas (es decir, mutaciones dirigidas). Las modificaciones pueden ser combinatorias y pueden incluir todas las permutaciones, por sustitución de todos los aminoácidos en un locus particular o en todos los loci o subconjuntos de las mismas. Los conjuntos pueden incluir proteasas de longitud completa o más cortas que sólo incluyen el dominio de proteasa. Las proteasas pueden incluir cualquier proteasa tal como serina proteasas y cisteína proteasas. El usuario determina el tamaño del conjunto y el conjunto particular. En otras realizaciones, el conjunto puede contener tan sólo 2 proteasas.

Como se usa en este documento, “conjuntos combinatorios” o “bibliotecas combinatorias” se refiere a un conjunto de polipéptidos de proteasas que tienen mutaciones de aminoácidos distintas y diversas en su secuencia con respecto a la secuencia de una secuencia de polipéptidos de la proteasa molde de partida. Las mutaciones representadas en el conjunto pueden ser a través de la secuencia del polipéptido o pueden ser en una región especificada o regiones de la secuencia de polipéptidos. Las mutaciones pueden hacerse al azar o pueden ser mutaciones elegidas como diana diseñadas empíricamente o racionalmente basándose en información estructural o funcional.

Como se usa en este documento, una “proteasa molde” se refiere a una proteasa que tiene una secuencia de aminoácidos que se usa para la mutagénesis de la misma. Una proteasa molde puede ser la secuencia de una proteasa natural, o una porción catalíticamente activa de la misma, o puede ser la secuencia de una proteasa variante, o porción catalíticamente activa de la misma, para la que se hacen mutaciones adicionales. Por ejemplo, una proteasa mutante identificada en los procedimientos de selección en este documento puede usarse como molde de partida para la mutagénesis adicional que va a usarse en rondas posteriores de selección.

Como se usa en este documento, mutación al azar se refiere a la introducción de uno o más cambios de aminoácidos a través de la secuencia de un polipéptido sin consideración o predisposición a la mutación. La mutagénesis al azar puede facilitarse por una variedad de técnicas conocidas para un experto en la materia que incluyen, por ejemplo, irradiación UV, procedimientos químicos y procedimientos de PCR (por ejemplo, PCR propensa a error).

Como se usa en este documento, una mutación dirigida se refiere a uno o más cambios de aminoácidos en una región especificada (o regiones) o una posición especificada (o posiciones) de un polipéptido. Por ejemplo, puede hacerse mutación elegida como diana de los aminoácidos en el sitio de unión a especificidad de una proteasa. La mutagénesis dirigida puede realizarse, por ejemplo, por mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis dirigida a muti-sitio usando técnicas recombinantes convencionales conocidas en la técnica.

Como se usa en este documento, un complejo estable entre una captura de proteasas y una proteasa o una porción proteolíticamente activa de la misma se refiere a un complejo que es suficientemente estable para separarse de proteasas que no forman complejos con la captura de proteasas (es decir, proteasas sin complejar). Tales complejos pueden formarse mediante cualquier interacción estable que incluye interacciones covalentes, iónicas e hidrófobas, pero son suficientemente estables bajo las condiciones de reacción para permanecer complejadas durante un tiempo suficiente para separar complejos para el aislamiento. Normalmente, tales interacciones, tales como entre serpinas y proteasas escindidas, son enlaces covalentes.

Como se usa en este documento, un “punto caliente” se refiere a una posición que está mutada en múltiples variantes que resultan de la selección de proteasas que presentan actividad y/o selectividad mejorada para la nueva secuencia de sustrato deseada. Pueden identificarse uno o más “puntos calientes” durante la selección de proteasas. Por tanto, tales posiciones son determinantes de la especificidad y/o selectividad por la proteasa y, por tanto, contribuyen a la especificidad por sustrato y también pueden producirse como determinantes de la especificidad y/o selectividad anchos a través del locus correspondiente en más de un miembro de una familia de proteasas tal como una familia de serina proteasas o una familia de proteasas particular tal como basándose en la numeración de la quimotripsina.

Como se usa en este documento, especificidad deseada con referencia a la especificidad por sustrato se refiere a especificidad de escisión por un sustrato predeterminado o preseleccionado o elegido como diana de otro modo.

Como se usa en este documento, “seleccionar” o variaciones gramaticales del mismo se refieren a coger o elegir una proteasa que está en el complejo con un polipéptido de captura de proteasas. Por tanto, para los fines en este documento, seleccionar se refiere a sacar la proteasa basándose en su asociación en complejos estables con un polipéptido de captura de proteasas. Generalmente, la selección puede facilitarse por captura de los complejos covalentes y, si se desea, la proteasa puede aislarse. Por ejemplo, la selección puede facilitarse marcando el polipéptido de captura de proteasas, por ejemplo, con un marcador, marca u otro resto detectable predeterminado

para así identificar la proteasa basándose en su asociación en el complejo estable.

Como se usa en este documento, “identificar” y variaciones gramaticales del mismo se refiere al reconocimiento de o conocimiento de una proteasa en un complejo estable. Normalmente, en los procedimientos en este documento, la proteasa se identifica por su asociación en un complejo estable con un polipéptido de captura de proteasas que puede llevarse a cabo, por ejemplo, por amplificación (es decir, crecimiento en una célula huésped apropiada) de las proteasas unidas en el complejo seguido de secuenciación de ADN.

Como se usa en este documento, marcada para la detección o separación significa que la molécula, tal como un polipéptido de captura de proteasas, está asociada a una marca detectable, tal como un fluoróforo, o está asociada a una marca u otro resto tal como para la purificación o aislamiento o separación. Detectablemente marcada se refiere a una molécula, tal como un polipéptido de captura de proteasas, que está marcada para la detección o separación.

Como se usa en este documento, referencia a amplificación de una proteasa o porción proteolíticamente activa de una proteasa significa que la cantidad de la proteasa o porción proteolíticamente activa es elevada, tal como mediante aislamiento y clonación y expresión o, si la proteasa o porción proteolíticamente activa está expuesta sobre un microorganismo, el microorganismo se introduce en un huésped apropiado y crece o se cultiva de manera que se produzca más proteasa expuesta o porción proteolíticamente activa.

Como se usa en este documento, homogénea con referencia a una mezcla de reacción significa que los reactivos están en la fase líquida como una mezcla, que incluye como una disolución o suspensión.

Como se usa en este documento, la recitación que un conjunto de proteasas o porciones proteolíticamente activas de proteasas se “basa en” una proteasa particular significa que el conjunto se deriva de la proteasa particular, tal como por mutagénesis al azar o dirigida o diseño racional u otro esquema o protocolo de modificación, para producir un conjunto.

Como se usa en este documento, una enfermedad o afección que es tratada por la administración de t-PA se refiere a una enfermedad o afección para la que un experto en la materia administraría t-PA. Tales afecciones incluyen, pero no se limitan a, afecciones fibrinolíticas tales como trombosis arterial, trombosis venosa y tromboembolia, accidente cerebrovascular isquémico, trastornos adquiridos de la coagulación, coagulación intravascular diseminada y precursores de la misma tales como infecciones bacterianas o víricas, periodontitis, y afecciones neurológicas.

Como se usa en este documento, una enfermedad o afección que está mediada por VEGFR-2 participa en la patología o etiología. Tales afecciones incluyen, pero no se limitan a, afecciones inflamatorias y angiogénicas tales como cánceres, retinopatías diabéticas y trastornos oftálmicos que incluyen degeneración macular.

Como se usa en este documento, “proteasas”, “proteinasas” y “peptidasas” se usan indistintamente para referirse a enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos covalentes. Estas designaciones incluyen formas de zimógenos y formas mono, bi y multicatenarias de las mismas. Por claridad, la referencia a proteasa se refiere a todas las formas. Las proteasas incluyen, por ejemplo, serina proteasas, cisteína proteasas, proteasas aspárticas, treonina y metalo-proteasas dependiendo de la actividad catalítica de su sitio activo y mecanismo de escisión de enlaces peptídicos de un sustrato diana.

Como se usa en este documento, un zimógeno se refiere a una proteasa que se activa por escisión proteolítica que incluye escisión por maduración tal como escisión por activación y/o formación de complejos con otra(s) proteína(s) y/o cofactor(es). Un zimógeno es un precursor inactivo de una enzima proteolítica. Tales precursores son generalmente más grandes, aunque no necesariamente más grandes que la forma activa. Con referencia a las serina proteasas, los zimógenos se convierten en enzimas activas por escisión específica que incluye escisión catalítica y autocatalítica, o por unión de un co-factor activante que genera una enzima activa. Por tanto, un zimógeno es una proteína enzimáticamente inactiva que se convierte en una enzima proteolítica por la acción de un activador. La escisión puede efectuarse autocatalíticamente. Los zimógenos, generalmente, son inactivos y pueden convertirse en polipéptidos activos maduros por escisión catalítica o autocatalítica de la prorrogió del zimógeno.

Como se usa en este documento, una “prorrogió”, “propéptido” o “prosecuencia” se refiere a una región o un segmento que se escinde para producir una proteína madura. Esto puede incluir segmentos que funcionan para suprimir la actividad enzimática enmascarando la maquinaria catalítica y, por tanto, previniendo la formación del producto intermedio catalítico (es decir, ocluyendo estéricamente el sitio de unión a sustrato). Una prorrogió es una secuencia de aminoácidos posicionada en el extremo amino de un polipéptido biológicamente activo maduro y puede tener tan sólo algunos aminoácidos o puede ser una estructura multidominio.

Como se usa en este documento, una secuencia de activación se refiere a una secuencia de aminoácidos en un zimógeno que son el sitio requerido para la escisión por activación o escisión por maduración para formar una proteasa activa. La escisión de una secuencia de activación puede catalizarse autocatalíticamente o por componentes de activación.

La escisión por activación es un tipo de escisión por maduración en la que se produce un cambio conformacional requerido para la actividad. Esta es una vía de activación clásica, por ejemplo, para serina proteasas en las que una escisión genera un nuevo extremo N que interactúa con las regiones conservadas de la maquinaria catalítica tal como residuos catalíticos para inducir cambios conformacionales requeridos para la actividad. La activación puede producir la producción de formas multicatenarias de las proteasas. En algunos casos, las formas monocatenarias de la proteasa pueden presentar actividad proteolítica como una monocadena.

Como se usa en este documento, dominio se refiere a una parte de una molécula tal como proteínas o los ácidos nucleicos que codifican, que es estructuralmente y/o funcionalmente distinta de otras porciones de la molécula y es identificable.

Como se usa en este documento, un dominio de proteasa es la porción catalíticamente activa de una proteasa. Referencia a un dominio de proteasa de una proteasa incluye las formas mono, bi y multicatenarias de cualquiera de estas proteínas. Un dominio de proteasa de una proteína contiene todas las propiedades requeridas de esa proteína requeridas para su actividad proteolítica tal como, por ejemplo, su centro catalítico.

Como se usa en este documento, una porción catalíticamente activa o porción proteolíticamente activa de una proteasa se refiere al dominio de proteasa, o cualquier fragmento o porción del mismo, que retiene la actividad de proteasa. Significativamente, al menos *in vitro*, las formas monocatenarias de las proteasas y dominios catalíticos o porciones proteolíticamente activas de las mismas (normalmente truncaciones del extremo C) presentan actividad de proteasa.

Como se usa en este documento, un “ácido nucleico que codifica un dominio de proteasa o porción catalíticamente activa de una proteasa” se refiere a un ácido nucleico que sólo codifica el dominio de proteasa monocatenario enumerado o porción activa del mismo, y no las otras porciones contiguas de la proteasa como secuencia continua.

Como se usa en este documento, la recitación de que un polipéptido consiste esencialmente en el dominio de proteasa significa que la única porción del polipéptido es un dominio de proteasa o una porción catalíticamente activa del mismo. El polipéptido puede incluir opcionalmente y generalmente incluirá secuencias derivadas de no proteasa de aminoácidos.

Como se usa en este documento, “S1-S4” se refiere a residuos de aminoácidos que forman los sitios de unión para los residuos de P1-P4 de un sustrato (véase, por ejemplo, Schechter y Berger (1967) Biochem Biophys Res Commun 27:157-162). Cada uno de S1-S4 contiene uno, dos o más residuos que pueden ser no contiguos. Estos sitios se enumeran secuencialmente del extremo N del sitio de reconocimiento al sitio de proteólisis, denominado en lo sucesivo el enlace escindible.

Como se usa en este documento, los términos “P1-P4” y “P1'-P4'” se refieren a los residuos en un péptido de sustrato que interactúan específicamente con los residuos S1-S4 y los residuos S1'-S4', respectivamente, y son escindidos por la proteasa. P1-P4 se refieren a las posiciones de residuo en el lado del extremo N del sitio de escisión; P1'-P4' se refieren a las posiciones de residuo en el lado del extremo C del sitio de escisión. Los residuos de aminoácidos se marcan de los extremos N a C de un sustrato de polipéptido (Pi, ..., P3, P2, P1, P1', P2', P3', ..., Pj). Los subsitios de unión respectivos se marcan (Si,..., S3, S2, S1, S1', S2', S3',..., Sj). La escisión se cataliza entre P1 y P1'.

Como se usa en este documento, un “sitio de unión” se refiere al residuo o residuos que interactúan con un aminoácido específico o aminoácidos en un sustrato. Un “sitio de especificidad” es un sitio de unión que contribuye con más energía que los otros (el sitio de unión más importante o dominante). Normalmente, la etapa de unión precede a la formación del estado de transición que es necesario para que se produzca el procedimiento catalítico. Los aminoácidos S1-S4 y S1'-S4' representan el sitio de unión a la secuencia del sustrato y facilitan el reconocimiento del sustrato por la interacción con aminoácidos en P1-P4 y P1'-P4' de un sustrato de péptido, polipéptido o proteína, respectivamente. Si una proteasa interactúa con un sustrato o no es una función de los aminoácidos en las posiciones de S1-S4 y S1'-S4'. Si los aminoácidos en uno cualquiera o más de los subsitios S1, S2, S3, S4, S1', S2', S3' y S4' interactúan con o reconocen uno cualquiera o más de los aminoácidos en los sitios P1, P2, P3, P4, P1', P2', P3' y P4' en un sustrato, entonces la proteasa puede escindir el sustrato. Un sitio de unión posiciona un aminoácido diana con una proteasa de manera que se logra la catálisis de un enlace peptídico y escisión de un sustrato. Por ejemplo, las serina proteasas normalmente reconocen los sitios P4-P2' en un sustrato; otras proteasas pueden tener reconocimiento extendido más allá de P4-P2'.

Como se usa en este documento, aminoácidos que “contribuyen a la especificidad por sustrato extendida” se refiere a aquellos residuos en la hendidura del sitio activo, además del sitio de especificidad. Estos aminoácidos incluyen los residuos S1-S4, S1'-S4' en una proteasa.

Como se usa en este documento, sitios de interacción secundarios están fuera de la hendidura del sitio activo. Éstos pueden contribuir al reconocimiento de sustratos y a la catálisis. Estos aminoácidos incluyen aminoácidos que pueden contribuir con segundas y terceras interacciones de capas con un sustrato. Por ejemplo, los bucles en la

estructura de una proteasa que rodean los aminoácidos S1-S4, S1'-S4' desempeñan una función en el posicionamiento de los aminoácidos en P1-P4, P1'-P4' en el sustrato, registrándose así el enlace escindible en el sitio activo de una proteasa.

5 Como se usa en este documento, sitio activo de una proteasa se refiere al sitio de unión a sustrato en el que se produce la catálisis del sustrato. La estructura y propiedades químicas del sitio activo permiten el reconocimiento y la unión del sustrato y posterior hidrólisis y escisión del enlace escindible en el sustrato. El sitio activo de una proteasa contiene aminoácidos que contribuyen al mecanismo catalítico de la escisión de péptidos, además de aminoácidos que contribuyen al reconocimiento de secuencias del sustrato, tal como aminoácidos que contribuyen a la especificidad por sustrato de unión extendida.

10 Como se usa en este documento, una "tríada catalítica" o "residuos de sitio activo" de una serina o cisteína proteasa se refiere a una combinación de aminoácidos, normalmente tres aminoácidos, que está en el sitio activo de una serina o cisteína proteasa y contribuye al mecanismo catalítico de la escisión de péptidos. Generalmente, una tríada catalítica se encuentra en serina proteasas y proporciona un nucleófilo activo y catálisis ácida/básica. La tríada catalítica de serina proteasas contiene tres aminoácidos, que en quimotripsina son Asp¹⁰², His⁵⁷ y Ser¹⁹⁵. Estos residuos son críticos para la eficiencia catalítica de una serina proteasa.

20 Como se usa en este documento, el "sitio de reconocimiento de sustrato" o "secuencia de escisión" se refiere a la secuencia reconocida por el sitio activo de una proteasa que es escindido por una proteasa. Normalmente, por ejemplo, para una serina proteasa, una secuencia de escisión está constituida por los aminoácidos en P1-P4 y P1'-P4' en un sustrato en el que la escisión se produce después de la posición P1. Normalmente, una secuencia de escisión para una serina proteasa tiene seis residuos de longitud para corresponderse con la especificidad por sustrato extendida de muchas proteasas, pero puede ser más larga o más corta dependiendo de la proteasa. Por ejemplo, el sitio de reconocimiento de sustrato o la secuencia de escisión de MT-SP1 requerida para la autocatálisis es RQARW en la que R está en la posición P4, Q está en la posición P3, A está en la posición P2 y R está en la posición P1. La escisión en MT-SP1 se produce después de la posición R seguida de la secuencia VVGG.

30 Como se usa en este documento, sustrato diana se refiere a un sustrato que se escinde específicamente en su sitio de reconocimiento de sustrato por una proteasa. Mínimamente, un sustrato diana incluye los aminoácidos que constituyen la secuencia de escisión. Opcionalmente, un sustrato diana incluye un péptido que contiene la secuencia de escisión y cualquier otro aminoácido. Una proteína de longitud completa, variante alélica, isoforma o cualquier porción de la misma, que contiene una secuencia de escisión reconocida por una proteasa, es un sustrato diana para esa proteasa. Adicionalmente, un sustrato diana incluye un péptido o proteína que contiene un resto adicional que no afecta la escisión del sustrato por una proteasa. Por ejemplo, un sustrato diana puede incluir un péptido de cuatro aminoácidos o una proteína de longitud completa unida químicamente a un resto fluorogénico.

40 Como se usa en este documento, escisión se refiere a la rotura de enlaces peptídicos por una proteasa. El motivo del sitio de escisión para una proteasa implica residuos del extremo N y C con respecto al enlace escindible (los sitios sin cebar y cebados, respectivamente, definiéndose el sitio de escisión para una proteasa ... P3-P2-P1-P1'-P2'-P3' ..., y la escisión se produce entre los residuos P1 y P1'). Normalmente, la escisión de un sustrato es una escisión activadora o una escisión inhibidora. Una escisión activadora se refiere a la escisión de un polipéptido de una forma inactiva a una forma activa. Esto incluye, por ejemplo, la escisión de un zimógeno en una enzima activa, y/o escisión de un factor de procrecimiento en un factor de crecimiento activo. Por ejemplo, MT-SP1 puede auto-activarse escindiendo un sustrato diana en la secuencia P1-P4 de RQAR. Una escisión activadora también es la escisión por la que una proteína se escinde en una o más proteínas que por sí mismas tienen actividad. Por ejemplo, la escisión activadora se produce en el sistema de complemento, que es una cascada irreversible de acontecimientos de escisión proteolítica cuya terminación produce la formación de múltiples moléculas efectoras que estimulan la inflamación, facilitan la fagocitosis de antígenos y lisan algunas células directamente.

50 Como se usa en este documento, una escisión inhibidora es la escisión de una proteína en uno o más productos de degradación que no son funcionales. La escisión inhibidora produce la disminución o reducción de una actividad de una proteína. Normalmente, una reducción de una actividad de una proteína reduce la vía o proceso por el que participa la proteína. En un ejemplo, la escisión de una cualquiera o más proteínas diana tal como, por ejemplo, un VEGFR, que es una escisión inhibidora produce la reducción o inhibición concomitante de una cualquiera o más funciones o actividades del sustrato diana. Por ejemplo, para la escisión de un VEGFR, las actividades que pueden inhibirse incluyen, pero no se limitan a, unión a ligando, actividad de cinasa o actividad angiogénica tal como actividad angiogénica *in vivo* o *in vitro*. Para ser inhibidora, la escisión reduce la actividad al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99,9% o más en comparación con una forma nativa de la proteína. La escisión en porcentaje de una proteína que se requiere para que la escisión sea inhibidora varía entre proteínas, pero puede determinarse ensayando una actividad de la proteína.

60 Como se usa en este documento, un polipéptido de proteasa es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una cualquiera de las proteasas candidatas, o proteasas variantes de las mismas descritas en este documento.

Como se usa en este documento, una “proteasa modificada” o “muteína proteasa” se refiere a un polipéptido de proteasa (proteína) que tiene una o más modificaciones en la secuencia primaria en comparación con una proteasa natural o molde. La una o más mutaciones pueden ser uno o más reemplazos de aminoácidos (sustituciones), inserciones, deleciones y cualquier combinación de las mismas. Un polipéptido de proteasa modificado incluye aquellos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más posiciones modificadas. Una proteasa modificada puede ser una proteasa de longitud completa, o puede ser una porción catalíticamente activa de la misma de una proteasa de longitud completa modificada en tanto que la proteasa modificada sea proteolíticamente activa. Generalmente, estas mutaciones cambian la especificidad y actividad de las proteasas naturales o molde para la escisión de uno cualquiera o más sustratos diana deseados o predeterminados. Además de contener modificaciones en regiones que alteran la especificidad por sustrato de una proteasa, una proteasa modificada también puede tolerar otras modificaciones en regiones que no son esenciales para la especificidad por sustrato de una proteasa. Por tanto, una proteasa modificada normalmente tiene el 60%, 70%, 80 %, 85%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencias con una secuencia de aminoácidos correspondiente de una proteasa natural o estructural. Una proteasa de longitud completa modificada o una porción catalíticamente activa de la misma de una proteasa modificada puede incluir proteasas que son proteínas de fusión en tanto que la propia fusión no altere la especificidad por sustrato de una proteasa.

Como se usa en este documento, numeración de la quimotripsina se refiere a la numeración de aminoácidos de un polipéptido de quimotripsina maduro de SEC ID N°: 391. El alineamiento de una proteasa de la familia de las quimotripsinas (es decir, u-PA, t-PA, MT-SP1, y otros), que incluye el dominio de proteasa, puede hacerse con quimotripsina. En un caso tal, a los aminoácidos de la proteasa que se corresponden con los aminoácidos de la quimotripsina se les da la numeración de los aminoácidos de la quimotripsina. Un experto en la materia puede determinar posiciones correspondientes por tal alineamiento usando alineamientos manuales o usando los numerosos programas de alineamiento disponibles (por ejemplo, BLASTP). Las posiciones correspondientes también pueden basarse en alineamientos estructurales, por ejemplo, usando alineamientos simulados por ordenador de la estructura de proteínas. La recitación de que los aminoácidos de un polipéptido se corresponden con los aminoácidos en una secuencia desvelada se refiere a los aminoácidos identificados tras el alineamiento del polipéptido con la secuencia desvelada para maximizar la identidad u homología (en la que los aminoácidos conservados están alineados) usando un algoritmo de alineamiento convencional tal como el algoritmo GAP. Por ejemplo, tras el alineamiento de u-PA con el aminoácido del polipéptido de quimotripsina maduro, C168 se alinea en la secuencia del precursor de u-PA expuesta en SEC ID N°: 191 con el aminoácido C1 del polipéptido de quimotripsina maduro. Por tanto, el aminoácido C168 en u-PA también es C1 basándose en la numeración de la quimotripsina. Usando un patrón de numeración de la quimotripsina tal, el aminoácido L244 en la secuencia de u-PA del precursor expuesta en SEC ID N°: 191 es el mismo que L73 basándose en la numeración de la quimotripsina y el aminoácido 1260 es el mismo que 189 basándose en la numeración de la quimotripsina. En otro ejemplo, tras el alineamiento del dominio de la serina proteasa MT-SP1 (correspondiente a los aminoácidos 615 a 855 en SEC ID N°: 253) con quimotripsina madura, V en la posición 615 en MT-SP1 se facilita por la numeración de la quimotripsina de V16. Aminoácidos posteriores se enumeran consiguientemente. Por tanto, un F en la posición de aminoácido 708 de MT-SP1 de longitud completa (SEC ID N°: 253) se corresponde con F99 basándose en la numeración de la quimotripsina. Si existe un residuo en una proteasa, pero no está presente en la quimotripsina, el residuo de aminoácido se facilita por una notación de una letra. Por ejemplo, los residuos en quimotripsina que son parte de un bucle con el aminoácido 60 basado en la numeración de la quimotripsina, pero que están insertados en la secuencia de MT-SP1 en comparación con la quimotripsina, se denominan en lo sucesivo, por ejemplo, Asp60b o Arg60c.

Como se usa en este documento, especificidad por un sustrato diana se refiere a una preferencia para la escisión de un sustrato diana por una proteasa en comparación con otro sustrato, denominado en lo sucesivo un sustrato no diana. La especificidad se refleja en la constante de velocidad de segundo orden o constante de especificidad (k_{cat}/K_m), que es una medida de la afinidad de una proteasa por su sustrato y la eficiencia de la enzima.

Como se usa en este documento, una constante de especificidad para la escisión es (k_{cat}/K_m), en la que K_m es la constante de Michaelis-Menten ($[S]$ a la mitad de $V_{máx}$) y K_{cat} es $V_{máx}/[E_T]$ en la que E_T es la concentración de enzima final. Los parámetros k_{cat} , K_m y k_{cat}/K_m pueden calcularse representando la inversa de la concentración del sustrato frente a la inversa de la velocidad de escisión del sustrato, y ajustando a la ecuación de Lineweaver-Burk ($1/velocidad = (K_m/V_{máx})(1/[S]) + 1/V_{máx}$; en la que $V_{máx} = [E_T]k_{cat}$). Cualquier procedimiento para determinar la tasa de aumento de la escisión con el tiempo en presencia de diversas concentraciones de sustrato puede usarse para calcular la constante de especificidad. Por ejemplo, un sustrato está ligado a un resto fluorogénico que se libera tras la escisión por una proteasa. Determinando la tasa de escisión a diferentes concentraciones de enzima, k_{cat} puede determinarse para una proteasa particular. La constante de especificidad puede usarse para determinar las preferencias específicas de sitio de un aminoácido en uno cualquiera o más de los sitios S1-S4 de una proteasa para un aminoácido P1-P4 concomitante en un sustrato usando procedimientos convencionales en la materia, tales como una biblioteca combinatoria de cribado posicional (PS-SCL). Adicionalmente, la constante de especificidad también puede usarse para determinar la preferencia de una proteasa por un sustrato diana con respecto a otro sustrato.

Como se usa en este documento, una relación de especificidad por sustrato es la relación de las constantes de especificidad y puede usarse para comparar especificidades de dos o más proteasas o una proteasa por dos

sustratos más. Por ejemplo, la especificidad por sustrato de una proteasa por sustratos competentes o de proteasas competentes por un sustrato puede compararse comparando k_{cat}/K_m . Por ejemplo, una proteasa que tiene una constante de especificidad de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para un sustrato diana y $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para un sustrato no diana es más específica por el sustrato diana. Usando las constantes de especificidad de antes, la proteasa tiene una relación de especificidades por sustrato de 100 por la proteasa diana.

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

Como se usa en este documento, especificidad alterada se refiere a un cambio en la especificidad por sustrato de una proteasa modificada o seleccionada en comparación con una proteasa natural o molde de partida. Generalmente, el cambio en la especificidad es un reflejo del cambio en la preferencia de una proteasa modificada por un sustrato diana en comparación con un sustrato natural de la proteasa molde (denominado en lo sucesivo en este documento un sustrato no diana). Normalmente, las proteasas modificadas o proteasas seleccionadas proporcionadas en este documento presentan un aumento de la especificidad por sustrato por uno cualquiera o más secuencias de escisión predeterminadas o deseadas de una proteína diana en comparación con la especificidad por sustrato de una proteasa molde. Por ejemplo, una proteasa modificada o proteasa seleccionada que tiene un relación de especificidades por sustrato de 100 para un sustrato diana frente a un sustrato no diana presenta un aumento de 10 veces en la especificidad en comparación con una proteasa estructural con un relación de especificidades por sustrato de 10. En otro ejemplo, una proteasa modificada que tiene un relación de especificidades por sustrato de 1 en comparación con una relación de 0,1 presenta un aumento 10 de veces en la especificidad por sustrato. Para presentar el aumento de especificidad en comparación con una proteasa molde, una proteasa modificada tiene 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces o una especificidad por sustrato mayor por uno cualquiera de más de los sustratos diana predeterminados.

Como se usa en este documento, "selectividad" puede usarse indistintamente con especificidad cuando se refiere a la capacidad de una proteasa para elegir y escindir un sustrato diana de entre una mezcla de sustratos competentes. El aumento de selectividad de una proteasa por un sustrato diana en comparación con cualquier uno o más sustratos diana puede determinarse, por ejemplo, comparando las constantes de especificidad de escisión del sustratos diana por una proteasa. Por ejemplo, si una proteasa tiene una constante de especificidad de escisión de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para un sustrato diana y $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para cualquier otro de más sustratos, la proteasa es más selectiva por el primer sustrato diana.

Como se usa en este documento, actividad se refiere a una actividad o actividades funcionales de un polipéptido o porción del mismo asociado a una proteína de longitud completa (completa). Las actividades funcionales incluyen, pero no se limitan a, actividad biológica, actividad catalítica o enzimática, antigenicidad (capacidad para unirse a o competir con un polipéptido para unirse a un anticuerpo anti-polipéptido), inmunogenicidad, capacidad para formar multímeros, y la capacidad para unirse específicamente a un receptor o ligando para el polipéptido.

Como se usa en este documento, actividad catalítica o actividad de escisión se refiere a la actividad de una proteasa como se evalúa en ensayos proteolíticos *in vitro* que detectan la proteólisis de un sustrato seleccionado. La actividad de escisión puede medirse evaluando la eficiencia catalítica de una proteasa.

Como se usa en este documento, actividad hacia un sustrato diana se refiere a la actividad de escisión y/o actividad funcional, u otra medición que refleja la actividad de una proteasa en o hacia un sustrato diana. La actividad de escisión puede medirse evaluando la eficiencia catalítica de una proteasa. Para los fines en este documento, una actividad es elevada si una proteasa presenta mayor proteólisis o escisión de un sustrato diana y/o modula (es decir, activa o inhibe) una actividad funcional de una proteína de sustrato diana con respecto a la ausencia de la proteasa.

Como se usa en este documento, serina proteasa o serina endopeptidasas se refiere a una clase de peptidasas que se caracteriza por la presencia de un residuo de serina en el centro activo de la enzima. Las serina proteasas participan en una amplia gama de funciones en el cuerpo, que incluyen coagulación de la sangre, inflamación, además de enzimas digestivas en procariotas y eucariotas. El mecanismo de escisión por "serina proteasas" se basa en el ataque nucleófilo de un enlace peptídico elegido como diana por una serina. Las moléculas de cisteína, treonina o agua asociadas a aspartato o metales también pueden desempeñar esta función. Las cadenas laterales alineadas de serina, histidina y aspartato forman una tríada catalítica común a la mayoría de las serina proteasas. El sitio activo de las serina proteasas tiene forma de una hendidura a la que se une el sustrato de polipéptido. Serina proteasas a modo de ejemplo incluyen activador del plasminógeno urinario (u-PA) expuesto en SEC ID N°: 433 y MT-SP1 expuesta en SEC ID N°: 253, y porciones catalíticamente activas de los mismos, por ejemplo, el dominio de proteasa MT-SP1 (también llamado la cadena B) expuesto en SEC ID N°: 505.

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

5 Como se usa en este documento, los residuos de α -aminoácidos que se producen naturalmente son los residuos de aquellos 20 α -aminoácidos encontrados en la naturaleza que se incorporan en la proteína por el reconocimiento específico de la molécula de ARNt cargada con su codón de ARNm relacionado en seres humanos.

10 Como se usa en este documento, aminoácidos que se producen no naturalmente se refieren a aminoácidos que no están genéticamente codificados.

Como se usa en este documento, ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y análogos de los mismos que incluyen ácidos nucleicos de péptido (PNA) y mezclas de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser mono o bicatenarios. 15 Cuando se refiere a sondas o cebadores, que están opcionalmente marcados, tal como con una marca detectable, tal como una marca fluorescente o radiomarca, se contemplan moléculas monocatenarias. Tales moléculas tienen normalmente una longitud tal que su diana es estadísticamente única o de bajo número de copias (normalmente inferior a 5, generalmente inferior a 3) para sondear o cebar una biblioteca. Generalmente, una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 ó 30 nucleótidos contiguos de secuencia complementaria a o idéntica a un gen de interés. 20 Las sondas y cebadores pueden tener 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de longitud.

Como se usa en este documento, un péptido se refiere a un polipéptido que tiene 2 a 40 aminoácidos de longitud.

25 Como se usa en este documento, los aminoácidos que se producen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionadas en este documento se identifican según sus abreviaturas conocidas de tres letras o de una letra (Tabla 1). Los nucleótidos que se producen en los diversos fragmentos de ácido nucleico se designan con las designaciones convencionales de una sola letra usadas rutinariamente en la materia.

30 Como se usa en este documento, un "aminoácido" es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para los fines en este documento, los aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos que se producen naturalmente, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en los que el carbono α tiene una cadena lateral).

35 Como se usa en este documento, "residuo de aminoácido" se refiere a un aminoácido formado tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Se supone que los residuos de aminoácidos descritos en este documento están en la forma isomérica "L". Los residuos en la forma isomérica "D", que se designan así, pueden estar sustituidos por cualquier residuo de L-aminoácido en tanto que el polipéptido retenga la propiedad funcional deseada. NH_2 se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxilo de un polipéptido. De acuerdo con la 40 nomenclatura convencional de polipéptidos descrita en J. Biol. Chem., 243: 3552-3559 (1969), y adoptada por 37 del C.F.R. apartados 1.821-1.822, las abreviaturas para los residuos de aminoácidos se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1- Tabla de correspondencia

SÍMBOLO		
1 letra	3 letras	AMINOÁCIDO
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
1 letra	3 letras	
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Ácido aspártico
N	Asn	Asparaginas
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

Debe observarse que todas las secuencias de residuos de aminoácidos representadas en este documento por las fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxilo. Además, la frase “residuo de aminoácido” se define ampliamente para incluir los aminoácidos enumerados en la Tabla de correspondencia (Tabla 1) y aminoácidos modificados y usuales, tales como aquellos citados en 37 del C.F.R. apartados 1.821-1.822, e incorporados en este documento por referencia. Además, debe observarse que un guión al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace peptídico a otra secuencia de uno o más residuos de aminoácidos, a un grupo terminal amino tal como NH_2 o a un grupo terminal carboxilo tal como COOH .

Como se usa en este documento, “aminoácidos que se producen naturalmente” se refieren a los 20 L-aminoácidos que se producen en polipéptidos.

Como se usa en este documento, “aminoácido no natural” se refiere a un compuesto orgánico que tiene una estructura similar a un aminoácido natural, pero que se ha modificado estructuralmente para imitar la estructura y reactividad de un aminoácido natural. Por tanto, los aminoácidos que se producen no naturalmente incluyen, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos que se producen naturalmente e incluyen, pero no se limitan a, los D-isoestereómeros de aminoácidos. Aminoácidos no naturales a modo de ejemplo se describen en este documento y son conocidos para aquellos expertos en la materia.

Como se usa en este documento, una mezcla isocinética es una en la que las relaciones molares de los aminoácidos se han ajustado basándose en sus velocidades de reacción informadas (véase, por ejemplo, Ostresh y col., (1994) Biopolymers 34:1681).

Como se usa en este documento, una construcción de ADN es una molécula de ADN mono o bicatenaria, lineal o circular, que contiene segmentos de ADN combinados y juxtapuestos de un modo no encontrado en la naturaleza. Las construcciones de ADN existen como resultado de la manipulación humana, e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

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

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

Como se usa en este documento, el término polinucleótido significa un polímero mono o bicatenario de desoxirribonucleótidos o bases de ribonucleótidos leído del extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de una molécula de polinucleótido se facilita en este documento en términos de nucleótidos (abreviados “nt”) o pares de bases (abreviado “pb”). El término nucleótidos se usa para moléculas mono y bicatenarias en las que el contexto lo permite. Si el término se aplica a moléculas bicatenarias, se usa para denotar la longitud completa y se entenderá que es equivalente al término pares de bases. Se reconocerá por aquellos expertos en la materia que las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferenciarse ligeramente en longitud y que los extremos de las mismas pueden estar biselados; por tanto, todos los nucleótidos dentro de un molécula de polinucleótido bicatenario pueden no estar emparejados. Tales extremos sin emparejar no superarán, en general, los 20 nucleótidos de longitud.

Como se usa en este documento, “similitud” entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud

puede basarse en el grado de identidad y/u homología de secuencias de residuos y los residuos contenidos en ellas. Los procedimientos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos son conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, en un procedimiento de evaluar la similitud de secuencias, dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se alinean de un modo que da un nivel máximo de identidad entre las secuencias. “Identidad” se refiere al grado al que las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos son invariantes. El alineamiento de secuencias de aminoácidos, y hasta cierto grado de secuencias de nucleótidos, también puede tener en cuenta diferencias conservativas y/o sustituciones frecuentes en aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservativas son aquellas que preservan las propiedades fisicoquímicas de los residuos implicados. Los alineamientos pueden ser globales (alineamiento de las secuencias comparadas con respecto a la longitud completa de las secuencias y que incluyen todos los residuos) o locales (alineamiento de una parte de las secuencias que sólo incluye la región o regiones más similares).

La “identidad” por sí misma tiene un significado reconocido en la técnica y puede calcularse usando técnicas publicadas (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). Aunque existen varios procedimientos para medir la identidad entre dos polinucleótidos o polipéptidos, el término “identidad” es muy conocido para los expertos (Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988)).

Como se usa en este documento, homólogo (con respecto a secuencias de ácidos nucleicos y/o aminoácidos) significa aproximadamente superior o igual al 25% de homología de secuencias, normalmente superior o igual al 25%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de homología de secuencias; el porcentaje preciso puede especificarse si fuera necesario. Para los fines en este documento, los términos “homología” e “identidad” se usan frecuentemente indistintamente, a menos que se indique de otro modo. En general, para la determinación del porcentaje de homología o identidad, las secuencias se alinean de manera que se obtenga el apareamiento de mayor orden (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carillo y col. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por homología de secuencias, el número de aminoácidos conservados se determina por programas de algoritmos de alineamiento convencionales y pueden usarse con penalizaciones por hueco por defecto establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácidos nucleicos sustancialmente homólogas se hibridarían normalmente a rigurosidad moderada o a alta rigurosidad a lo largo de la longitud del ácido nucleico de interés. También se contemplan moléculas de ácidos nucleicos que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula de ácido nucleico de hibridación.

Si dos moléculas cualesquiera tienen o no secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos que son “idénticas” u “homólogas” al menos el 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% puede determinarse usando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa “FASTA” usando, por ejemplo, los parámetros por defecto como en Pearson y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (otros programas incluyen el paquete informático GCG (Devereux, J., y col., Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN; FASTA (Atschul, S.F., y col., J Molec Biol 215:403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carillo y col. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por ejemplo, puede usarse la función BLAST de la base de datos del Centro nacional sobre información biotecnológica para determinar la identidad. Otros programas comercialmente o públicamente disponibles incluyen el programa de DNASTar “MegAlign” (Madison, WI) y el programa “Gap” del Grupo de informática genética de la Universidad de Wisconsin (UWG) (Madison WI). La homología o la identidad en porcentaje de proteínas y/o moléculas de ácidos nucleicos puede determinarse, por ejemplo, comparando la información de secuencias usando un programa informático GAP (por ejemplo, Needleman y col. (1970) J. Mol. Biol. 48:443, como se revisa por Smith y Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2:482). Brevemente, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares dividido entre el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y col. (1986) Nucl. Acids Res. 14:6745, como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE; National Biomedical Research Foundation, pág. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para huecos extremos.

Por tanto, como se usa en este documento, el término “identidad” u “homología” representa una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de prueba y uno de referencia. Como se usa en este documento, el término “idéntico al menos el 90%” se refiere a las identidades en porcentaje del 90 al 99,99 con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos del polipéptido. La identidad a un nivel del 90% o más es indicativa del hecho de que, suponiendo fines de ejemplificación, se compara una longitud de polipéptidos de prueba y de referencia de 100

aminoácidos. No más del 10% (es decir, 10 de 100) de los aminoácidos en el polipéptido de prueba se diferencian de los del polipéptido de referencia. Pueden hacerse comparaciones similares entre polinucleótidos de prueba y de referencia. Tales diferencias pueden representarse como mutaciones puntuales al azar distribuidas sobre la longitud completa de un polipéptido, o pueden agruparse en una o más localizaciones de longitud variable hasta la máxima permisible, por ejemplo, 10/100 diferencias de aminoácidos (aproximadamente el 90% de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones, inserciones o deleciones de ácidos nucleicos o de aminoácidos. Al nivel de homologías o identidades superiores a aproximadamente el 85-90%, el resultado debería ser independiente del programa y el conjunto de parámetros del hueco; tales altos niveles de identidad pueden evaluarse fácilmente frecuentemente por alineamiento manual sin basarse en software.

Como se usa en este documento, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similitud e/o identidad) para alinear posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos. Normalmente, dos o más secuencias que están relacionadas el 50% o más de identidad están alineadas. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias que están alineadas en posiciones correspondientes y puede incluir alinear secuencias derivadas de ARN tales como EST y otros ADNc, alineados con la secuencia de ADN genómico.

Como se usa en este documento, "cebador" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede actuar de punto de iniciación de la síntesis de ADN dirigida con molde bajo condiciones apropiadas (por ejemplo, en presencia de cuatro nucleósido trifosfatos diferentes y un agente de polimerización tal como ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Se apreciará que ciertas moléculas de ácidos nucleicos pueden servir de "sonda" y de "cebador". Sin embargo, un cebador tiene un grupo hidroxilo en 3' para la extensión. Un cebador puede usarse en una variedad de procedimientos que incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transcriptasa inversa (RT)-PCR, PCR de ARN, LCR, PCR múltiplex, PCR de mango de sartén, PCR de captura, PCR de expresión, RACE en 3' y 5', PCR *in situ*, PCR mediada por ligación y otros protocolos de amplificación.

Como se usa en este documento, "par de cebadores" se refiere a un conjunto de cebadores que incluyen un cebador en 5' (en la dirección 5') que se hibrida con el extremo 5' de una secuencia que va a amplificarse (por ejemplo, por PCR) y un cebador en 3' (en la dirección 3') que se hibrida con el complemento del extremo 3' de la secuencia que va a amplificarse.

Como se usa en este documento, "se hibrida específicamente" se refiere a hibridar, por emparejamiento de bases complementarias, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) con una molécula de ácido nucleico diana. Aquellos expertos en la materia son familiares con los parámetros *in vitro* e *in vivo* que afectan la hibridación específica tales como longitud y composición de la molécula particular. Los parámetros particularmente relevantes para la hibridación *in vitro* incluyen adicionalmente temperatura de hibridación y de lavado, composición del tampón y concentración de sales. Las condiciones de lavado a modo de ejemplo para eliminar moléculas de ácidos nucleicos no específicamente unidas a alta rigurosidad son 0,1 x SSPE, 0,1% de SDS, 65°C, y a rigurosidad media son 0,2 x SSPE, 0,1% de SDS, 50°C. En la técnica se conocen condiciones de rigurosidad equivalentes. El experto puede ajustar fácilmente estos parámetros para lograr la hibridación específica de una molécula de ácido nucleico con una molécula de ácido nucleico diana apropiada para una aplicación particular.

Como se usa en este documento, sustancialmente idéntico a un producto significa suficientemente similar de manera que la propiedad de interés sea suficientemente invariable de manera que el producto sustancialmente idéntico pueda usarse en lugar del producto.

Como se usa en este documento, también se entiende que los términos "sustancialmente idéntico" o "similar" varían con el contexto como es entendido por aquellos expertos en la materia relevante.

Como se usa en este documento, una variante alélica o variación alélica se refiere a cualquiera de las dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica se produce naturalmente mediante mutación, y puede producir polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado), o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencia de aminoácidos alterada. El término "variante alélica" también se usa en este documento para denotar una proteína codificada por una variante alélica de un gen. Normalmente, la forma de referencia del gen codifica una forma natural y/o forma predominante de un polipéptido de una población o miembro de referencia único de una especie. Normalmente, las variantes alélicas, que incluyen variantes entre dos especies y entre especies, normalmente tienen al menos el 80%, 90% de identidad o mayor de aminoácidos con una forma natural y/o predominante de la misma especie; el grado de identidad depende del gen y si la comparación es entre especies o intraespecie. Generalmente, las variantes alélicas intraespecie tienen al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90% o el 95% de identidad o mayor con una forma natural y/o predominante que incluye el 96%, 97%, 98%, 99% de identidad o mayor con una forma natural y/o predominante de un polipéptido. La referencia a una variante alélica en este documento se refiere generalmente a variaciones de proteínas entre miembros de la misma especie.

Como se usa en este documento, "alelo", que se usa indistintamente en este documento con "variante alélica", se refiere a formas alternativas de un gen o porciones del mismo. Los alelos ocupan el mismo locus o posición en

cromosomas homólogos. Si un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homocigótico para ese gen o alelo. Si un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterocigótico para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferenciarse entre sí en un único nucleótido o varios nucleótidos, y pueden incluir sustituciones, deleciones e inserciones de nucleótidos. Un alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.

Como se usa en este documento, variantes de especies se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, que incluyen especies de mamíferos diferentes tales como ratón y ser humano.

Como se usa en este documento, una variante de corte y empalme se refiere a una variante producida por procesamiento diferencial de un transcrito primario de ADN genómico que produce más de un tipo de ARNm.

Como se usa en este documento, modificación es en referencia a la modificación de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico e incluye deleciones, inserciones y reemplazos de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Los procedimientos de modificación de un polipéptido son rutina para aquellos expertos en la materia, tal como usando metodologías de ADN recombinante.

Como se usa en este documento, un peptidomimético es un compuesto que imita la conformación y ciertas características estereoquímicas de la forma biológicamente activa de un péptido particular. En general, los peptidomiméticos se diseñan para imitar ciertas propiedades deseables de un compuesto, pero no las propiedades no deseables, tales como flexibilidad, que conducen a una pérdida de una conformación biológicamente activa y a la rotura de enlaces. Los peptidomiméticos pueden prepararse a partir de compuestos biológicamente activos reemplazando ciertos grupos o enlaces que contribuyen a las propiedades no deseables con bioisómeros. Los bioisómeros son conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, el bioisómero de metileno CH₂S se ha usado como un reemplazo de amida en análogos de encefalina (véase, por ejemplo, Spatola (1983) pág. 267-357 en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Weinstein, Ed. volumen 7, Marcel Dekker, Nueva York). La morfina, que puede administrarse por vía oral, es un compuesto que es un peptidomimético del péptido endorfina. Para los fines en este documento, los péptidos cíclicos están incluidos entre los peptidomiméticos ya que son polipéptidos en los que uno o más enlaces peptídicos están sustituidos con un mimético.

Como se usa en este documento, un polipéptido que comprende un porcentaje especificado de aminoácidos expuestos en un polipéptido de referencia se refiere a la proporción de aminoácidos idénticos contiguos compartidos entre un polipéptido y un polipéptido de referencia. Por ejemplo, una isoforma que comprende el 70% de los aminoácidos expuestos en un polipéptido de referencia que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: XX, que enumera 147 aminoácidos, significa que el polipéptido de referencia contiene al menos 103 aminoácidos contiguos expuestos en las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: XX.

Como se usa en este documento, el término promotor significa una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que proporcionan la unión de ARN polimerasa y la iniciación de la transcripción. Las secuencias del promotor se encuentran comúnmente, pero no siempre, en la región no codificante 5' de genes.

Como se usa en este documento, el polipéptido o proteína aislado o purificado o porción biológicamente activa del mismo está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido del que se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Puede determinarse que las preparaciones están sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables como se ha determinado por procedimientos convencionales de análisis tales como cromatografía en capa fina (CCF), electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usados por aquellos expertos en la materia para evaluar tal pureza, o son suficientemente puras de forma que más purificación no alteraría detectablemente las propiedades físicas y químicas, tales como actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los procedimientos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros son conocidos para aquellos expertos en la materia. Sin embargo, un compuesto sustancialmente químicamente puro puede ser una mezcla de estereoisómeros. En tales casos, más purificación podría aumentar la actividad específica del compuesto.

El término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce recombinantemente. En una realización, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas de proteasa que tienen menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de proteínas de no proteasas (también denominadas en este documento proteína contaminante), generalmente menos de aproximadamente el 20% de proteínas de no proteasas o 10% de proteínas de no proteasas o menos de aproximadamente el 5% de proteínas de no proteasas. Si la proteína de proteasa o porción activa de la misma se produce recombinantemente, también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, 10% o el 5% del volumen de la preparación de la proteína de proteasa.

Como se usa en este documento, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos incluye preparaciones de proteínas de proteasa en las que la proteína se separa de precursores químicos

u otros productos químicos que participan en la síntesis de la proteína. El término incluye preparaciones de proteínas de proteasa que tienen menos de aproximadamente el 30% (en peso seco), 20%, 10%, 5% o menos de precursores químicos o productos químicos o componentes de no proteasa.

5 Como se usa en este documento, sintético, con referencia a, por ejemplo, una molécula sintética de ácido nucleico o un gen sintético o un péptido sintético se refiere a una molécula de ácido nucleico o molécula de polipéptido que se produce por procedimientos recombinantes y/o por procedimientos de síntesis química.

10 Como se usa en este documento, producción por medios recombinantes usando procedimientos de ADN recombinante significa el uso de los procedimientos muy conocidos de la biología molecular para expresar proteínas codificadas por ADN clonado.

15 Como se usa en este documento, vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se usan para introducir un ácido nucleico heterólogo en células para tanto expresión como replicación de las mismas. Los vectores normalmente permanecen episómicos, pero pueden diseñarse para efectuar la integración de un gen o porción del mismo en un cromosoma del genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales tales como cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de mamífero. La selección y el uso de tales vehículos son muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

20 Como se usa en este documento, un vector de expresión incluye vectores que pueden expresar ADN que está operativamente ligado a secuencias reguladoras tales como regiones del promotor que pueden efectuar la expresión de tales fragmentos de ADN. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias del promotor y del terminador, y opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores de selección, un potenciador, una señal de poliadenilación y similares. Los vectores de expresión se derivan generalmente de ADN
25 de plásmido y vírico, o pueden contener elementos de ambos. Por tanto, un vector de expresión se refiere a un ADN recombinante o construcción de ARN tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otro vector que, tras la introducción en una célula huésped apropiada, produce la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son muy conocidos para aquellos expertos en la materia e incluyen aquellos que son replicables en células eucariotas y/o células procariotas y aquellos que permanecen episómicos o aquellos que se integran en el
30 genoma de la célula huésped.

Como se usa en este documento, vector también incluye "vectores de virus" o "vectores víricos". Los vectores víricos son virus manipulados por ingeniería que están operativamente ligados a genes exógenos para transferir (como vehículos o lanzaderas) los genes exógenos en células.

35 Como se usa en este documento, un adenovirus se refiere a cualquiera de un grupo de virus que contienen ADN que producen conjuntivitis e infecciones del tracto respiratorio superior en seres humanos. Como se usa en este documento, ADN desnudo se refiere a ADN libre de histona que puede usarse para vacunas y terapia génica. El ADN desnudo es el material genético que pasa de célula a célula durante un procedimiento de transferencia de genes llamado transformación. En la transformación, el ADN purificado o desnudo es recogido por la célula receptora que dará a la célula receptora una nueva característica o fenotipo.

40 Como se usa en este documento, operablemente u operativamente ligado cuando se refiere a segmentos de ADN significa que los segmentos están dispuestos de manera que funcionan coordinados para sus fines previstos, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y avanza por el segmento codificante al terminador.

45 Como se usa en este documento, secuencia de unión a proteína se refiere a una secuencia de proteínas o de péptidos que puede unirse específicamente a otras secuencias de proteínas o de péptidos, generalmente a un conjunto de secuencias de proteínas o de péptidos o a una secuencia de proteínas o de péptidos particular.

50 Como se usa en este documento, marca de epítipo se refiere a un estiramiento corto de residuos de aminoácidos correspondientes a un epítipo para facilitar el posterior análisis bioquímico e inmunológico de la proteína o péptido marcado con epítipo. El marcado con epítipo se logra añadiendo la secuencia de la marca de epítipo a una secuencia codificante de proteínas en un vector de expresión apropiado. Las proteínas marcadas con epítipo
55 pueden purificarse por afinidad usando anticuerpos altamente específicos producidos contra las marcas.

Como se usa en este documento, la secuencia de unión a metal se refiere a una secuencia de proteínas o de péptidos que puede unirse específicamente a iones metálicos, generalmente a un conjunto de iones metálicos o a un ión metálico particular.

60 Como se usa en este documento, el término evaluar pretende incluir la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtener un valor absoluto para la actividad de una proteasa, o un dominio de la misma, presente en la muestra, y también de obtener un índice, relación, porcentaje, valor visual u otro valor indicativo del nivel de actividad. La evaluación puede ser directa o indirecta, y la especie química detectada en realidad no necesita ser por supuesto el propio producto de proteólisis pero puede ser, por ejemplo, un derivado del mismo o alguna otra sustancia. Por ejemplo, la detección de un producto de escisión de una proteína del complemento tal como por SDS-
65 PAGE y tinción de proteínas con azul de Coomassie.

Como se usa en este documento, actividad biológica se refiere a las actividades *in vivo* de un compuesto o respuestas fisiológicas que resultan tras la administración *in vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla. Por tanto, la actividad biológica engloba efectos terapéuticos y actividad farmacéutica de tales compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas pueden observarse en sistemas *in vitro* diseñados para probar o usar tales actividades. Por tanto, para los fines en este documento, una actividad biológica de una proteasa es su actividad catalítica en la que se hidroliza un polipéptido.

Como se usa en este documento, equivalente, cuando se refiere a dos secuencias de ácidos nucleicos, significa que las dos secuencias en cuestión codifican la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Si se usa equivalente con referencia a dos proteínas o péptidos significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con sólo sustituciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad o función de la proteína o péptido. Si equivalente se refiere a una propiedad, la propiedad no necesita estar presentes al mismo grado (por ejemplo, dos péptidos pueden presentar diferentes tasas del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades son normalmente sustancialmente las mismas. Complementarias, cuando se refiere a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos pueden hibridarse, normalmente con menos del 25%, 15% o el 5% de desapareamientos, entre nucleótidos opuestos. Si fuera necesario se especificaría el porcentaje de complementariedad. Normalmente, las dos moléculas se seleccionan de forma que se hibriden en condiciones de alta rigurosidad.

Como se usa en este documento, un agente que modula la actividad de una proteína o expresión de un gen o ácido nucleico tanto disminuye o aumenta como altera de otro modo la actividad de la proteína o, de algún modo, regula por incremento o por disminución o altera de otro modo la expresión del ácido nucleico en una célula.

Como se usa en este documento, un efecto farmacéutico o efecto terapéutico se refiere a un efecto observado tras la administración de un agente previsto para el tratamiento de una enfermedad o trastorno o para la mejora de los síntomas de la misma.

Como se usa en este documento, “modular” y “modulación” o “alterar” se refieren a un cambio de una actividad de una molécula tal como una proteína. Actividades a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, actividades biológicas tales como transducción de señales. La modulación puede incluir un aumento en la actividad (es decir, regulación por incremento o actividad agonista), una disminución en la actividad (es decir, regulación por disminución o inhibición) o cualquier otra alteración en una actividad (tal como un cambio en la periodicidad, frecuencia, duración, cinética u otro parámetro). La modulación puede depender del contexto y la modulación se compara normalmente con un estado designado, por ejemplo, la proteína natural, la proteína en un estado constitutivo o la proteína como se expresa en un tipo de célula designado o afección.

Como se usa en este documento, inhibir e inhibición se refieren a una reducción en una actividad con respecto a la actividad sin inhibir.

Como se usa en este documento, una composición se refiere a cualquier mezcla. Puede ser una disolución, suspensión, líquido, polvo, pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa en este documento, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o más artículos. La combinación puede ser dos o más artículos separados tales como dos composiciones o dos conjuntos, puede ser una mezcla de los mismos tales como una única mezcla de los dos o más artículos, o cualquier variación de los mismos. Los elementos de una combinación están generalmente funcionalmente asociados o relacionados. Un kit es una combinación envasada que opcionalmente incluye instrucciones para el uso de la combinación o elementos de la misma.

Como se usa en este documento, “enfermedad o trastorno” se refiere a una afección patológica en un organismo resultante de una causa o afección que incluyen, pero no se limitan a, infecciones, afecciones adquiridas, afecciones genéticas, y caracterizados por síntomas identificables. Las enfermedades y trastornos de interés en este documento son aquellos que implican activación de complemento, que incluyen aquellos mediados por activación de complemento y aquellos en los que la activación del complemento desempeña una función en la etiología o patología. Las enfermedades y trastornos también incluyen aquellos que se producen por la ausencia de una proteína tal como una inmunodeficiencia, y de interés en este documento son aquellos trastornos en los que no se produce la activación del complemento debido a una deficiencia en una proteína del complemento.

Como se usa en este documento, “tratar” un sujeto con una enfermedad o afección significa que los síntomas del sujeto están parcialmente o totalmente aliviados, o permanecen estáticos tras el tratamiento. Por tanto, el tratamiento engloba profilaxis, terapia y/o cura. La profilaxis se refiere a prevenir una posible enfermedad y/o una prevención del empeoramiento de síntomas o progresión de una enfermedad. El tratamiento también engloba cualquier uso farmacéutico de un interferón modificado y composiciones proporcionadas en este documento.

Como se usa en este documento, un agente terapéutico, pauta terapéutica, radioprotector o agente quimioterapéutico significan fármacos y farmacoterapias convencionales que incluyen vacunas que son conocidas

para aquellos expertos en la materia. Los agentes radioterapéuticos son muy conocidos en la técnica.

Como se usa en este documento, tratamiento significa cualquier modo en el que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación mejoran o se alteran beneficiosamente de otro modo.

5 Como se usa en este documento, efecto terapéutico significa un efecto resultante del tratamiento de un sujeto que altera, normalmente mejora, los síntomas de una enfermedad o afección o que cura una enfermedad o afección. Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de una composición, molécula o compuesto que produce un efecto terapéutico tras la administración a un sujeto.

10 Como se usa en este documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, que incluye un mamífero tal como un ser humano.

15 Como se usa en este documento, un paciente se refiere a un sujeto humano.

Como se usa en este documento, mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno particular por un tratamiento, tal como por administración de una composición farmacéutica u otro agente terapéutico, se refiere a cualquier disminución, tanto permanente como temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que pueden atribuirse a o asociarse a la administración de la composición o agente terapéutico.

20 Como se usa en este documento, prevención o profilaxis se refiere a procedimientos en los que se reduce el riesgo de desarrollar enfermedad o afección.

25 Como se usa en este documento, una cantidad eficaz es la cantidad de un agente terapéutico necesaria para prevenir, curar, mejorar, detener o detener parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

30 Como se usa en este documento, la administración de una proteasa, tal como una proteasa modificada, se refiere a cualquier procedimiento en el que la proteasa se pone en contacto con su sustrato. La administración puede efectuarse *in vivo* o *ex vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, para administración *ex vivo*, un fluido corporal tal como sangre se extrae de un sujeto y se pone en contacto fuera del cuerpo con la proteasa de no complemento modificada. Para administración *in vivo*, la proteasa modificada puede introducirse en el cuerpo, tal como por vías locales, tópicas, sistémicas y/u otras vías de introducción. La administración *in vitro* engloba procedimientos tales como procedimientos de cultivo celular.

35 Como se usa en este documento, forma de dosis unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente como se conoce en la técnica.

40 Como se usa en este documento, una formulación de dosificación unitaria se refiere a una formulación para administración directa.

Como se usa en este documento, un "artículo de fabricación" es un producto que se hace y se vende. Como se usa en toda la presente solicitud, el término pretende englobar polipéptidos de proteasas modificados y ácidos nucleicos contenidos en los artículos de envasado.

45 Como se usa en este documento, fluido se refiere a cualquier composición que puede fluir. Por tanto, los fluidos engloban composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, disoluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones tales.

50 Como se usa en este documento, un "kit" se refiere a una combinación de un polipéptido de proteasa modificado o molécula de ácido nucleico proporcionado en este documento y otro artículo para un fin que incluye, pero no se limita a, administración, diagnóstico y evaluación de una actividad o propiedad biológica. Los kits incluyen opcionalmente instrucciones para su uso.

55 Como se usa en este documento, un extracto o lisado celular se refiere a una preparación o fracción que se prepara a partir de un célula lisada o rota.

60 Como se usa en este documento, animal incluye cualquier animal tal como, pero no se limita a, primates que incluyen seres humanos, gorilas y monos; roedores tales como ratones y ratas; aves tal como pollos; rumiantes tales como cabras, vacas, ciervos, ovejas; ovino tal como cerdos y otros animales. Animales no humanos excluyen seres humanos como el animal contemplado. Las proteasas proporcionadas en este documento son de cualquier fuente, animal, vegetal, procariota y fúngica. La mayoría de las proteasas son de origen animal, que incluyen de origen mamífero.

65 Como se usa en este documento, un control se refiere a una muestra que es sustancialmente idéntica a la muestra de prueba, excepto que no está tratada con un parámetro de prueba o, si es una muestra de plasma, puede ser de un voluntario normal no afectado con la afección de interés. Un control también puede ser un control interno.

Como se usa en este documento, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, referencia a compuesto que comprende “un dominio extracelular” incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

- 5 Como se usa en este documento, los intervalos y cantidades pueden expresarse como “aproximadamente” un valor o intervalo particular. Aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por tanto, “aproximadamente 5 bases” significa “aproximadamente 5 bases” y también “5 bases”.

- 10 Como se usa en este documento, “opcional” u “opcionalmente” significa que el acontecimiento o circunstancia posteriormente descrito se produce o no se produce, y que la descripción incluye casos en los que dicho acontecimiento o circunstancia se produce y casos en los que no. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo está sin sustituir o está sustituido.

- 15 Como se usa en este documento, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácido y otros compuestos están, a menos que se indique de otro modo, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas o la IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (véase, (1972) *Biochem.* 11:1726).

B. PROCEDIMIENTO PARA EL CRIBADO PROTEASAS

- 20 Se describen procedimientos para cribar proteasas con propiedades alteradas, particularmente especificidad y selectividad por sustrato. Los procedimientos también proporcionan proteasas alteradas tales que presentan actividad sustancialmente invariable o con actividad suficiente para un uso terapéutico. Los procedimientos descritos en este documento pueden emplearse con cualquier procedimiento para la modificación de proteasas y el diseño de proteasas modificadas. Tales procedimientos incluyen procedimientos al azar para producir bibliotecas, el uso de bibliotecas existentes y también procedimientos de evolución dirigida

- Se ha empleado una variedad de esquemas de selección para identificar proteasas que tienen especificidad/selectividad por sustrato alterada, pero cada uno tiene limitaciones. Los procedimientos descritos en este documento vencen tales limitaciones. Generalmente, los esquemas de selección incluyen aquellos que 1) seleccionan la unión de proteasas o 2) seleccionan la catálisis de proteasas. Ejemplos de estrategias que aprovechan la unión de proteasas incluyen, por ejemplo, el uso de análogos de estado de transición (TSA) y aquellos que emplean sustratos suicida de moléculas pequeñas. Un TSA es un compuesto estable que imita las características electrónicas y estructurales del estado de transición de una proteasa: reacción de sustrato. La interacción más fuerte entre una proteasa y el sustrato normalmente se produce en el estado de transición de una reacción. Un TSA se emplea como sustrato modelo para seleccionar proteasas con alta afinidad de unión. Un TSA nunca es un mimético perfecto de un estado de transición verdadero y sus síntesis son difíciles (Bertschinger y col. (2005) en *Phage display in Biotech. and Drug Discovery* (Sidhu S, ed), pág. 461-491). Una estrategia tal ha identificado variantes de proteasa con especificidad por sustrato alterada, pero tales proteasas presentan generalmente actividad reducida debido a que un requisito para la catálisis de proteasas no es parte del esquema de selección.

- En una estrategia alternativa se han usado sustratos suicida de moléculas pequeñas (también llamados inhibidores basados en mecanismo) para seleccionar proteasas basándose en la unión. Tales sustratos suicida normalmente son inhibidores de moléculas pequeñas que se unen covalentemente al sitio activo de una enzima. Estos sustratos suicida contienen un electrófilo reactivo que reacciona con enzimas nucleófilas para formar un enlace covalente. La escisión de un enlace peptídico natural por la proteasa no se requiere para esta reacción. Normalmente, tales inhibidores producen electrófilos reactivos sólo tras la unión con la enzima correcta y realizando etapas catalíticas normales (véase, por ejemplo, Bertschinger y col. (2005) en *Phage display in Biotech. and Drug Discovery* (Sidhu S, ed), pág. 461-491). En muchos casos, el inhibidor del sustrato imita la conformación del primer estado de transición que participa en la catálisis, pero no permite la completitud del ciclo catalítico. Como resultado, el uso de tales inhibidores selecciona eficazmente la fuerte unión en lugar de la catálisis y produce la selección de enzima inactivas con disociación alterada del sustrato (Droge y col. (2006) *ChemBioChem*, 7:149-157). Por tanto, debido a su tamaño y a la falta de necesidad de la escisión del sustrato, no se repite la interacción de una proteasa con un sustrato de proteína natural.

- 55 También se ha intentado una estrategia de selección de proteasas que selecciona la catálisis en lugar de la unión (véase, por ejemplo, Heinis y col. (2001), *Protein Engineering*, 14: 1043-1052). Una de las principales limitaciones en el ensayo para la catálisis es que los productos de reacción difunden rápidamente después de completarse la reacción dificultando el aislamiento de la enzima catalíticamente activa. Por consiguiente, las estrategias que seleccionan la catálisis se basan en anclar el sustrato y la enzima a fago de forma que estén en estrecha proximidad. Por ejemplo, se ha usado la proteína calmodulina como agente de inmovilización (Demartis (1999) *J Mol. Biol.*, 286:617-633). Los sustratos de reacción no están covalentemente anclados a enzimas de fago marcadas con calmodulina usando derivados de péptidos de unión a calmodulina. Tras la catálisis, el fago que expone el producto de reacción se aísla del fago no catalíticamente activo usando reactivos de afinidad anti-producto. Sin embargo, como el sustrato está unido a la partícula de fago, la reacción de catálisis puede impedirse. Por tanto, estos y otros procedimientos de selección de proteasas sufren limitaciones y no identifican proteasas con

especificidad alterada y sustancialmente invariable con suficiente actividad para aplicaciones terapéuticas. Los procedimientos descritos en este documento tratan estas limitaciones.

En este documento se describen procedimientos de selección de proteasas para identificar proteasas y/o proteasa variantes con especificidad por sustrato alterada, optimizada o mejorada. Tales proteasas se identifican para la optimización y el uso como proteasas terapéuticas que pueden escindir e inactivar (o activar) dianas de proteína deseadas tales como, por ejemplo, dianas de proteína que participan en la etiología de una enfermedad o trastorno. En los procedimientos para el cribado de proteasas descritos en este documento, las proteasas candidatas son capturadas como complejos intermedios estables de la reacción enzimática de proteasas, y luego se identifican. Los complejos intermedios estables son normalmente complejos covalentes u otros complejos que permiten la separación de los mismos de moléculas no complejadas. Tales productos intermedios incluyen, por ejemplo, un producto intermedio de acil-enzima que permite la captura y en última instancia la identificación de las proteasas que tienen una especificidad por sustrato seleccionada o predeterminada. La captura (atrapamiento) de la proteasa se efectúa poniendo en contacto un conjunto de proteasas con un polipéptido de captura de proteasas que es escindido por la proteasa y, tras la escisión, forma el complejo estable. A modo de ejemplo de tales polipéptidos de captura de proteasas son serpinas, alta-2-macroglobulina y otras moléculas tales. El polipéptido de captura de proteasas puede producirse naturalmente y/o puede modificarse para seleccionar un sustrato diana particular.

En la práctica de los procedimientos, los conjuntos de proteasas, normalmente proteasas modificadas o mutantes y/o conjuntos de proteasas naturales, se ponen en contacto con un polipéptido de captura de proteasas que reacciona con la proteasa tras la escisión del sustrato para formar el complejo que contiene el producto intermedio atrapado. Estos procedimientos pueden usarse para identificar proteasas que tienen una especificidad/selectividad por sustrato deseada. Para lograr la identificación de proteasas que tienen una especificidad/selectividad por sustrato deseada, la secuencia de aminoácidos del enlace escindible, y/o secuencias de alrededor en el sitio reactivo tales como la secuencia del bucle reactivo o secuencia análoga, pueden modificarse en el polipéptido de captura de proteasas para imitar la secuencia de escisión del sustrato de un sustrato diana deseado.

La reacción de cribado se realiza poniendo en contacto un conjunto de proteasas con el polipéptido de captura de proteasas en condiciones en las que se forman complejos estables, normalmente complejos covalentes. Los complejos son de estabilidad suficiente para permitir su separación de otros complejos menos estables y polipéptidos de captura de proteasas sin reaccionar.

Los polipéptidos de captura de proteasas pueden marcarse de forma identificable o marcarse por afinidad para facilitar la identificación de complejos. Por ejemplo, el marcado de los polipéptidos de captura de proteasas, tales como por un resto fluorescente, marca de afinidad u otro agente de marcado tal facilita el aislamiento del complejo de proteasa-inhibidor y la identificación de la proteasa seleccionada. Las proteasas seleccionadas pueden analizarse para actividad para evaluar la eficiencia proteolítica y especificidad por sustrato. Las proteasas identificadas o seleccionadas también pueden identificarse, tal como por secuenciación u otro protocolo de identificación, incluyendo procedimientos de espectrometría de masas, o por otros procedimientos de marcado para identificar proteasas seleccionadas en los complejos.

Los procedimientos descritos en este documento también incluyen etapas opcionales de cribado iterativo de forma que el procedimiento pueda realizarse una vez, o pueda realizarse en múltiples rondas en proteasas de una especificidad/selectividad y/o actividad de escisión deseada o predeterminada. Por ejemplo, la selección de proteasas puede incluir modificar al azar o empíricamente o sistemáticamente la proteasa seleccionada (en regiones elegidas como diana y/o a lo largo de la longitud) y repetir (en una, dos, tres, cuatro o más rondas) el procedimiento de poner en contacto las proteasas junto con uno o más polipéptidos de captura de proteasas.

Los procedimientos descritos en este documento pueden multiplexarse, tal como incluyendo dos o más polipéptidos de captura de proteasas diferencialmente marcados o diferencialmente identificables.

En los procedimientos descritos en este documento no es necesario que el polipéptido de captura de proteasas presente el 100% o incluso una eficiencia muy alta en la reacción de complejación en tanto que al menos un porcentaje detectable, normalmente al menos el 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más, pueda formar un complejo estable que pueda separarse o identificarse de otro modo de entre complejos menos estables o polipéptidos de captura de proteasas sin reaccionar. Por tanto, pueden seleccionarse proteasas en las que el reparto se produce en la reacción en la que hay el 100% de inhibición por el polipéptido de captura de proteasas tal como, por ejemplo, el 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más de inhibición de reacción catalizada por proteasa. En los procedimientos descritos en este documento, la rigurosidad de la selección y otros parámetros pueden modularse, tal como controlando el tiempo de reacción, temperatura, pH, fuerza iónica y/o biblioteca y concentraciones de sustrato. Las limitaciones de la especificidad también pueden modularse durante la selección incluyendo competidores tales como, por ejemplo, competidores específicos que contienen una secuencia de escisión del sustrato no deseada o clases más anchas de competidores tales como, por ejemplo, plasma humano.

El procedimiento descrito en este documento también puede realizarse poniendo en contacto un conjunto de proteasas con un polipéptido de captura de proteasas o mezclas de diferentes polipéptidos de captura de proteasas tal como multiplexando. Si se usa una pluralidad de diferentes polipéptidos de captura de proteasas, cada polipéptido de captura de proteasas puede marcarse individualmente y de forma distinta de manera que pueda detectarse de forma identificable. Un procedimiento tal permite el aislamiento y la identificación de múltiples proteasas de un conjunto de proteasas en una única reacción.

Los procedimientos descritos en este documento permiten cribar conjuntos de proteasas de una vez para identificar aquellos que tiene una especificidad por sustrato deseada o predeterminada. Los conjuntos de proteasas incluyen cualquier conjunto de proteasas, que incluye conjuntos de diversas proteasas naturales, proteasas modificadas, mezclas de las mismas, y también porciones proteolíticamente activas de las mismas. Puede emplearse cualquier conjunto. Los conjuntos también pueden prepararse como un conjunto de proteasas mutantes, o porciones proteolíticamente activas de las mismas que contienen la mutación. Tales conjuntos incluyen conjuntos combinatorios en los que los miembros en el conjunto contienen diversas mutaciones. La mutación puede ser aleatoria a lo largo de la longitud de una proteasa (o porción catalíticamente activa de la misma) o puede elegirse como diana para una posición o región particular tal como, por ejemplo, el sitio de unión de especificidad de la proteasa. Los procedimientos descritos en este documento pueden identificar y descubrir residuos de no contacto que previamente no se ha apreciado que participan como determinantes de la especificidad (es decir, residuos enterrados). Por tanto, los procedimientos de tecnología de selección de proteasas descritos en este documento pueden usarse para crear proteasas con especificidades y actividades completamente nuevas y/o para optimizar la especificidad o actividad de un indicio de proteasa existente.

C. POLIPÉPTIDOS DE CAPTURA DE PROTEASAS

Un polipéptido de captura de proteasas usado en los procedimientos descritos en este documento es un polipéptido o una porción de polipéptido que contiene un sitio reactivo que sirve de sustrato para una proteasa que tras la escisión produce la formación de un complejo intermedio de proteasa-sustrato que es estable. Generalmente, un polipéptido de captura de proteasas tal es uno que requiere la escisión de un enlace escindible (P1-P1') por la proteasa para proporcionar la generación de un complejo de sustrato-proteasa capturado. El complejo estable es normalmente un complejo irreversible formado por las estrechas interacciones entre la proteasa y el polipéptido de captura de proteasas, tal como debido a enlaces covalentes, iónicos, hidrófobos, u otros enlaces estrechos. Como tal, el complejo es generalmente estable durante horas, días, semanas o más permitiendo así el aislamiento del complejo. En un ejemplo, el complejo intermedio estable puede ser un producto intermedio de acil-enzima que se forma tras la reacción de una serina o cisteína proteasa con un polipéptido de captura de proteasas. Más normalmente, tras la escisión del polipéptido de captura de proteasas, un cambio conformacional rápido en el complejo distorsiona la proteasa y previene la desacilación del complejo de acil-enzima. Por tanto, la inmunoadsorción de proteasas con polipéptidos de captura de proteasas permite la selección de la etapa limitante de la velocidad de la catálisis (es decir, escisión del enlace P1-P1' y acilación de la enzima), mientras que al mismo tiempo se forman complejos muy estrechos (es decir, covalentes) que se aíslan fácilmente a partir de mezclas de conjuntos.

Normalmente, tales polipéptidos de captura de proteasas son grandes (superiores a 100 aminoácidos), conteniendo proteínas de un único dominio una secuencia de sitio reactivo reconocida por una proteasa. Generalmente, la secuencia de escisión de sitio reactivo es parte de un bucle reactivo más grande que es flexible, está expuesto y es largo para hacer que sea un sustrato diana (Otlewski y col. (2005) The EMBO J. 24: 1303-1310); sin embargo, mientras que la captura de proteasas contiene una secuencia de sitio reactivo que puede escindirse por una proteasa, imitándose así la escisión del sustrato, puede usarse en los procedimientos descritos en este documento. Por tanto, cualquier polipéptido grande o polipéptido sintéticamente producido que contenga un enlace escindible escindido por una proteasa que produce el atrapamiento de una proteasa en un complejo estable a largo plazo puede usarse en los procedimientos descritos en este documento. A modo de ejemplo de tales polipéptidos de captura de proteasas son serpinas, tales como cualquiera descrita en este documento. Otros polipéptidos de captura de proteasas también pueden usarse en los procedimientos descritos en este documento, tales como cualquiera cuyo mecanismo de acción sea similar a aquellos de moléculas de serpina. Éstos incluyen, por ejemplo, moléculas similares a serpina sintéticas o recombinantemente generadas, o polipéptidos que contienen fragmentos contiguos o secuencias de una molécula de serpina que incluye una porción suficiente de un bucle del sitio reactivo de una molécula de serpina. Además, pueden usarse otros inhibidores de proteasa cuyo mecanismo de inhibición sea similar al de las serpinas tales como, por ejemplo, la proteína p35 de baculovirus que inhibe caspasas (Xu y col. (2001) Nature, 410:494-497; Otlewski y col. (2005) The EMBO J. 24: 1303-1310). Otros polipéptidos de captura de proteasas incluyen cualquiera que atrape una proteasa en un complejo estable que pueda ser fácilmente aislado tal como, pero no se limita a, alfa-2-macroglobulina.

1. SERPINAS: Estructura, función y expresión

Las serpinas (inhibidores de serina proteasas) son inhibidores de proteasas que son moléculas de proteína grandes (aproximadamente 330-500 aminoácidos) en comparación con otros inhibidores de serina proteasas que tienen normalmente aproximadamente menos de 60 aminoácidos. La superfamilia de las serpinas es la mayor y la más

ampliamente distribuida de los inhibidores de proteasas. Hasta la fecha se han identificado más de 1.500 miembros de la familia de las serpinas en una variedad de animales, poxvirus, plantas, bacterias y arqueas (Law y col. (2006) *Genome Biology*, 7:216) diferentes, habiéndose estudiado hasta ahora más de cincuenta serpinas humanas diferentes. La mayoría de las serpinas humanas se encuentran en la sangre, en la que funcionan en un amplio intervalo de funciones reguladoras que incluyen, por ejemplo, cascadas inflamatorias, de complemento, de coagulación y fibrinolíticas. Las serpinas también funcionan intracelularmente para realizar funciones citoprotectoras tales como, por ejemplo, regular la liberación inapropiada de proteasas citotóxicas. Aunque la mayoría de las serpinas tiene una función inhibidora sobre la actividad de proteasa, algunas serpinas realizan otras funciones no inhibidoras tales como, pero no se limitan a, transporte de hormonas, globulina de unión a corticosteroides y regulación de la tensión arterial (Silverman y col. (2001) *JBC*, 276: 33293-33296). Entre las serpinas no inhibidoras están las globulinas de unión a esteroides y la albúmina de huevo. Normalmente, las serpinas inhiben la acción de serina proteasas, aunque se ha identificado que varias serpinas son inhibidores de cisteína proteasas similares a papaína o caspasas (Whisstock y col. (2005) *FEBS Journal*, 272: 4868-4873).

La identidad de secuencias entre los miembros de la familia de las serpinas es débil; sin embargo, sus estructuras están altamente conservadas. Por ejemplo, los miembros de la familia de las serpinas comparten aproximadamente el 30% de homología de secuencias de aminoácidos con la serpina alfa-1-antitripsina y tienen una estructura terciaria conservada. Estructuralmente, las serpinas están constituidas por tres hojas β (A, B y C) y 8-9 hélices α (A-I) que están organizadas en un dominio de barril β superior y un dominio helicoidal inferior. Los dos dominios están unidos por puentes por la hoja β de cinco cadenas, que es la principal característica estructural de las serpinas (Huntington y col. (2003), *J. Thrombosis and Haemostasis*, 1: 1535-1549). Las serpinas son proteínas metaestables de forma que sólo son parcialmente estables en su forma activa; requieren que la proteasa adopte una conformación completamente estable. Un bucle, llamado el bucle del sitio reactivo (RSL), es responsable de la conformación alterada de la molécula de serpina. El RSL es un estiramiento expuesto de aproximadamente 17 residuos de aminoácidos que sobresale por la parte superior de la molécula en una región entre las hojas β A y C. El RSL sirve de sitio de reconocimiento de la proteasa, y generalmente contiene los únicos determinantes de especificidad de la proteasa. La forma más estable de la estructura de la serpina es la forma escindida por RSL. Tras la escisión de la proteasa, la porción del extremo amino del RSL se inserta en el centro de la hoja β A para hacer la cadena cuatro de la hoja β de seis cadenas. Este cambio conformacional se llama la transición "estresada" a "relajada" (o S a R). Esta transformación se caracteriza por un aumento en la estabilidad térmica de la molécula debido a la reorganización de la hoja β A de cinco cadenas a una forma antiparalela de seis cadenas (Lawrence y col. (2000), *J Biol. Chem.*, 275: 5839-5844). En otras palabras, la estructura nativa de las serpinas es equivalente a un producto intermedio latente que sólo se convierte en una estructura más estable tras la escisión de la proteasa (Law y col. (2006) *Genome Biology*, 7:216).

Normalmente, las serpinas eligen como diana serina proteasas, aunque algunas serpinas inhiben las cisteína proteasas usando un mecanismo similar. El bucle RSL determina qué proteasas son elegidas como diana para la inhibición ya que proporciona un pseudo-sustrato para la proteasa diana. En efecto, la especificidad inhibidora de una serpina particular está mediada por la secuencia de RSL, que es la región más variable entre serpinas (Travis y col. (1990) *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 371: 3-11). El RSL imita la secuencia de reconocimiento de sustrato de una proteasa y así contiene un sitio reactivo numerado $\dots P_n-P_3-P_2-P_1'-P_2'-P_3'-P_n \dots$ en la que el sitio reactivo es el enlace escindible entre P_1 y P_1' . Para la α 1-antitripsina madura, la escisión en el enlace P_1-P_1' se produce en el enlace Met₃₅₈-Ser₃₅₉ (correspondiente a los aminoácidos Met₃₈₂ y Ser₃₈₉ de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1). El sitio de unión correspondiente para los residuos en la proteasa son $\dots S_n-S_3-S_2-S_1-S_1', S_2', S_3', S_n' \dots$. En los procedimientos proporcionados en este documento, la modificación de la secuencia de RSL se hace para seleccionar proteasas de una biblioteca de exposición que muestra especificidad por sustrato alterada, como se trata más adelante en detalle.

2. Catálisis de proteasas, mecanismo inhibidor de serpinas y formación de producto intermedio de acil-enzima

Los procedimientos de selección de proteasas proporcionados en este documento explotan la capacidad de los polipéptidos para capturar proteasas tal como se ejemplifica por serpinas para identificar proteasas con especificidad por sustrato alterada. Los mecanismos de catálisis de proteasas diferencian ligeramente entre las clases de enzimas proteolíticas: serina, cisteína, aspárticas, treonina o metalo-proteasas. Por ejemplo, las serina peptidasas tienen un residuo de serina que participa en el centro activo, las aspárticas tienen dos ácidos aspárticos en el centro catalítico, las peptidasas de tipo cisteína tienen un residuo de cisteína, las peptidasas de tipo treonina tienen un residuo de treonina y las metalo-peptidasas usan un ión metálico en el mecanismo catalítico. Generalmente, aquellas familias de proteasas que forman productos intermedios covalentes son la diana de los procedimientos de selección de proteasas proporcionados en este documento. Éstos incluyen, por ejemplo, miembros de la familia de las serina y cisteína proteasas. Como un ejemplo de serina proteasas, la primera etapa en la catálisis es la formación de un producto intermedio de acil-enzima entre el sustrato y la serina en el centro catalítico de la proteasa. La formación de este producto intermedio covalente avanza por un producto intermedio de estado de transición tetraédrico negativamente cargado y luego se escinde el enlace peptídico P_1-P_1' del sustrato. Durante la segunda etapa o desacilación, el producto intermedio de acil-enzima se hidroliza por una molécula de agua para liberar el péptido y

para restaurar el hidroxilo de Ser de la enzima. La desacilación, que también implica la formación de un estado de transición tetraédrico, avanza por la vía de reacción inversa de acilación. Para la desacilación, una molécula de agua es el nucleófilo de ataque en lugar del residuo de Ser. El residuo de His en el centro catalítico de una serina proteasa proporciona una base general y acepta el grupo OH de la Ser reactiva.

Las serpinas inhiben la reacción de catálisis de tanto las serina como las cisteína proteasas diana usando la transición S a R como se menciona anteriormente. Su mecanismo de acción es único entre inhibidores de proteasas, destruyendo el sitio activo de la proteasa antes de que progrese la desacilación, impidiéndose así irreversiblemente la proteólisis tras la formación del producto intermedio de acil-enzima (Otlewski y col. (2005) *The EMBO Journal*, 24: 1303). El modelo cinético de la reacción de una serpina con una proteasa es idéntico al de la proteólisis de un sustrato (véase, por ejemplo, Figura 1; Zhou y col. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276: 27541-27547). Tras la interacción con una proteasa diana, la serpina forma inicialmente un complejo similar a Michaelis no covalente mediante interacciones de residuos en el RSL que flanquea el enlace escindible P1-P1' (Silverman y col. (2001), *J. Biol. Chem.*, 276: 33293-33296). El residuo de serina (para serina proteasas) en el sitio activo de la proteasa ataca el enlace P1-P1', facilitando la escisión del enlace peptídico y la formación de un enlace éster covalente entre el residuo de serina y el carbonilo de esqueleto del residuo P1. Después de escindirse el RSL, el RSL se inserta en la hoja β A de la molécula de serpina. El primer residuo en insertarse es P14 (es decir, el aminoácido 345 en la α 1-antitripsina madura que se corresponde con la posición de aminoácido T369 en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1), y va seguido de la región bisagra flexible (P15-P9) del RSL (Buck y col. (2005) *Mol. Biol. Evol.*, 22: 1627-1634). La inserción del RSL transporta la proteasa covalentemente unida con él, produciendo un cambio conformacional de la proteasa caracterizado por un sitio activo distorsionado (véase la Figura 1), además de una transición de la serpina a un estado "relajado". El cambio conformacional de la proteasa altera la tríada catalítica del sitio activo de forma que la cadena lateral de P1 se elimina del sitio S1. El resultado neto de las transposiciones conformacionales es atrapar el producto intermedio de acil-enzima (Silverman y col. (2001), *J. Biol. Chem.*, 276: 33293-33296).

La formación de una acil-enzima es importante para la interacción de serpina y, por tanto, las serpinas son normalmente específicas para clases de proteasas que tienen productos intermedios de acil-enzima en la catálisis. Entre esas clases de proteasas están predominantemente los miembros de la familia de las serina proteasas que incluyen aquellos en la superfamilia de las quimotripsinas y aquellos en la superfamilia de la subtilisinas de proteasas, que se describen más abajo en más detalle. Adicionalmente, las serpinas también son reactivas contra cisteína proteasas que incluyen, por ejemplo, aquellas en la familia de la papaína y la familia de las caspasas de serina proteasas. Normalmente, las serpinas no inhiben proteasas de las familias metalo-, treonina, o aspártico. Por ejemplo, las interacciones de serpinas con metaloproteasas no producen un producto intermedio atrapado covalente, pero en su lugar la metaloproteasa escinde el inhibidor sin formación de ningún complejo (Li y col. (2004) *Cancer Res.* 64: 8657-8665).

Por tanto, aunque la mayoría de las serpinas inhiben las serina proteasas de la familia de las quimotripsinas, existen inhibidores de clase cruzada que inhiben las cisteína proteasas. Entre los inhibidores de clase cruzada están la serpina vírica CrmA y PI9 (SERPINB9), que ambas inhiben las caspasas 1, y SCCA1 (SERPINB3) que inhibe cisteína proteasas similares a papaína que incluyen las cathepsinas L, K y S. El mecanismo de inhibición mediada por serpinas de serina proteasas parece que también se adapta a cisteína proteasas. Sin embargo, la diferencia es que el producto intermedio cinéticamente atrapado es un tioréster en vez de un oxioréster, como es el caso para las serina proteasas (Silverman y col. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:33293-33296). La existencia de un enlace de tipo tioréster covalente estable es soportada por la detección de un complejo estable de SDS entre SCCA1 y la cathepsina S (Silverman y col. (2001) *J Biol. Chem.*, 276:33293-33296; Schick y col. (1998) *Biochemistry*, 37:5258-5266).

El par serpina-proteasa es altamente estable durante semanas hasta años dependiendo del par de serpina-proteasa; sin embargo, la disociación se producirá eventualmente para dar los productos de proteólisis normal (es decir, la serpina escindida y la proteasa activa; véase, por ejemplo, Zhou y col. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276: 27541-27547). Además, si el bucle RSL no se inserta lo suficientemente rápido en la proteasa, la reacción avanza directamente hacia el producto escindido. Este fenómeno se llama reparto y refleja la existencia de una vía ramificada que puede producirse que conduce tanto a un complejo inhibidor estable o reposición de la serpina en un sustrato tal como se representa en la Figura 1 como a la formación de un complejo inhibido frente a la vía no inhibidora (Lawrence y col. (2000), *J. Biol. Chem.*, 275: 5839-5844). El reparto de una serpina puede modularse cambiando residuos en el bucle RSL, particularmente en la región bisagra del RSL que inicia la inserción de bucles (es decir, P14), o alterando la proteasa para la que interactúa óptimamente la serpina. Por ejemplo, la actividad inhibidora de la serpina inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) se diferencia entre las proteasas uPA, tPA y trombina, con una preferencia elegida como diana por uPA y tPA. Además, la variación del bucle RSL en, por ejemplo, la posición P14 de la región bisagra altera la preferencia elegida como diana de PAI-1: la mutación en aminoácidos cargados (es decir, Arg, Lys, Asp, Glu) reduce la actividad inhibidora de PAI-1 en cada uno de uPA, tPA y trombina; la mutación en aminoácidos neutros (es decir, His, Tyr, Gln, Asn) o en Gly que carece de una cadena lateral produce una actividad inhibidora reducida 10-100 veces de PAI-1 a tPA y trombina con respecto a uPA; y la mutación en aminoácidos hidrófobos no cambia la actividad inhibidora de PAI-1 con respecto a PAI-1 natural (Lawrence y col. (2000), *J. Biol. Chem.*, 275: 5839-5844).

Un factor importante en el éxito de la inhibición mediada por serpina de la catálisis de proteasas es la longitud del bucle RSL, que debe ser una longitud precisa para garantizar que la serpina y la proteasa interactúen de una forma que proporcione el apalancamiento entre el cuerpo de la serpina y la proteasa para permitir el desplazamiento de la serina catalítica del sitio activo y la deformación de la proteasa (Zhou y col. (2001) J. Biol. Chem., 276: 27541-27547; 5 Huntington y col. (2000) Nature, 407:923-926). En efecto, la proteasa es aplastada contra el cuerpo de la serpina. La mayoría de las serpinas tienen un RSL que tiene 17 residuos de longitud, aunque sólo se han identificado algunas con bucles de 16 residuos (es decir, α 2-antiplasmina, inhibidor C1 y CrmA). Una serpina variante de α 2-antiplasmina que tiene un bucle de 18 residuos también se ha identificado en un paciente con un trastorno por hemorragia, aunque esta variante no es una serpina inhibidora funcional (Zhou y col. (2001) J. Biol. Chem., 276: 27541-27547). 10 Por tanto, el mecanismo inhibidor de las serpinas puede contener un acortamiento, pero no un alargamiento, del RSL (Zhou y col. (2001) J. Biol. Chem., 276: 27541-27547). Además de una conservación de la longitud del bucle entre los miembros de la familia de las serpinas, los RSL de serpinas también retienen generalmente una composición de región bisagra conservada (P15-P9) y normalmente no contienen residuos de P cargados ni voluminosos.

15 a. Serpinas a modo de ejemplo

Las serpinas usadas en los procedimientos descritos en este documento pueden ser cualquier polipéptido de serpina que incluye, pero no se limita a, polipéptidos recombinantemente producidos, polipéptidos sintéticamente producidos 20 y serpinas extraídas de células, tejidos y sangre. Las serpinas también incluyen variantes alélicas y polipéptidos de diferentes especies que incluyen, pero no se limitan a, animales de origen humano y no humano, poxvirus, plantas, bacterias y arqueas. Normalmente, una variante alélica o de especies de una serpina se diferencia de una serpina nativa o natural aproximadamente o al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99%. Las serpinas humanas incluyen cualquier serpina descrita en este documento (por 25 ejemplo, en la Tabla 2 más adelante), isoformas de variantes alélicas, moléculas sintéticas de ácidos nucleicos, proteínas aisladas de tejidos humanos, células o sangre, y formas modificadas de cualquier polipéptido de serpina humana. Las serpinas también incluyen fragmentos de polipéptidos truncados, siempre y cuando esté presente una porción suficiente del bucle RSL para mediar en la interacción con una proteasa y formación de un producto intermedio de acil-enzima covalente.

TABLA 2: Serpinas a modo de ejemplo

	Serpina	Nombre de la proteína	Apodo	Función	Nº de acc	Polipéptido Maduro (aa)	SEC ID Nº
Serpinas inhibidoras extracelulares	SERPINA1	Alfa-1-antitripsina	A1AT	Inhibe elastasa	P01009	25-418	1
	SERPINA2	Proteína relacionada con alfa-1-antitripsina	A1AU	Puede ser un pseudogen	P20848	22-420	2
	SERPINF2	Alfa-2-antiplasmina	A2AP	Inhibe plasmina y tripsina	P08697	40-491	3
	SERPINA3	Alfa-1-antiquimotripsina	AAC T	Inhibe catepsina G neutrófila y quimasa de los mastocitos	P01011	24-423	4
	SERPINC1	Antitrombina-III	ANT3	Regula la cascada de la coagulación de la sangre; inhibidor de trombina y del factor Xa	P01008	33-464	5
	SERPIND1	Cofactor II de heparina	HEP2	Regula la cascada de la coagulación de la sangre; inhibidor de trombina	P05546	20-499	6
	SERPING1	Inhibidor de la proteasa del plasma C1	IC1	Regulación de la activación del complemento, coagulación de la sangre, fibrinólisis y la generación de cininas; inhibidor de la C1 esterasa	P05155	23-500	7
	SERPINA5	Inhibidor de las serina proteasas del plasma, inhibidor de proteínas C	IPSP, PAI-3	Inhibe proteína C activada y activadores de plasminógeno	P05154	20-406	8
	SERPINA4	Kalistatina	KAIN, P14	Inhibe actividades amidolíticas y de quinogenasa de la caliceína de tejido humano	P29622	21-427	9
	SERPINI1	Neuroserpina	NEUS, PII2	Formación o reorganización de conexiones sinápticas y plasticidad sináptica; inhibidor de tPA, uPA y plasmina	Q99574	17-410	10

TABLA 2: Serpinas a modo de ejemplo

	Serpina	Nombre de la proteína	Apodo	Función	Nº de acc	Polipéptido Maduro (aa)	SEC ID Nº
	SERPINE1	Inhibidor 1 del activador del plasminógeno	PAI1	Regulación de la fibrinólisis; inhibidor de trombina, uPA, tPA y plasmina	P05121	24-402	11
	SERPIN12	Inhibidor de serina proteasas derivadas de mioepitelio	P114	Inhibición de metástasis de cáncer	075830	19-405	12
	SERPINA10	Inhibidor de proteasas dependientes de la proteína Z	ZPI	Inhibe el factor Z y XI	Q9UK55	22-444	13
	SERPINE2	Proteasa nexina 1, precursor de la nexina derivado de la glía	P17, GDN, PN-1	Inhibición de uPA y tPA	P07093	20-398	14
Intracelular inhibidoras Serpinas	SERPINB1	Inhibidor de elastasa de leucocitos, inhibidor de elastasa neutrófila de monocitos	ILEU	Inhibición de proteasa neutrófila	P30740	1-379	15
	SERPINB2	Inhibidor 2 del activador del plasminógeno	PAI2	Activador del plasminógeno de tipo tejido, señalización intracelular; inhibición de uPA	P05120	1-415	16
	SERPINB6	Inhibidor de trombina placentaria	PT16	Inhibe trombina	P35237	1-376	17
	SERPINB10	Bomapiin	SB10, P110	Hematopoyesis, inhibición de trombina y tripsina	P48595	1-397	18
	SERPINB11	Epipin	SB11		Q96P15	1-392	19
	SERPINB12	Yukopin	SB12	Inhibe tripsina y plasmina	Q96P63	1-405	20
	SERPINAB13	Headpin	SB13, P113	Proliferación o diferenciación de queratinocitos, inhibición de las catepsinas L y K	Q9UIV8	1-391	21

TABLA 2: Serpinas a modo de ejemplo

	Serpina	Nombre de la proteína	Apodo	Función	Nº de acc	Polipéptido Maduro (aa)	SEC ID Nº
	SERPINB3	Antígeno 1 de carcinoma de células escamosas	SCC1	Modula la respuesta inmunitaria hacia tumores, inhibición de las catepsinas L, K, S y V, y papaína	P29508	1-390	22
	SERPINB4	Antígeno 2 de carcinoma de células escamosas	SCC2	Modula la respuesta inmunitaria hacia tumores, inhibición de la catepsina G y quimasa	P48594	1-390	23
	SERPINB7	Megsina	SPB7	Maduración de megacariocitos	075635	1-390	24
	SERPINB8	Antiproteinasa 8 citoplásmica	SPB8, P18	Inhibición de furina	P50452	1-374	25
	SERPINB9	Antiproteinasa 9 citoplásmica	SPB9, P19	Inhibidor de granzima B	P50453	1-376	26
	SERPINB6	Inhibidor 6 de proteinasa, inhibidor de trombina placentaria	P16, PTI	Inhibición de catepsina G, inhibe trombina	P35237	1-376	27
Serpinas no inhibidoras	SERPINA8	Angiotensinógeno	ANG T	Regulación de la tensión arterial, precursor de hormonas	P01019	34-485	28
	SERPINA6	Globulina de unión a corticosteroides	CBG	Vehículo de hormonas (glucocorticoides y progestinas), unión a cortisol	P08185	23-405	29
	SERPINH1	Proteína de choque térmico de 47 kDa	HS47	Chaperona molecular para colágeno	P29043	18-417	30
	SERPINF1	Factor derivado de epitelio pigmentario	PEDF	Induce diferenciación neuronal en células de retinoblastoma; inhibidor de angiogénesis	P36955	20-418	31
	SERPINB5	Maspina	MAS P	Supresor de tumores, evita metástasis	P36952	1-375	32
	SERPINH2	Proteína 2 de unión a colágeno	SIH2	Chaperona molecular para colágeno	P50454	19-418	33
	SERPINA7	Proteína de unión a tiroxina	THB G	Transporte de la hormona tiroidea, unión a tiroxina	P05543	21-415	34

TABLA 2: Serpinas a modo de ejemplo

Serpina	Nombre de la proteína	Apodo	Función	Nº de acc	Polipéptido Maduro (aa)	SEC ID Nº
SERPINA9	Proteína del transcrito 1 expresado en linfocitos B del centro germinal	GCET 1	Mantenimiento de linfocitos B sin tratamiento previo	Q86WD7	24-417	35
SERPINA12	Vaspina		Adipocitocina sensibilizada a insulina	Q8IW75	21-414	36
SERPINA11				Q86U17	20-422	37
SERPINA13				Q6LXR4	22-307	38

Normalmente, una serpina usada en los procedimientos descritos en este documento es una serpina inhibidora, o fragmento de la misma, que puede formar un producto intermedio de acil-enzima covalente entre la serpina y la proteasa. Generalmente, una serpina tal se usa para seleccionar proteasas normalmente elegidas como diana por la serpina cuando están próximo a producirse la inhibición completa de la proteasa y el reparto se minimiza entre el complejo inhibidor y el sustrato de serpina escindido. La Tabla 3 representa ejemplos de serina proteasas y sus inhibidores de serpina relacionados. Se espera que tales pares de serpina/proteasa tengan una alta constante de asociación o constante de velocidad de segundo orden de inhibición y bajo o ningún reparto en un complejo no inhibidor. Por ejemplo, el principal inhibidor fisiológico de t-PA es la serpina PAI-1, una glicoproteína de aproximadamente 50 kD (Pannekoek y col. (1986) EMBO J., 5:2539-2544; Ginsberg y col., (1980) J. Clin. Invest., 78:1673-1680; y Carrell y col. In: Proteinase Inhibitors, Ed. Barrett, A.J. y col., Elsevier, Amsterdam, páginas 403-420 (1986). En los procedimientos descritos en este documento también pueden usarse otros pares de serpina/proteasa, sin embargo, incluso cuando las constantes de asociación son inferiores y el reparto es mayor. Por ejemplo, aunque las constantes de asociación de otras serpinas, tales como el inhibidor de la C1 esterasa y alfa-2-antiplasmina con tPA, sean órdenes de magnitud inferiores a los de PAI-1 (Ranby y col. (1982) Throm. Res., 27:175-183; Hekman y col. (1988) Arch. Biochem. Biophys., 262:199-210), estas serpinas inhiben tPA (véase, por ejemplo, Lucore y col. (1988) Circ. 77:660-669).

TABLA 3:	
Serina Proteasa	Inhibidor de serpina relacionado
Proteína C activada	Inhibidor PAI-1 de la proteína C
C1 esterasa	Inhibidor de la C1 esterasa
Catepsina G	Alfa-1-antitripsina Alfa-1-antiquimotripsina
Quimasa	Alfa-1-antiquimotripsina
Quimotripsina	Alfa-1-antiquimotripsina Alfa-2-antiplasmina Contrapsina
Factores de coagulación (VIIa, Xa, XIa, XIIa)	Antitrombina III Inhibidor de la C1 esterasa
Elastasa	Alfa-1-antitripsina
Calicreína	Inhibidor de la C1 esterasa Alfa-1-antitripsina
Plasmina	Alfa-2-antiplasmina
Trombina	Antitrombina III Cofactor II de la heparina
tPA	PAI-1, PAI-2, PAI-3
Tripsina	Alfa-1-antitripsina Proteína regulada por hormona del crecimiento
Proteasa similar a tripsina	Proteasa nexina I
u-PA	PAI-1, PAI-2, PAI-3

Por tanto, generalmente, una serpina usada para la selección de una proteasa en los procedimientos descritos en este documento da un producto de reacción en el que el 80%, 90%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o el 100% del producto de reacción es la formación del complejo inhibidor. En algunos casos, sin embargo, el aumento del reparto entre una serpina y proteasa puede producirse en los procedimientos descritos en este documento, tal como si la serpina usada en el procedimiento no eligiera óptimamente como diana la proteasa. Por tanto, en los procedimientos descritos en este documento, una serpina puede usarse para seleccionar una proteasa en la que la reacción resultante conduce al o a aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75% o más de un complejo inhibidor estable y el resto del producto es un sustrato de serpina escindido. Factores que pueden alterarse para optimizar la selección de proteasas en las que se produce el reparto incluyen, por ejemplo, aumento de la concentración de serpina y aumento del tiempo de reacción. En algunos casos, otras serpinas no inhibidoras, o mutantes de las mismas como se trata más adelante, pueden usarse en los procedimientos descritos en este documento, mientras que la proteasa diana para la selección puede interactuar con el sustrato de serpina para dar un complejo inhibidor covalente que puede captarse.

i. PAI-1

A modo de ejemplo de serpinas usadas en los procedimientos de selección de proteasas es el inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1), o variantes del mismo. El PAI-1 es el principal inhibidor del activador tisular del plasminógeno (t-PA) y urocinasa o activador del plasminógeno urinario (u-PA), que son proteasas que participan en la fibrinólisis debido a la activación de plasminógeno. El PAI-1 tiene una constante de velocidad de segundo orden para t-PA y u-PA de aproximadamente $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. El PAI-1 participa en invasión tumoral, fibrinólisis, migración celular, remodelación de tejido, involución de tejido, ovulación, inflamación, invasión de trofoblastos y transformación maligna (Salonen y col. (1988) J Biol. Chem., 264: 6339-6343). El PAI-1 se produce principalmente por el endotelio, pero también es secretado por otros tipos de tejido tales como, por ejemplo, tejido adiposo. Otros inhibidores del activador del plasminógeno relacionados incluyen PAI-2 y PAI-3. El PAI-2, por ejemplo, también es un inhibidor de u-PA y t-PA, pero es secretado por la placenta y normalmente sólo está presente en altas cantidades durante el

embarazo.

El PAI-1 es una glicoproteína monocatenaria que tiene una secuencia de precursor expuesta en SEC ID N°: 11, que incluye una secuencia señal de 23 aminoácidos que cuando se escinde produce una secuencia madura de 379 aminoácidos. Como las otras serpinas, el PAI-1 hace una transición de una forma latente a una forma activa tras la escisión por una proteasa en su sitio reactivo P1-P1' localizado en Arg³⁴⁶-Met³⁴⁷ (es decir, correspondiente a los aminoácidos Arg³⁶⁹ y Met³⁷⁰ de una secuencia de precursor expuesta en SEC ID N°: 11), produciendo así la formación de un complejo covalente estable y la inactivación de la proteasa unida. Sin embargo, a diferencia de otras serpinas, el PAI-1 adopta una transición latente produciendo espontáneamente una forma intacta inactiva altamente estable, pero covalentemente intacta, por lo que los residuos P15 a P4 del RSL se insertan en la hoja β A para formar cuatro cadenas de la hoja β (es decir, s4A), y los residuos P3 a P10' forman un bucle extendido en la superficie de la molécula (De Taeye y col. (2003) J Biol. Chem., 278: 23899-23905). Por tanto, el PAI-1 activo es relativamente inestable a 37°C, presentando una semivida de sólo 2,5 horas antes de la conversión espontánea en una conformación latente. Sin embargo, esta forma latente puede reactivarse por desnaturalización tal como por desnaturalización con dodecilsulfato de sodio, cloruro de guanidinio y urea (Declerek y col. (1992) J. Biol. Chem., 267: 11693-11696) y calor (Katagiri y col. (1988) Eur J. Biochem., 176: 81-87). La forma activa de PAI-1 también se estabiliza por la interacción con vitronectina. Se ha identificado que el PAI-1 mutante no puede experimentar una conversión a una conformación latente y, por tanto, es estable a temperatura y pH elevados durante periodos de tiempo prolongados (véase, por ejemplo, Berkenpas y col. (1995) The EMBO J., 14:2969-2977).

Las modificaciones de serina proteasas (es decir, t-PA o u-PA) y/o de la serpina inhibidora (es decir, PAI-1) se han hecho para modular o alterar las constantes de velocidad secundarias de la inhibición de manera que hagan proteasas resistentes a la inhibición por su inhibidor de serpina relacionado, o variante del mismo, tal como para su uso en aplicaciones terapéuticas en las que se desea la actividad de la proteasa natural (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° de serie 5.866.413; 5.728.564; 5.550.042; 5.486.602; 5.304.482).

ii. Antitrombina (AT3)

Otra serpina a modo de ejemplo, o variante de la misma, para su uso en los procedimientos descritos en este documento es la antitrombina (AT3). La AT3 también es un miembro de la familia de las serpinas e inactiva varias enzimas que incluyen, por ejemplo, aquellas del sistema de coagulación tales como, pero no se limitan a, factor X, factor IX, factor II (trombina), factor VII, factor X y factor XII. Normalmente, la antitrombina se encuentra predominantemente en la sangre en la que, por ejemplo, previene o inhibe la coagulación bloqueando la función de la trombina. La actividad de AT3 aumenta la presencia de uno o más cofactores, normalmente heparina. Tras la interacción con heparina, la AT3 experimenta una transposición conformacional que implica la expulsión del bucle de la estructura de la serpina y la exposición de P1, produciendo un estructura de AT3 que tiene una conformación expuesta accesible a proteasas. Además, la heparina pueden unirse tanto a la proteasa como al inhibidor, acelerando así el mecanismo inhibidor (Law y col. (2006) Genome Biology, 7(216): 1-11).

La secuencia génica para AT3 codifica un ADN que se extiende siete exones que codifica una proteína precursora expuesta en SEC ID N°: 5. La escisión de la secuencia señal correspondiente a los aminoácidos 1-32 de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 5 produce una proteína madura de 432 aminoácidos que tiene un peso molecular de aproximadamente 58.000 dalton. Seis de los aminoácidos son cisteínas, que producen la formación de tres enlaces disulfuro intramoleculares. Las posiciones P4-P2' en el RSL de AT3 contienen los residuos de aminoácidos IAGRSL (SEC ID N°: 478), que se corresponden con los aminoácidos 422-427 en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 5, en la que la escisión en el sitio reactivo P1-P1' se produce entre los aminoácidos Arg⁴²⁵-Ser⁴²⁶.

3. Otros polipéptidos de captura de proteasas

En la técnica se conocen o pueden identificarse polipéptidos de captura de proteasas adicionales que presentan un mecanismo de inhibición similar a las serpinas (por ejemplo, escisión del sustrato diana por una proteasa que produce un producto intermedio estable y un cambio conformacional en la estructura de la proteasa). Tales polipéptidos de captura de proteasas se contemplan para su uso en los procedimientos descritos en este documento. A modo de ejemplo de un polipéptido de captura de proteasas tal es p35. Además, en los procedimientos descritos en este documento puede usarse cualquier otra molécula que sea escindida por una proteasa que produce el atrapamiento de una proteasa en un complejo estable de larga duración.

a. p35

Por ejemplo, la proteína p35 del baculovirus (SEC ID N°: 473), que es un inhibidor de caspasa de amplio espectro, puede inhibir caspasas de este modo (Xu y col. (2001) Nature 410:494-497; Xu y col. (2003) J. Biol. Chem. 278(7):5455-5461). La escisión del enlace P₁-P₁' de p35 (en el sitio de escisión de caspasa DQMD⁸⁷) por caspasas produce un producto intermedio de tioéster covalente entre el segmento amino del bucle de p35 (Asp87) y el residuo de cisteína de la tríada catalítica de caspasa (Cys350 en la caspasa 8). Tras la formación del enlace tioéster, la proteasa experimenta un cambio conformacional que permite que el segmento amino del bucle escindido se entierre

en la caspasa, mientras que el extremo N de p35 que contiene un residuo Cys en la posición 2 se inserta en el sitio activo de la caspasa, bloqueando así la accesibilidad del disolvente del residuo His 317 a la caspasa 8. Por tanto, la inaccesibilidad a la molécula de agua hidrolítica previene la posterior hidrólisis del enlace tioéster.

- 5 Inhibidores de caspasa vírica similares, además de p35, incluyen, pero no se limitan a, p49 (SEC ID N°: 491) y la el gen de la viruela vacuna CrmA de serpina (SEC ID N°: 492). El inhibidor de p49 presenta un mecanismo de inhibición de caspasa similar al de p35 en el que se forma un enlace tioéster estable con el sitio activo de la caspasa tras la escisión de la secuencia de reconocimiento de la caspasa p49 TVTD⁹⁴.
- 10 Sustratos diana para el cribado usando los procedimientos descritos en este documento pueden incluir un polipéptido del inhibidor de la caspasa vírica tal como polipéptido de p35, p49 o CrmA. Los procedimientos de modificación del bucle RSL de serpinas descritos en este documento pueden adaptarse fácilmente a la modificación de polipéptidos del inhibidor de la caspasa vírica. Por ejemplo, el sitio diana para la escisión en el RSL de p35 puede modificarse de manera que se seleccionen proteasas que tienen una reactividad o especificidad alterada por un
- 15 sustrato diana. En p35 natural, el reconocimiento de caspasa se encuentra en las posiciones de aminoácidos 84-87 (DQMD⁸⁷). Por tanto, las modificaciones a los polipéptidos del inhibidor de la caspasa vírica pueden incluir modificaciones que alteran la secuencia de escisión y/o residuos de aminoácidos de alrededor. Por ejemplo, tales polipéptidos del inhibidor de la caspasa modificados tales como, por ejemplo, un polipéptido de p35, p49 o CrmA, pueden diseñarse para imitar la secuencia de escisión de un sustrato diana deseado tal como, por ejemplo, un
- 20 sustrato diana que participa en la etiología de una enfermedad o trastorno. Cualquier modificación en la secuencia del bucle RSL de un polipéptido del inhibidor de la caspasa vírica puede hacerse en los procedimientos descritos en este documento.

25 Los polipéptidos del inhibidor de la caspasa vírica tales como un polipéptido de p35, p49 o CrmA usados en los procedimientos descritos en este documento pueden ser cualquier polipéptido del inhibidor de la caspasa vírica que incluye, pero no se limita a, polipéptidos recombinantemente producidos, polipéptidos sintéticamente producidos y polipéptido de p35 o p49 producido por procedimientos de purificación de baculovirus. Los polipéptidos del inhibidor de la caspasa vírica también incluyen variantes alélicas de polipéptidos tales como variantes de polipéptidos de p35, p49 o CrmA.

30 **b. Alfa-macroglobulinas (aM)**

La familia de las alfa-macroglobulinas (aM) de proteasas incluyen inhibidores de proteasas tales como el inhibidor de proteasas a modo de ejemplo alfa-2-macroglobulina (a2M; SEC ID N°: 490), y se contemplan para su uso como

35 captura de proteasas en los procedimientos descritos en este documento. Las moléculas de aM inhiben todas las clases de proteasas. Las capturas de proteasas aM se caracterizan por un mecanismo de inhibición similar que implica la escisión de una región cebo del inhibidor por una proteasa. La región cebo es un segmento que es susceptible a la escisión proteolítica y que, tras la escisión, inicia un cambio conformacional en la molécula de aM produciendo el colapso de la estructura alrededor de la proteasa. Para la secuencia de a2M a modo de ejemplo

40 expuesta en SEC ID N°: 490, la región cebo se corresponde con los aminoácidos 690-728. En el complejo estable de aM-proteasa resultante, el sitio activo de la proteasa está estéricamente protegido, disminuyendo así el acceso a sustratos de proteasa normal. Normalmente, la proteasa atrapada sigue siendo activa contra sustratos de péptidos pequeños, pero pierde su capacidad para interactuar con sustratos de proteínas grandes o inhibidores. Además, las moléculas de aM se caracterizan por la presencia de un tioéster reactivo que inactiva la capacidad inhibidora

45 haciendo reaccionar el tioéster con aminas. Además, el cambio conformacional que se produce tras la escisión de la región cebo expone un dominio de unión al receptor del extremo COOH conservado (RBD). La exposición de la secuencia del RBD facilita la eliminación del complejo de aM-proteasa de la circulación.

50 **4. Competidores de captura de proteasas**

Los competidores pueden usarse en los procedimientos descritos en este documento para modular las limitaciones de la especificidad y selectividad de una proteasa seleccionada por un sustrato diana. Los competidores pueden ponerse en contacto con la proteasa, o conjuntos de la misma, en cualquier momento, tal como antes o después de poner en contacto la proteasa con el polipéptido de captura de proteasas deseado, o el competidor y el polipéptido

55 de captura de proteasas deseado pueden ponerse en contacto con la proteasa simultáneamente. Los competidores pueden ser competidores específicos o competidores amplios.

Se diseñan competidores específicos que imitan un sustrato no diana predeterminado y así actúan de posibles fuera de diana predeterminadas. Normalmente, tales competidores no están marcados, de manera que no seleccionan los

60 complejos de proteasa estables que forman. Además, tales competidores se añaden en gran exceso, normalmente exceso molar, con respecto al polipéptido de captura de proteasas diseñado usado en el esquema de selección, de forma que los competidores se unen a las proteasas no deseadas en el conjunto. En un ejemplo de competición específica, dos polipéptidos de captura de proteasas diferentes, cada uno diseñado para imitar diferente reconocimiento de sustrato, se ponen en contacto con un conjunto de proteasas en el que sólo uno de los

65 polipéptidos de captura de proteasas está marcado detectablemente. Por ejemplo, un competidor puede incluir un polipéptido de captura de proteasas que está diseñado para que su sitio reactivo imite la secuencia de escisión de

un sustrato no diana. Por tanto, un competidor tal como una serpina puede diseñarse para tener sus residuos del RSL P4-P1' sustituidos por la secuencia de escisión de un sustrato no diana predeterminado. El competidor puede usarse en procedimientos en combinación con un polipéptido de captura de proteasas tal como, por ejemplo, otro polipéptido de serpina cuya secuencia de RSL se ha modificado para contener aminoácidos en las posiciones P4-P1' que imitan la secuencia de escisión de un sustrato diana deseado o predeterminado, y que está marcado para el aislamiento del mismo. Por tanto, ambos polipéptidos de captura de proteasas seleccionan proteasas que presentan selectividad por la secuencia de escisión diana o no diana, pero sólo aquellos complejos de proteasa estables que presentan la especificidad por sustrato diana deseada y que están detectablemente marcados pueden aislarse de la reacción. Otros ejemplos de competidores específicos incluyen, por ejemplo, el polipéptido de captura de proteasas nativo para el que el sitio reactivo se ha modificado en los procedimientos descritos en este documento. El Ejemplo 6 ejemplifica una estrategia tal en la que una serpina AT3 purificada de plasma se usa como competidor contra la serpina modificada AT3^{SLGR-KI}.

Los competidores amplios también pueden usarse en los procedimientos descritos en este documento para limitar la especificidad y selectividad de proteasas seleccionadas. Ejemplos de competidores amplios incluyen, por ejemplo, plasma humano o suero humano que contiene una variedad de inhibidores de proteasas naturales. Alternativamente puede generarse una amplia biblioteca de moléculas pequeñas de polipéptidos de captura de proteasas en la que cada posición P2, P3 o P4 está hecha para que sea diferente tal como, por ejemplo, una biblioteca Acxxx-Thiaphine.

5. Polipéptidos de captura de proteasas variantes

Los polipéptidos de captura de proteasas que han sido modificados en su sitio reactivo para tener una secuencia de escisión alterada pueden usarse en los procedimientos descritos en este documento para seleccionar proteasas con un sustrato diana deseado o predeterminado. Por tanto, las capturas de proteasas se modifican en la región de su secuencia que sirve de sitio de escisión reconocido de una proteasa de manera que se seleccionen proteasas que tienen una reactividad o especificidad alterada por un sustrato diana. Por ejemplo, las serpinas pueden modificarse para tener una secuencia de escisión alterada en o alrededor del enlace escindible en el bucle RSL. En otro ejemplo, a2M puede modificarse en su región cebo para tener una secuencia de escisión alterada. Tales capturas de proteasas modificadas pueden diseñarse para imitar la secuencia de escisión de un sustrato diana deseado tal como, por ejemplo, un sustrato diana que participa en la etiología de una enfermedad o trastorno.

Cualquier modificación en la secuencia del bucle RSL de una molécula de serpina puede prepararse en los procedimientos descritos en este documento. En la siguiente Tabla 4 se exponen los alineamientos de secuencias de RSL de serpinas naturales a modo de ejemplo. En la siguiente tabla, los números que designan las posiciones P15 a P5' son con respecto a una molécula de α 1-antitripsina madura (correspondiente a los aminoácidos 367- 387 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1). La identidad de las secuencias del bucle RSL son conocidas para aquellos expertos en la materia y/o puede determinarse por alineamientos tales como por alineamiento con serpinas como se exponen en la siguiente Tabla 4.

TABLA 4: ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DEL BUCLE RSL*						
SERPINA	Secuencia del bucle RSL					SEC ID N°
	343 P ₁₅	P ₁₀	P ₄	P ₁ P ₁ '	P ₅ ' 363	
Serpina 1B de <i>Manduca sexta</i>	EGAEAAAANAFGIVPKSLILY					397
Serpina 1K de <i>Manduca sexta</i>	EGAEAAAANAFKITYSFHFV					398
α 1-Antiquimotripsina	EGTEASAATAVKITLLSALVE					399
Antitrombina-III	EGSEAAASTAVVIAGRSLNPN					400
PAI-II	EGTEAAAGTGGVMTGRTGHGG					401
α 1-antitripsina	KGTEAAGAMFLEAIPMSIPPE					402
PAI-I	SGTVASSSTAVIVSARMAPEE					403
PAI-III	SGTRAAAATGTIFTFRSARLN					404
Albúmina de huevo	AGREWGSAEAGVDAASVSEE					405

* adaptada de Ye y col. (2001) Nature Structural Biology 8: 979

Por tanto, las secuencias de aminoácidos dentro del bucle RSL de una serpina correspondiente a uno cualquiera o más de los aminoácidos en el sitio reactivo de una serpina (es decir, uno cualquiera o más de los aminoácidos correspondientes a las posiciones P15 a P5' tal como se exponen, por ejemplo, en la Tabla 4 anterior) pueden modificarse. Normalmente, los aminoácidos que son parte de la región de bisagra de la secuencia del bucle RSL no están modificadas (es decir, los aminoácidos correspondientes a las posiciones P15-P9). En un ejemplo, uno o más aminoácidos en la posición P1 y/o P1' se modifican correspondientemente a aquellos aminoácidos que flanquean el enlace escindible. En otro ejemplo se modifican uno cualquiera o más de los aminoácidos correspondientes a las posiciones de sitio reactivo P4-P2'. Por ejemplo, P4-P1' de PAI-1 es VSARM (SEC ID N°: 378), en la que la escisión

se produce entre los aminoácidos R (PI) y M (P1'). La modificación de cualquiera o más de los aminoácidos de la secuencia VSARM puede hacerse para modificar la secuencia de escisión de PAI-I para seleccionar proteasas con especificidad alterada. El Ejemplo 1 ejemplifica la modificación de PAI-I en el que la secuencia VSARM en el bucle del sitio reactivo se modifica para ser RRARM (SEC ID N°: 379). En otro ejemplo, el bucle del sitio reactivo de la secuencia VSARM puede modificarse a la PFGRS del sustrato de péptido eficiente conocido (SEC ID N°: 389). Tal PAI-1 mutante a modo de ejemplo se expone en SEC ID N°: 610 y 611.

En otro ejemplo, las modificaciones pueden hacerse en el RSL de antitrombina III (AT3). Por ejemplo, P4-P1' de AT3 es IAGRSL (SEC ID N°: 478), en la que la escisión se produce entre los aminoácidos R (PI) y S (P1'). La modificación de uno cualquiera o más de los aminoácidos de la secuencia IAGRSL puede hacerse para modificar la secuencia de escisión de AT3 para seleccionar proteasas con especificidad alterada. Los Ejemplos 6 y 7 ejemplifican la modificación de AT3 en la que la secuencia IAGRSL en el bucle del sitio reactivo se modifica para ser RRVRKE (SEC ID N°: 498). En otro ejemplo, la secuencia de aminoácidos IAGRSL en el bucle del sitio reactivo puede modificarse a SLGRKI (SEC ID N°: 479). Se hicieron otros polipéptidos de AT3 modificados que contienen el reemplazo de la secuencia de aminoácidos IAGRSL con la secuencia de aminoácidos SKGRSL (SEC ID N°: 501) o la secuencia de aminoácidos PRFKII (SEC ID N°: 503). Tales moléculas de AT3 mutantes a modo de ejemplo se exponen en cualquiera de SEC ID N°: 497, 499, 500 y 502.

Alternativamente, y si fuera necesario, la modificación en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos P4-P2' puede hacerse de una en una, de dos en dos, de tres en tres, etc., y la serpina modificada resultante puede probarse por separado en rondas sucesivas de selección de manera que se optimice para proteasas que presentan especificidad y/o selectividad por sustrato en cada una de las posiciones modificadas.

En la mayoría de los casos, los residuos de aminoácidos que sustituyen residuos de aminoácidos en el bucle del sitio reactivo de una serpina natural, o secuencia análoga en otra captura de proteasas, se eligen basándose en secuencias de escisión en un sustrato diana deseado. Una proteína de sustrato diana es una que normalmente participa en una patología en la que la escisión de la proteína diana en una secuencia de sustrato dada sirve de tratamiento para la patología (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. n° US 2004/0146938, US2006/0024289, US2006/0002916, y la solicitud provisional n° de serie 60/729.817). Por ejemplo, la proteína diana puede ser una que participa en artritis reumatoide (es decir, TNFR), septicemia (es decir, proteína C), tumorigenicidad (es decir, un receptor del factor de crecimiento tal como VEGFR) o inflamación (es decir, una proteína del complemento). Un sustrato diana también puede ser una proteína vírica de forma que, tras la escisión de la proteína vírica, los virus no podrían infectar células. La siguiente Tabla 5 expone a modo de ejemplo sustratos diana.

TABLA 5: Sustratos diana a modo de ejemplo

Diana	Indicación	Clase de molécula
IL-5/IL-5R	Asma	Citocina
IL-1/IL-1R	Asma, inflamación, trastornos reumáticos	Citocina
IL-13/IL-13R	Asma	Citocina
IL-12/IL-12R	Trastornos inmunológicos	Citocina
IL-4/IL-4R	Asma	Citocina
TNF/TNFR	Asma, enfermedad de Crohn, infección por el VIH, inflamación, psoriasis, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino	Citocina
CCR5/CXCR4	Infección por el VIH	GPCR
gp120/gp41	Infección por el VIH	Proteína de fusión
CD4	Infección por el VIH	Inmunorreceptor
Hemaglutinina	Infección por gripe	Proteína de fusión
Proteína de fusión de RSV	Infección por RSV	Proteína de fusión
B7/CD28	Trastorno de injerto frente a huésped, artritis reumatoide, rechazo de trasplante, diabetes mellitus	Inmunorreceptor
IgE/IgER	Trastorno de injerto frente a huésped, rechazo de trasplante	Receptor de anticuerpo
CD2, CD3, CD4, CD40	Trastorno de injerto frente a huésped, rechazo de trasplante, psoriasis	Inmunorreceptor
IL-2/ IL-2R	Trastornos autoinmunitarios, trastornos de injerto frente a huésped, artritis reumatoide	Citocina
VEGF, FGF, EGF, TGF	Cáncer	Factor de crecimiento

TABLA 5: Sustratos diana a modo de ejemplo		
Diana	Indicación	Clase de molécula
HER2/Neu	Cáncer (es decir, cáncer de mama)	Receptor de factores de crecimiento
CCR1	Esclerosis múltiple	GPCR
CXCR3	Esclerosis múltiple, artritis reumatoide	GPCR
CCR2	Aterosclerosis, artritis reumatoide	GPCR
Src	Cáncer, osteoporosis	Cinasa
Akt	Cáncer	Cinasa
Bcl-2	Cáncer	Proteína-proteína
BCR-Abl	Cáncer	Cinasa
GSK-3	Diabetes	Cinasa
Cdk-2/cdk-4	Cáncer	Cinasa
EGFR	Cáncer de pulmón, mama, vejiga, próstata, colorrectal, riñón, cabeza y cuello	
VEGFR-1, VEGFR-2	Cáncer de cuello	Receptor de factores de crecimiento
Complemento	Enfermedades inflamatorias	Inmunomoléculas

Los sitios de escisión dentro de proteínas diana son conocidos o pueden identificarse fácilmente. Los sitios de escisión dentro de las proteínas diana se identifican por los siguientes criterios: 1) se localizan en la superficie expuesta de la proteína; 2) se localizan en regiones que carecen de estructura secundaria (es decir, no en hojas P de hélices), como se ha determinado por estructura atómica de algoritmos de predicción de estructura (estas regiones tienden a ser bucles sobre la superficie de proteínas o tallo sobre receptores de la superficie celular); 3) se localizan en sitios que es probable que inactiven (o activen) la proteína, basándose en su función conocida. Las secuencias de escisión tienen, por ejemplo, cuatro residuos de longitud (es decir, posiciones P1-P4) para coincidir con la especificidad por sustrato extendida de proteasas, pero pueden ser más largas o más cortas. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos P4-P1 para una secuencia de escisión en el factor de complemento C2 son SLGR (SEC ID N°: 431), pero también pueden representarse como la secuencia P4-P2' de SLGRKI (SEC ID N°: 479), en la que la escisión se produce entre la posición P1 y P1' (es decir, entre R/K). Por tanto, uno cualquiera o más residuos dentro de una secuencia de escisión, que incluyen uno cualquiera o más de los residuos P4-P2', que incluyen P4-P1, pueden introducirse en un polipéptido de captura de proteasas tal como en el RSL de una serpina para generar un polipéptido de captura de proteasas mutantes.

Las secuencias de escisión pueden identificarse en un sustrato diana mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica (véase, por ejemplo, la solicitud de EE.UU. publicada n° US 2004/0146938). En un ejemplo, la escisión de un sustrato diana se determina incubando el sustrato diana con cualquier proteasa conocida por escindir el sustrato. Tras la incubación con la proteasa, la proteína diana puede separarse por SDS-PAGE y pueden identificarse productos degradativos por tinción con un colorante de proteínas tal como azul brillante de Coomassie. Los fragmentos proteolíticos pueden secuenciarse para determinar la identidad de las secuencias de escisión, por ejemplo, la secuencia de escisión de P4-P2' de 6 aminoácidos y, en particular, los residuos de la secuencia de escisión de P4-P1 de cuatro aminoácidos. La Tabla 6 identifica secuencias de escisión correspondientes a las posiciones P4-P1 para sustratos diana a modo de ejemplo.

TABLA 6: Secuencia de escisión para sustratos diana a modo de ejemplo (residuos P4-P1)	
Diana	Secuencia de escisión
TNF- α	AEAK(406)
TNF-R1	ENVK (407); GTED (408)
TNF-R2	SPTR (409); VSTR (410); STSF (411)
HER-2	KFPD (412); AEQR (413)
EGFR	KYAD (414); NGPK (415)
VEGFR-1	SSAY (416); GTSD (417)
VEGFR-2	AQEK (418); RIDY (419); VLKD (480); LVED (481); WFKD (482); RIYD (483); KVGR (484); RVRK (485); RKTK (486); KTKK (487); TKKR (488); RRVK (489)
C3	REFK (420); GLAR (421); RLGR (422); AEGK (423); QHAR (424); LPSR (425); SLLR (426); LGLA (427); LSVV (428)
C4	HRGR (429)
C2	GATR (430); SLGR (431); VFAK (432)

Por tanto, la modificación de un RSL de una serpina, o secuencia análoga en otras capturas de proteasas, puede modificarse a cualquier secuencia de escisión deseada o predeterminada de un sustrato diana. En un ejemplo, la secuencia de escisión seleccionada puede ser una que es una secuencia de escisión particularmente eficiente de t-PA. Una secuencia de escisión tal es, por ejemplo, PFGRS (SEC ID N°: 389; véase, por ejemplo, Ding y col. (1995) PNAS, 92:7627-7631). Por tanto, por ejemplo, puede seleccionarse una proteasa para la que tiene una especificidad por sustrato alterada que se hace para replicar la especificidad por sustrato de t-PA. Como t-PA es un agente terapéutico frecuentemente usado para el tratamiento de trastornos fibrinolíticos, una proteasa seleccionada tal puede optimizarse para ser un agente terapéutico de t-PA alternativo, a la vez que se minimizan los efectos secundarios no deseables frecuentemente asociados a terapias de t-PA (es decir, sangrado excesivo).

En otro ejemplo, una secuencia de escisión para una proteína del complemento puede elegirse como diana como una secuencia de escisión predeterminada o deseada para la selección de una proteasa usando los procedimientos descritos en este documento. Una proteasa seleccionada para tener especificidad por sustrato elevada contra una cualquiera o más de las proteínas del complemento sería un candidato terapéutico para el tratamiento de trastornos y enfermedades asociados a inflamación tal como, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide y lupus, trastornos cardíacos, y otros trastornos inflamatorios tales como septicemia y lesión por isquemia-reperfusión (véase, por ejemplo, la solicitud provisional n° de serie 60/729.817). El Ejemplo 6 a Ejemplos 15 ejemplifican la selección de una proteasa MT-SP1 contra una molécula de serpina AT3 modificada por reemplazos de sus residuos P4-P2' nativos IAGRSL (SEC ID N°: 478) con una secuencia de escisión de las proteínas del complemento C2 (es decir, SLGRKI, SEC ID N°: 479). La modificación o reemplazo de residuos de aminoácidos por la secuencia de escisión SLGRKI, o productos intermedios de la misma tal como se describen más adelante, puede hacerse en cualquier polipéptido de captura de proteasas, tal como cualquier polipéptido de serpina, para la selección de cualquier proteasa candidata si así se desea.

En un ejemplo adicional, una secuencia de escisión puede seleccionarse en un VEGFR, tal como en la región de tallo de un VEGFR, de forma que el VEGFR se inactive tras la escisión por una proteasa que tiene especificidad por la secuencia de escisión. Ejemplos de secuencias de escisión en un VEGFR se describen en este documento y se exponen en las solicitudes de EE.UU. publicadas relacionadas n° de serie US20060024289 y US20060002916. Por ejemplo, el RSL de una serpina, o secuencia análoga en otras capturas de proteasas tales como la región de "cebo" en alfa-2-macroglobulina, puede modificarse para tener una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos P4-P2' sustituidas con la secuencia de escisión de un VEGFR. En un ejemplo, los residuos de aminoácidos en una serpina nativa pueden modificarse para contener las posiciones P4-P1 correspondientes a la secuencia de escisión RRVR (SEC ID N°: 489), o la secuencia de P4-P2' completa RRVRKE (SEC ID N°: 498). Una proteasa seleccionada contra una serpina modificada tal sería un candidato para tratar trastornos mediados por VEGFR tales como, por ejemplo, trastornos angiogénicos.

En algunos casos, en los procedimientos descritos en este documento, las modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones P4-P2' de un RSL de serpina, o secuencia análoga en otras capturas de proteasas, pueden hacerse en rondas sucesivas para optimizar la selección de proteasas con una especificidad por sustrato deseada o predeterminada. Por ejemplo, ambas proteasas u-PA y t-PA prefieren aminoácidos pequeños en la posición P2 y aminoácidos muy diferentes en las posiciones P3 y P4. Por tanto, pueden generarse serpinas modificadas que son productos intermedios para la secuencia de escisión diana final en la que un primer producto intermedio se genera por modificación de sólo las posiciones P3 y P4 para seleccionar proteasas que presentan especificidad en las posiciones P3 y P4. La proteasa o proteasas seleccionadas pueden entonces usarse como molde para la generación de una nueva biblioteca combinatoria contra una nueva molécula de serpina modificada para cambiar adicionalmente la posición P2.

Por tanto, en la selección, por ejemplo, de una proteasa u-PA, o variante de la misma, que presenta elevada especificidad por sustrato por la secuencia de escisión de VEGFR RRVR, la primera ronda de selección puede hacerse contra un polipéptido de captura de proteasas modificado intermedio tal como una serpina en la que solo las posiciones P3 y P4 están cambiadas con respecto a la secuencia nativa en aquellas posiciones. Por ejemplo, si los aminoácidos P4-P1' nativos en el bucle RSL de la serpina PAI-1 son VSARM, un PAI-1 intermedio modificado puede hacerse reemplazando sólo la secuencia de escisión de VEGFR de P4 y P3 para dar la molécula de serpina intermedia que contiene RRARM (SEC ID N°: 379) en las posiciones P4-P1'. Pueden hacerse rondas de selección posteriores de proteasas contra una serpina PAI-1 que adicionalmente se ha modificado en la posición P2.

Las capturas de proteasas, que incluyen serpinas, pueden modificarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica para la modificación de proteínas. Tales procedimientos incluyen mutagénesis dirigida a sitio, que incluye mutagénesis dirigida a un solo sitio o multisio. Asimismo, la expresión y purificación de polipéptidos de captura de proteasas, que incluyen polipéptidos de captura de proteasas variantes, pueden realizarse usando procedimientos convencionales en la materia para la expresión y purificación de polipéptidos. Para la expresión puede usarse cualquier sistema de células huésped que incluye, pero no se limita a, células de mamífero, células bacterianas o células de insecto. Además, los polipéptidos de captura de proteasas pueden modificarse adicionalmente para incluir secuencias adicionales que ayudan en la identificación y purificación del polipéptido de captura de proteasas. Por ejemplo, marcas de epítopos tales como, pero no se limitan a, marcas His o marcas Flag, pueden añadirse para ayudar en la purificación por afinidad del polipéptido. En algunos ejemplos, los polipéptidos de captura de proteasas

están directamente biotinilados para ayudar en la captura y/o purificación. Un procedimiento a modo de ejemplo para biotinilar un polipéptido de captura de proteasas se describe en el Ejemplo 16.

En la técnica se conocen ensayos, tales como ensayos para la función biológica de una molécula de serpina u otras capturas de proteasa, y pueden usarse para evaluar la actividad de una captura de proteasas modificada como un inhibidor en los procedimientos descritos en este documento. Tales ensayos dependen del polipéptido de captura de proteasas modificadas para su uso en los procedimientos descritos en este documento. A modo de ejemplo de tales ensayos para PAI-1 se incluyen, por ejemplo, valoración de sitios activos contra tripsina patrón o valoración de tripsina patrón tal como se ejemplifica en el Ejemplo 1. También a modo de ejemplo de tales ensayos están ensayos de inhibición de proteasas que se conocen en la técnica, por lo que la capacidad de la captura de proteasas para inhibir la escisión de un sustrato fluorogénico por una proteasa activa se usa como una lectura para la actividad de captura de proteasas. A modo de ejemplo de un ensayo de inhibición de proteasas está un ensayo de inhibición de matriptasa (MT-SP1). En un ejemplo de un ensayo tal, la captura de proteasas es una serpina. En un ejemplo específico, la serpina es AT3 o una proteína de AT3 variante hecha según los procedimientos proporcionados en este documento, el sustrato fluorogénico es RQAR-ACC. La escisión del sustrato se mide, por ejemplo, como se ejemplifica en el Ejemplo 14A. También pueden usarse ensayos de inhibición de trombina para evaluar la actividad de AT3, o AT3 modificada. Pueden diseñarse ensayos similares, o son conocidos para un experto en la materia dependiendo de la proteasa relacionada con la que un polipéptido de captura de proteasas, o variante del mismo, normalmente interactúa. Además, se espera y frecuentemente es el caso que un polipéptido de captura de proteasas modificado tenga actividad reducida con respecto a un polipéptido de captura de proteasas natural en ensayos normales de actividad o función de captura de proteasas.

D. PROTEASAS

En los procedimientos descritos en este documento se seleccionan proteasas candidatas que presentan una especificidad por sustrato alterada, normalmente por un sustrato predeterminado o deseado. Conjuntos de proteasas, proteasa mutante o porciones catalíticamente activas de las mismas se ponen en contacto con un polipéptido de captura de proteasas, tal como cualquiera descrito en este documento que incluye, por ejemplo, las serpinas o serpinas modificadas, para seleccionar proteasas con especificidad por sustrato alterada. Los conjuntos de proteasas pueden proporcionarse sobre un soporte sólido o en una mezcla homogénea tal como en disolución o suspensión. Las proteasas seleccionadas pueden aislarse como complejos estables con el polipéptido de captura de proteasas, y pueden identificarse. Las proteasas seleccionadas muestran un aumento de la eficiencia y reactividad catalítica contra el sustrato diana deseado o predeterminado, y son candidatos para su uso como agentes terapéuticos, tales como en cualquier enfermedad o trastorno en el que participa el sustrato diana.

1. Proteasas candidatas

En los procedimientos descritos en este documento se seleccionan proteasas que tienen una especificidad alterada y/o elevada por un sustrato deseado que participan en una enfermedad o trastorno. Generalmente, las proteasas son proteínas altamente específicas que hidrolizan sustratos diana mientras que dejan otros intactos. Para la escisión de sustratos naturales, las proteasas presentan un alto grado de selectividad de forma que la escisión del sustrato se favorece, mientras que se desfavorece la escisión de no sustrato (Coombs y col. (1996) J Biol. Chem., 271: 4461-4467). La selección de proteasas con una especificidad y selectividad alterada por un sustrato diana deseado permitiría el uso de proteasas como agentes terapéuticos para activar o inactivar selectivamente proteínas para reducir, mejorar o prevenir una enfermedad o trastorno. Las proteasas diana usadas en los procedimientos de selección de captura de proteasas descritos en este documento pueden ser cualquier clase conocida de proteasas que pueda hidrolizar enlaces peptídicos con los que interactúa la captura de proteasas. Normalmente, para las serpinas, tales proteasas son generalmente serina o cisteína proteasas con las que las serpinas reaccionan para formar un complejo intermedio covalente. A modo de ejemplo de serina y cisteína proteasas está cualquier proteasa expuesta en la Tabla 7 más adelante. Normalmente, en los procedimientos descritos en este documento se usa una biblioteca de proteasas modificadas para seleccionar una proteasa variante que presenta un aumento de especificidad o selectividad por una captura de proteasas diana, o variante de la misma, tal como una serpina, o variante de la misma.

En el procedimiento de selección descrito en este documento se describen proteasas a modo de ejemplo que pueden usarse, y/o modificarse para usarse, e incluyen polipéptidos truncados de las mismas que incluyen una porción catalíticamente activa. Proteasas candidatas a modo de ejemplo se enumeran en la Tabla 7 y se describen en este documento (véase, por ejemplo, www.merops.sanger.ac.uk). En la tabla se representan los N°) para la secuencia de nucleótidos y la secuencia de precursor de aminoácidos codificados para cada una de las proteasas candidatas a modo de ejemplo. Los aminoácidos codificados correspondientes a la secuencia de péptidos o propéptidos señal para dar una proteína madura también están anotados en la tabla. Además, también están anotados los aminoácidos que designan el dominio de proteasa (es decir, la unidad de peptidasa), ya que son los residuos de sitio activo que constituyen, por ejemplo, la tríada catalítica de la proteasa respectiva. Como las interacciones son dinámicas, las posiciones de aminoácidos anotadas son para referencia y ejemplificación. Las posiciones anotadas reflejan un intervalo de loci que varía 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos. También existen variaciones entre variantes alélicas y variantes de especies. Aquellos expertos en la materia pueden identificar

secuencias correspondientes por comparación visual u otras comparaciones que incluyen algoritmos y software fácilmente disponibles.

- 5 Las proteasas candidatas para la selección normalmente son formas naturales o modificadas o variantes de una proteasa candidata natural, o porción catalíticamente activa de la misma, que incluyen variante alélica e isoformas de una proteína cualquiera. Una proteasa candidata puede producirse o aislarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica que incluye aislamiento de fuentes naturales, aislamiento de proteínas recombinantemente producidas en células, tejidos y organismos, y por procedimientos recombinantes y mediante procedimientos que incluyen etapas por ordenador, procedimientos sintéticos y cualquier procedimiento conocido para aquellos expertos
- 10 en la materia. La modificación de una proteasa candidata para la selección puede ser mediante cualquier procedimiento conocido para un experto en la materia, tal como cualquier procedimiento descrito más adelante en este documento.

Tabla 7: Proteasas candidatas a modo de ejemplo

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propéptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
Serina proteasa: Familia de las quimotripsinas	S01.010	granzima B, tipo humano	M17016	39	P10144	40	1-18 / 19-20	21-247 (64, 108, 203)
	S01.011	Testisina	NM_006799 (v1)	41	NP_006790	42	1-19 / 20-41	42-288 (82, 137, 238)
			NM_144956 (v2)	43	NP_659205	44		
			NM_144957 (v3)	45	NP_659206	46		
	S01.015	triptasa beta 1 (Homo sapiens) (III)	NM_003294	47	NP_003285	48	1-18/19-30	31-274 (74, 121, 224)
	S01.017	callicreina hk5	NM_012427	49	NP_036559	50	1-22/	67-292 (108,153, 245)
	S01.019	Corina	NM_006587	51	NP_006578	52		802-1037 (843,892, 985)
	S01.020	callicreina 12	NM_019598 (v1)	53	NP_062544	54	1-17/	22-248 (843,892, 985)
			NM_145894 (v2)	55	NP_665901	56		
			NM_145895 (v3)	57	NP_665902	58		
	S01.021	Oriteasa DESC 1	AF064819	59	AAF04328	60		191-422 (231, 276, 372)
	S01.028	triptasa gamma 1	NM_012467	61	NP_036599	62	1-19/	38-272 (78, 125, 222)

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propéptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	S01.029	calicreina hK14	NM_022046	63	Q9P0G3	64	1-18/19-24	25-249 (67,111, 204)
	S01.033	serina proteasa de unión a hialuronano (proteína similar al activador de HGF)	NM_004132	65	NP_004123	66	1-23 /	314-557 (362, 411, 509)
	S01.034	proteasa de membrana, serina 4	NM_019894	67	NP_06394.7	68		205-436 (245,290, 387)
			NM_183247	69	NP_89907.0	70		
	S01.054	triptasa delta 1 (Homo sapiens)	NM_012217	71	Q9BZ13	72	1-18/19-30	31-235 (74, 121, 224)
	S01.074	Marapsina	NM_031948	73	NP_114154	74	1-22/23-34	35-279 (75, 124, 229)
	S01.075	Homólogo 2 de triptasa (Homo sapiens)	BC036846	75	AAN04055	76		37-281 (77, 126, 231)
	S01.076	Homólogo 3 de triptasa (Homo sapiens)	Sólo putativo AC005570 (Cósmido 407D8)	77		78		67-304 (107, 213, 259)
	S01.079	proteasa de membrana, serina 3	NM_024022 (vA)	79	NP_076927	80		217-451 (257,304, 401)
			NM_032401 (vB)	81	NP_115777	82		
			NM_032404 (vC)	83	NP_115780			
			NM_032405 (vD)	85	NP_115781	86		

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propeptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	S01.081	calicreína hK15 (Homo sapiens)	NM_023006 (v1) NM_138563 (v2) NM_138564 (v3) NM_017509 (v4)	87 89 91 93	NP_07538 2 NP_61263 0 NP_61263 1 NP_05997 9	88 90 92 94	1-16/17-21	22-256 (62, 106, 209)
	S01.085	Peptidasa mername-AA031 (deducida de EST por MEROPS)	BC035384	95	AAH35384	96		1-241 (56, 101, 195)
	S01.087	serina proteasa mosaico de tipo membrana	AB048796	97	BAB39741	98		321-556 (361, 409, 506)
	S01.088	peptidasa mername-AA038	Sólo putativa AL136097 (clon RP11-62C3)		CAC12709	99		10-142 (50,101)
	S01.098	peptidasa mername-AA128 (deducida de EST por MEROPS)	Sólo putativa BC041609	100	AAH41609	101		33-202 (50,152)
	S01.127	tripsina catiónica (tipo 1 de Homo sapiens) (catiónica)	NM_002769	102	NP_002760	103	1-15/16-23	24-246 (63, 107, 200)
	S01.131	Elastasa neutrófila	NM_001972	104	NP_001963	105	1-27/28-29	30-249 (70, 117, 202)
	S01.132	serina proteasa 3 asociada a lectina de unión a manano	AF284421	106	AAK84071	107	1-19/	449-710 (497,553, 664)

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propéptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	S01.133	cathepsina G	NM_001911	108	NP_001902	109	1-18/19-20	21-245 (64, 108, 201)
	S01.134	mieloblastina (proteínasa 3)	NM_002777	110	NP_002768	111	1-25/26-27	28-250 (71, 118, 203)
	S01.135	granzima A (CTLA3)	NM_006144	112	NP_006135	113	1-26/27-28	29-261 (69, 114, 212)
	S01.139	granzima M	NM_005317	114	NP_005308	115	1-23/24-25	26-256 (66, 111, 207)
	S01.140	quimasa (tipo humano)	NM_001836	116	NP_001827	117	1-19/21-21	22-247 (66, 110, 203)
	S01.143	triptasa alfa (I)	NM_003294	118	NP_003285	119	1-18/19-30	31-274 (74, 121, 224)
	S01.146	granzima K	NM_002104	120	NP_002095	121	1-24/26-26	27-261 (67, 116, 214)
	S01.147	granzima H (CTLA1)	NM_033423	122	NP_219491	123	1-18/19-20	21-246 (64, 108, 202)
	S01.152	quimotripsina B	M24400	124	P17538	125	1-18	34-263 (75, 120, 213)
	S01.153	elastasa pancreática	NM_00971	126	NP_001962	127	1-8/9-18	19-256 (63, 111, 206)
	S01.154	endopeptidasa pancreática E (A)	NM_005747	128	NP_005738	129	1-15/16-28	29-270 (73, 123, 217)
	S01.155	elastasa pancreática II (IIA)	M16652	130	AAA52380	131	1-16/7-28	29-269 (73, 121, 216)

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propeptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	S01.156	Enteropeptidasa	NM_002772	132	NP_002763	133		785-1019 (825,876, 971)
	S01.157	quimotripsina C	NM_007272	134	NP_009203	135	1-16/17-29	30-268 (74,121, 216)
	S01.159	Prostiasina	NM_002773	136	NP_002764	137	1-29/30-32	45-288 (85, 134, 238)
	S01.160	calicreína 1	NM_002257	138	NP_002248	139	1-18/19-24	25-261 (65, 120, 214)
	S01.161	calicreína hK2 (Homo sapiens)	NM_005551 (v1)	140	NP_005542	141	1-18/19-24	25-260 (65,120, 213)
			NM_001002231 (v2)	142	NP_001002231	143		
			NM_001002232 (v3)	144	NP_001002232	145		
	S01.162	calicreína 3	NM_001648 (v1)	146	NP_001639 (v1)	147	1-17/18-24	25-260 (65,120, 213)
			NM_001030047 (v3)	148	NP_001025218 (v3)	149		
			NM_001030048 (v4)	150	NP_001025219 (v4)	151		
			NM_001030049 (v5)	152	NP_001025220 (v5)	153		
			NM_001030050 (v6)	154	NP_001025221 (v6)	155		

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propéptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	S01.174	Mesotripsina	NM_002771	156	NP_002762	157	1-24/	24-246 (63,107, 200)
	S01.205	endopeptidasa pancreática E forma B (B)	NM_007352	158	NP_031378	159	1-15/16-28	29-270 (73, 123, 217)
	S01.206	elastasa pancreática II forma B (Homo sapiens) (IIB)	NM_015849	160	NP_056933	161	1-16/17-28	29-269 (73,121, 216)
	S01.211	factor de coagulación Xlla	NM_000505	162	NP_000496	163	1-19/	373-615 (412,461, 563)
	S01.212	calicreína de plasma (KLK3)	NM_000892	164	NP_000883	165	1-19/	391-628 (434,483, 578)
	S01.213	factor de coagulación Xia (HAF)	NM_000128 (v1) NM_019559 (v2)	166 168	NP_000119 (v1) NP_062505 (v2)	167 169	1-18/	388-625 (431, 480, 575)
	S01.214	factor de coagulación IXa	NM_000133	170	NP_000124	171	1-28/29-46	227-461 (267,315, 411)
	S01.215	factor de coagulación Vlla	NM_000133(v1) NM_019616 (v2)	172 174	NP_000122 (v1) NP_062562 (v2)	173 175	1-20/21-60	213-454 (253,302, 404)
	S01.216	factor de coagulación Xa	NM_000504	176	NP_000495	177	1-31/32-40	235-469 (276,322, 419)

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propeptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	S01.217	Trombina	NM_000506	178	NP_000497	179	1-24/25-43	364-620 (406, 462, 568)
	S01.218	proteína C (activada)	NM_000312	180	NP_000303	181	1-32/33-42	212-452 (253,299, 402)
	S01.223	Acrosina	NM_001097	182	NP_001088	183	1-19	43-292 (88, 142, 240)
	S01.224	Hepsina	NM_182983 (v1)	184	NP_892028	185		163-407 (203,257, 353)
	S01.228	activador del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFA)	NM_002151 (v2)	186	NP_002142	187		
	S01.231	activador de u-plasminógeno (uPA)	NM_001528	188	NP_001519	189	1-35/36-372	408-648 (447, 497, 598)
	S01.232	activador de t-plasminógeno (tPA)	NM_002658	190	NP_002649	191	1-20/	179-426 (224,275, 376)
			NM_000930 (v1)	192	NP_000921 (v1)	193	1-23/24-32 y 33-35	311-562 (357,406, 513)
			NM_000931 (v2)	194	NP_000922 (v2)	195		
			NM_033011 (v3)	196	NP_127509 (v3)	197		

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID N° DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID N° DE AA:	Secuencia señal/de propéptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	S01.233	Plasmina	NM_000301	198	NP_000292	199	1-19/20-97	581-810 (622, 665, 760)
	S01.236	Neurosina	NM_002774 (vA) NM_001012964 (vB) NM_001012965 (vC) NM_001012966 (vD)	200 202 204 206	NP_002765 NP_001012982 NP_001012983 NP_001012984	201 203 205 207	1-16/17-21	22-244 (62,106, 197)
	S01.237	Neurotripsina	NM_003619	208	NP_003610	209	1-20/	631-875 (676,726, 825)
	S01.242	tripsina beta 2 (Homo sapiens) (1)	NM_024164	210	NP_077078	211	-30/	31-268
	S01.244	Neuropsina	NM_007196 (v1) NM_144505 (v2) NM_144506 (v3) NM_144507 (v4)	212 214 216 218	NP_009127 (v1) NP_653088 (v2) NP_653089 (v3) NP_653090 (v4)	213 215 217 219	1-28/29-32	33-258 (73,120, 212)
	S01.246	callicreina hK 10 (Homo sapiens)	NM_002776 (v1) NM_145888 (v2)	220 222	NP_002767 NP_665895	221 223	1-30/	35-276 (86, 137, 229)

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propéptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	S01.247	Epiteliasina	NM_005656	224	NP_005647	225		256-491 (296, 345, 441)
	S01.251	Prostasa	NM_004917	226	NP_004908	227	1-26/27-30	31-254 (71, 116, 207)
	S01.252	Serina proteinasa 2 cerebral	NM_022119	228	NP_071402	229	1-32	50-292 (90, 141, 242)
	S01.256	Quimopasina	NM_001907	230	NP_001898	231	1-18/19-33	34-264 (75, 121, 214)
	S01.257	callicreina 11	NM_006853 (v1) NM_144947 (v2)	232 234	NP_006844 (v1) NP_659196 (v2)	233 235	1-50/51-53	22-250 (62, 110, 203)
	S01.258	tripsina aniónica (Homo sapiens) (II) (TRY2, TRY8, TRYP2)	NM_002770	236	Nip_002761	237	1-15/16-23	24-246 (63, 107, 200)
	S01.291	peptidasa LOC144757 (Homo sapiens)	BC048112 putativa	238	AAH48112	239		78-319 (122, 171, 268)
	S01.292	Peptidasa de mername-AA169	BN000133	240	CAD67985	241	1-19	175-406 (215, 260, 356)
	S01.294	Peptidasa de mername-AA171	Putativa sin ADN			242		
	S01.298	Peptidasa de mername -AA174 (TRY6)	Putativas sin sec de ADN		AAC80208	243		24-246 (63, 107, 200)

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propéptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	S01.299	Peptidasa de mername-AA175	NM_198464	244	NP_940866	245		68-302 (108,156, 250)
	S01.300	Enzima quimotriptica de estrato córneo (SCCE)	NM_005046 (v1) NM_139277 (v2)	246 248	NP_005037 NP_644806	247 249	1-22/23-29	30-250 (70,112, 205)
	S01.301	enzima similar a tripsina, respiratoria (proteasa transmembrana, serina 11 D)	NM_004262	250	NP_004253	251		187-471 (227,272, 368)
	S01.302	Matripasa (MTSP1)	AF118224	252	AAD42765	253		615-855 (656,711, 805)
	S01.306	callicreína hK13	NM_015596	254	NP_056411	255	1-16/	36-263 (76, 124, 218)
	S01.307	callicreína hK9 (numeración humana)	NM_012315	256	NP_036447	257	1-15/	23-250 (63, 111, 204)
	S01.308	Peptidasa de mername-AA035	NM_153609	258	NP_705837	259		49-283 (89, 140, 234)
	S01.309	proteinasa de la vena umbilical	NM_007173	260	NP_009104	261	1-23/	95-383 (175,246, 316)
	S01.311	Proteinasa LCLP (LCLP (extremo N))	Fragmento de péptido sin ADN		P34168	262		1-26 (0)
	S01.313	Espinesina	N_030770	263	NP_110397	264		218-455 (258, 308, 405)

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propéptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	S01.318	Peptidasa de mername-AA178	NM_183062	265	NP_898885	266	1-33/	53-288 (93, 143, 238)
	S01.320	Peptidasa de mername-AA180	BN000120	267	CAD66452	268	1-23/	52-301 (92, 142, 240)
	S01.322	Peptidasa de mername-AA182	BN000128	269	CAD67579	270	1-17/	8-298 (87, 139, 237)
	S01.414	Peptidasa de mername-AA122 (deducida de EST por MEROPS)	AK075142 putativa	271	BAC11431	272		1-177 (12,64, 168)
	C01.032	Catepsina L	X12451	273	P07711	274	1-17/18-113	113-333 (132, 138, 276,300)
Cisteína proteasa: Familia de la papaina	C01.009	Catepsina V	U13665	275	060911	276	1-17/18-113	114-334 (132,138, 277,301)
	C01.036	Catepsina K	S93414	277	P43235	278	1-15/16-114	115-329 (133,139, 276,296)
	C01.034	Catepsina S	AJ007331	279	P25774	280	1-16/17-114	115-331 (133, 139, 278, 298)
	C01.018	Catepsina F	M14221	281	Q9UBX1	282	1-19/20-270	271-484 (289,295, 431,451)

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID N° DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID N° DE AA:	Secuencia señal/de propéptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	C01.060	Catepsina B	M15203	283	P07858	284	1-17/18-79	80-331 (102,108, 278,298)
	C01.001	Papaína	M84342	285	P00784	286	1-18/19-133	135-342 (158, 292,308)
	C01.075	Cruzaina (cruzapaina)	Y14734	287	P25779	288	123-467/	124-334 (147,284, 304, 111-370 (137, 168, 325)
Serina proteasa: Familia de las subtilisinas	S08.001	Precursor de la subtilisina Carlsberg	X03341	290	P00780	289	1-29/30-105	6-266 (32, 64, 221)
	S08.002	Subtilisina (mesentericopeptidasa alcalina)			P07518	291		6-260 (32, 62, 215)
	S08.003	Subtilisina savinasa (proteasa alcalina)			P29600	292		13-264 (38, 71, 225)
	S08.007	Termitasa			P04072	293		134-391 (160, 193, 347)
	S08.009	Precursor de la serina proteinasa termófila (Ak,1 proteasa)	L29506	295	Q45670	294	1-24/25-121	120-339, 458-560 (130, 193, 512)
	S08.020	Precursor de la C5a peptidasa	J05229	297	P15926	296	1-31/	164-457
	S08.021	Fervidolisina	AY035311	299	AAK6155 2	298		

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propéptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	S08.035	Precursor de la subtilisina J	M64743	301	P29142	300	1-29/30-106	112-372 (138, 170, 327)
	S08.036	Precursor de la subtilisina E	K01988	303	P04189	302	1-23/24-106	112-372 (138, 170, 327)
	S08.037	Subtilisina DY			P00781	304		6-257 (32,63, 220)
	S08.054	Precursor de la proteinasa K (endopeptidasa K)	X14689	306	P06873	305	1-15/16-105	134-373 (144, 174, 329)
	S08.050	Precursor de la serina exoproteasa A alcalina	M25499	308	P16588	307	1-21/22-141	155-412 (180, 213, 363)
	S08.060	Precursor de la serina proteasa epip del procesamiento de péptidos conductores de epidermina	X62386	310	P30199	309	1-23/24-?	123-451 (149, 194, 402)
	S08.063	Precursor de la proteasa del sitio 1 del factor de transcripción unido a membrana (proteasa de sitio 1, isoenzima 1 de subtilisina/kexina, SKI-1)	AF078105	312	Q9Z2A8	311	1-14/18-186	179-473 (218, 249, 338,414)
	S08.066	Precursor de la proteinasa alcalina (ALP)	M87516	314	Q03420	313	1-20/21-120	121-409 (161, 192, 353)
	S08.094	Precursor de la serina proteasa extracelular	M13469	316	P09499	315	1-27/	50-389 (76, 112, 341)

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propéptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	S08.090	Tripeptidil-peptidasa II (TPP-II)	AF035251	318	Q9V6K1	317		5-509 (131, 359, 549)
	S08.114	Precursor de la proteasa vpr extracelular menor	M76590	320	P29141	319	1-28/29-160	163-365, 487-586 (189,233, 534)
	S08.116	Precursor de la proteinasa tipo PIII (lactocepina)	J04962	322	P15292	321	1-33/34-187	190-379, 584-628 (217, 281, 620)
	S08.048	Proteasa 1 similar a furina, isoforma del precursor de I-CRR	M81431	324	P30430	323	1-?/?-309	376-646 (372, 413, 587)
	S08.070	Precursor de kexina (proteasa KEX2) (endoproteasa 1 similar a Kex2, dKLIP-1)	M22870	326	P13134	325	1-19/20-109 y 110-113	149-445 (175, 213, 385)
	S08.071	Precursor de furina (PACE)	X17094	328	P09958	327	1-24/25-107	131-421 (153, 194, 295, 368)
	S08.075	Proteasa PACE4 similar a subtilisina/kexina (precursor de tipo 6 de proproteína convertasa subtilisina/kexina)	M80482	330	P29122	329	1-63/64-149	182-473 (205, 246, 347,420)
	S08.079	Precursor de proteasa dependiente del calcio (tripsina)	X56955	332	P23916	331		254-521 (233, 270, 466)

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propéptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
Cisteína proteasa: Familia de las caspasas	C14.001	Precursor de la caspasa 1 (interleucina-1 beta convertasa, IL-1 BC)	U14647	334	P43527	333	/1-118	120-404 (236, 284)
	C14.002	Precursor de la proteína 3 de muerte celular	L29052	336	P42573	335		235-495 (313, 358)
	C14.003	Precursor de la caspasa 3 (apopainina, cisteína proteasa)	U13737	338	P42574	337	/1-9	10-277 (121, 163)
	C14.004	Precursor de la caspasa 7 (proteasa 3 apoptótica similar a ICE, proteasa apoptótica Mch-3)	U39613	340	P55210	339	/1-23	29-303 (144, 186)
	C14.005	Precursor de la caspasa 6 (proteasa apoptótica Mch-2)	U20536	342	P55212	341	/1-23	24-292 (121, 163)
	C14.006	Precursor de la caspasa 2 (proteasa ICH-1, proteína NEDD2)	D28492	344	P29594	343	/1-169	170-432 (277, 320)
	C14.007	Precursor de la caspasa 4 (proteasa ICH-2, proteasa TX)	Z49810	346	P49662	345	/1-80	93-377 (210, 258)
	C14.008	Precursor de la caspasa 5 (proteasa ICH-3, proteasa TY, ICE(rel)-III)	U28015	348	P51878	347	/1-120	134-418 (251, 299)
	C14.009	Precursor de la caspasa 8 (ICE similar a FADD, proteasa 5 apoptótica similar a ICE)	X98172	350	Q14790	349	/1-216	193-479 (317, 360)

Tipo de proteasa	Código Merops	Nombre	Nº de acc. de nt:	SEC ID Nº DE NT:	Nº de acc. de aa:	SEC ID Nº DE AA:	Secuencia señal/de propéptidos	Unidad de peptidasa (residuos de sitio activo)
	C14.010	Precursor de la caspasa 9 (ICE-LAP6, proteasa Mch-6 apoptósica)	U56390	352	P55211	351		117-416 (237, 287)
	C14.011	Precursor de la caspasa 10	U60519	354	Q92851	353	/1-219	243-514 (358, 401)
	C14.012	Caspasa 11 (precursores de la caspasa 4)	U59463	356	P70343	355	/1-80	89-373 (206, 254)
	C14.013	Precursor de la caspasa 12	Y13090	358	008736	357		133-419 (250,298)
	C14.015	Precursor de la caspasa (insecto) (drlCE)	Y12261	360	001382	359	/1-28	(169, 211)
	C14.016	Precursor de la caspasa 1 (insecto)	AF001464	362	002002	361	/1-33	(154, 196)
	C14.017	Precursor de la caspasa 13	AF078533	364	073601	363		(210, 258)
	C14.018	Precursor de la caspasa 14	AF097874	366	P31944	365		1-242 (89, 132)
	C14.019	Precursor de la caspasa Nc (caspasa DRONC similar a NEDD2)	AF104357	368	Q9XYF4	367	/1-134	(271,318)
	C14.026	Paracaspasa de la proteína 1 de translocalización de linfoma MALT (paracaspasa)	AF130356	370	Q9UDY8	369		337-523 (413, 464)
	C14.971	CASP8 y precursor del regulador de la apoptosis similar a FADD (c-FLIP)	U85059	372	O15519	371		260-433 (315, 363)

a. Clases de proteasas

Las proteasas (también denominadas en lo sucesivo proteinasas o peptidasas) son enzimas de degradación de proteínas que reconocen secuencias de aminoácidos o un sustrato de polipéptido dentro de una proteína diana. Tras el reconocimiento de la secuencia de sustrato de aminoácidos, las proteasas catalizan la hidrólisis o escisión de un enlace peptídico dentro de una proteína diana. Tal hidrólisis de una proteína diana, dependiendo de la localización del enlace peptídico dentro del contexto de la secuencia de longitud completa de la secuencia diana, puede inactivar, o en algunos casos activar, una diana.

Las proteasas se clasifican basándose en la forma en la que atacan la proteína, tanto exo- como endo-proteasas. Las proteinasas o endopeptidasas atacan dentro de la proteína para producir péptidos grandes. Las peptidasas o exopeptidasas atacan extremos o fragmentos de proteína para producir péptidos y aminoácidos pequeños. Las peptidasas se clasifican basándose en su patrón de acción: la aminopeptidasa escinde aminoácidos del extremo amino; la carboxipeptidasa escinde aminoácidos del extremo carboxilo, la dipeptidilpeptidasa escinde dos aminoácidos; la dipeptidasa fracciona un dipéptido, y la tripeptidasa escinde un aminoácido de un tripéptido. La mayoría de las proteasas son pequeñas de 21.000 a 45.000 Dalton. Muchas proteasas se sintetizan y se secretan como formas inactivas llamadas zimógenos y posteriormente se activan por proteólisis. Esto cambia la arquitectura del sitio activo de la enzima.

Las proteasas usan varios tipos de mecanismos catalíticos distintos (Barret y col. (1994) *Meth. Enzymol.* 244:18-61; Barret y col. (1994) *Meth. Enzymol.* 244:461-486; Barret y col. (1994) *Meth. Enzymol.* 248:105-120; Barret y col. (1994) *Meth. Enzymol.* 248:183-228). Basándose en su mecanismo catalítico, las carboxipeptidasas se subdividen en carboxipeptidasas de tipo serina, metalo y cisteína y las endopeptidasas son las serina-, cisteína-, aspártico-, treonina- y metalo-endopeptidasas. Las serina peptidasas tienen un residuo de serina que participa en el centro activo, las aspártico tienen dos ácidos aspárticos en el centro catalítico, las peptidasas de tipo cisteína tienen un residuo de cisteína, las peptidasas de tipo treonina tienen un residuo de treonina y las metalo-peptidasas usan un ión metálico en el mecanismo catalítico. Generalmente, las proteasas pueden dividirse en clases basándose en su actividad catalítica de forma que las clases de proteasas puedan incluir serina, cisteína, aspártico, treonina o metalo-proteasas. La actividad catalítica de las proteasas se requiere para escindir un sustrato diana. Por tanto, la modificación de una proteasa para alterar la actividad catalítica de una proteasa puede afectar (es decir, modificar la especificidad/selectividad) la capacidad de una proteasa para escindir un sustrato particular.

Cada proteasa tiene una serie de aminoácidos que reviste el sitio activo y hace el contacto directo con el sustrato. Las estructuras cristalográficas de las peptidasas muestran que el sitio activo está comúnmente localizado en un surco sobre la superficie de la molécula entre dominios estructurales adyacentes, y la especificidad por sustrato está dictada por las propiedades de los sitios de unión dispuestos a lo largo del surco a uno o ambos lados del sitio catalítico que es el responsable de la hidrólisis del enlace escindible. Por consiguiente, la especificidad de una peptidasa se describe por la capacidad de cada subsitio para acomodar una cadena lateral de un único residuo de aminoácido. Los sitios están numerados desde el sitio catalítico, S1, S2...Sn hacia el extremo N del sustrato, y S1', S2'...Sn' hacia el extremo C. Los residuos que acomodan se numeran P1, P2...Pn, y P1', P2'...Pn', respectivamente. La escisión de una proteína diana está catalizada entre P1 y P1' en la que los residuos de aminoácidos de los extremos N a C del sustrato de polipéptido están marcados (Pi, ..., P3, P2, P1, P1', P2', P3', ..., Pj) y sus sitios de reconocimiento de unión correspondientes en la proteasa están marcados (Si, ..., S3, S2, S1, S1', S2', S3', ..., Sj) (Schechter y Berger (1967) *Biochem Biophys Res Commun* 27:157-162). Por tanto, P2 interactúa con S2, P1 con S1, P1' con S1', etc. Por consiguiente, la especificidad por sustrato de una proteasa procede de las posiciones S1-S4 en el sitio activo, en el que la proteasa está en contacto con los residuos P1-P4 de las secuencias del sustrato de péptido. En algunos casos, hay pocas (si las hay) interacciones entre los sitios S1-S4 del sitio activo, de forma que cada sitio parece que reconoce y se une al residuo correspondiente en la secuencia del sustrato de péptido independiente de los otros sitios. Por tanto, los determinantes de la especificidad pueden cambiarse en un sitio sin afectar la especificidad del otro sitio. Basándose en numerosas estructuras y modelados de miembros de familias, los residuos de superficie que contribuyen a la especificidad por sustrato extendida y otras interacciones secundarias con un sustrato se han definido por muchas proteasas que incluyen proteasas de las familias de serina, cisteína, aspártico, metalo- y treonina (véanse, por ejemplo Wang y col., (2001) *Biochemistry* 40(34): 10038-46; Hopfner y col., (1999) *Structure Fold Des.* 7(8):989-96; Friedrich y col. (2002) *J Biol Chem.* 277(3):2160-8; Waugh y col., (2000) *Nat Struct Biol.* 7(9):762-5; Cameron y col., (1993) *J Biol Chem.* 268:11711; Cameron y col., (1994) *J Biol Chem.* 269: 11170).

i. Serina proteasas

Las serina proteasas (SP), que incluyen enzimas secretadas y enzimas secuestradas en orgánulos de almacenamiento citoplásmico, tienen una variedad de funciones fisiológicas que incluyen coagulación de la sangre, cicatrización, digestión, respuestas inmunitarias e invasión tumoral y metástasis. Por ejemplo, la función de la quimotripsina, tripsina y elastasa en el tracto digestivo; el factor 10, factor 11, trombina y plasmina participan en la coagulación y la cicatrización; y C1r, C1s y las C3 convertasas desempeñan una función en la activación del complemento.

- Una clase de proteínas de la superficie celular designada serina proteasas de transmembrana de tipo II son proteasas que son proteínas ancladas a la membrana con dominios extracelulares. Como proteínas de la superficie celular desempeñan una función en la transducción de señales intracelulares y en la mediación de acontecimientos proteolíticos de la superficie celular. Otras serina proteasas están unidas a la membrana y funcionan de un modo similar. Otras son secretadas. Muchas serina proteasas ejercen su actividad tras la unión a los receptores de la superficie celular y de ahí que actúen en superficies celulares. La proteólisis de la superficie celular es un mecanismo para la generación de proteínas biológicamente activas que median en una variedad de funciones celulares.
- Las serina proteasas, que incluyen serina proteasas secretadas y de transmembrana, participan en procedimientos que incluyen desarrollo y progresión neoplásica. Aunque la función precisa de estas proteasas no se ha elaborado completamente, las serina proteasas e inhibidores de las mismas participan en el control de muchos procesos fisiológico intra- y extracelulares que incluyen acciones degradativas en invasión de células cancerosas y propagación metastásica, y neovascularización de tumores que participan en la progresión tumoral. Las proteasas participan en la degradación y remodelación de la matriz extracelular (ECM) y contribuyen a la remodelación de tejido, y son necesarias para la invasión del cáncer y metástasis. Se ha mostrado que la actividad y/o expresión de algunas proteasas establece una correlación entre progresión y desarrollo tumoral.
- Se han identificado más de 20 familias (denotadas S1-S27) de serina proteasa, agrupándose éstas en 6 clanes (SA, SB, SC, SE, SF y SG) basándose en la similitud estructural y otras pruebas funcionales (Rawlings ND y col. (1994) *Meth. Enzymol.* 244: 19-61). Hay similitudes en los mecanismos de reacción de varias serina peptidasas. Los clanes de quimotripsina, subtilisina y carboxipeptidasa C tienen una tríada catalítica de serina, aspartato y histidina en común: la serina actúa de nucleófilo, el aspartato de electrófilo y la histidina de base. Las orientaciones geométricas de los residuos catalíticos son similares entre familias, a pesar de los diferentes plegamientos de proteínas. Las disposiciones lineales de los residuos catalíticos reflejan comúnmente relaciones de clanes. Por ejemplo, la tríada catalítica en el clan de la quimotripsina (SA) es HDS ordenado, pero es DHS ordenado en el clan de la subtilisina (SB) y SDH en el clan de la carboxipeptidasa (SC).
- Ejemplos de serina proteasas de la superfamilia de las quimotripsinas incluyen activador del plasminógeno de tipo tejido (tPA), tripsina, proteasa similar a tripsina, quimotripsina, plasmina, elastasa, urocinasa (o activador del plasminógeno de tipo urinario, u-PA), acrosina, proteína C activada, C1 esterasa, cathepsina G, quimasa y proteasas de la cascada de la coagulación de la sangre que incluyen calicreína, trombina, y los factores VIIa, IXa, Xa, XIa y XIIa (Barret, A.J., In: *Proteinase Inhibitors*, Ed. Barrett, A.J., Y col., Elsevier, Amsterdam, páginas 3-22 (1986); Strassburger, W. y col., (1983) *FEBS Lett.*, 157 :219-223; Dayhoff, M.O., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol 5, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Md. (1972); y Rosenberg, R.D. y col. (1986) *Hosp. Prac.*, 21: 131-137).
- La actividad de proteasas en la familia de las serina proteasas depende de un conjunto de residuos de aminoácidos que forman su sitio activo. Uno de los residuos es siempre una serina; de ahí su designación como serina proteasas. Por ejemplo, quimotripsina, tripsina y elastasa comparten una estructura similar y su residuo activo de serina está en la misma posición (Ser-195) en los tres. A pesar de sus similitudes, tienen diferentes especificidades por sustrato; escinden diferentes enlaces peptídicos durante la digestión de proteínas. Por ejemplo, la quimotripsina prefiere una cadena lateral aromática en el residuo cuyo carbono del carbonilo sea parte del enlace peptídico que va a escindirse. La tripsina prefiere un residuo de Lys o Arg positivamente cargado en esta posición. Las serina proteasas se diferencian notablemente en sus propiedades de reconocimiento de sustratos: algunas son altamente específicas (es decir, las proteasas que participan en la coagulación de la sangre y el sistema de inmunocomplemento); algunas sólo son parcialmente específicas (es decir, las proteasas digestivas de mamífero tripsina y quimotripsina); y otras, como la subtilisina, una proteasa bacteriana, son completamente no específicas. A pesar de estas diferencias en la especificidad, el mecanismo catalítico de las serina proteasas está bien conservado.
- El mecanismo de escisión de una proteína diana por una serina proteasa se basa en el ataque nucleófilo del enlace peptídico elegido como diana por una serina. Las moléculas de cisteína, treonina o agua asociadas a aspartato o metales también pueden desempeñar esta función. En muchos casos, la propiedad nucleófila del grupo está mejorada por la presencia de una histidina, mantenida en un "estado aceptor de protones" por un aspartato. Cadenas laterales alineadas de serina, histidina y aspartato construyen la tríada catalítica común a la mayoría de las serina proteasas. Por ejemplo, los residuos de sitio activo de la quimotripsina, y de las serina proteasas que son miembros de la misma familia que la quimotripsina, tales como, por ejemplo, MTSP-1, son Asp102, His57 y Ser195.
- Los dominios catalíticos de todas las serina proteasas de la superfamilia de las quimotripsinas tienen tanto homología de secuencias como homología estructural. La homología de secuencias incluye la conservación de: 1) los residuos de sitio activo característicos (por ejemplo, Ser195, His57 y Asp102 en el caso de tripsina); 2) el agujero de oxianión (por ejemplo, Gly193, Asp194 en el caso de tripsina); y 3) los residuos de cisteína que forman puentes disulfuro en la estructura (Hartley, B.S., (1974) *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 24: 152-182). La homología estructural incluye 1) un plegamiento común caracterizado por dos estructuras de llave griega (Richardson, J. (1981) *Adv. Prot. Chem.*, 34:167-339); 2) una disposición común de residuos catalíticos; y 3) preservación detallada de la estructura dentro del núcleo de la molécula (Stroud, R.M. (1974) *Sci. Am.*, 231: 24-88).

En toda la familia de las quimotripsinas de las serina proteasas, la interacción del esqueleto entre el sustrato y la enzima está completamente conservada, pero las interacciones de las cadenas laterales varían considerablemente. La identidad de los aminoácidos que contienen los sitios S1-S4 del sitio activo determina la especificidad por sustrato de ese sitio particular. El injerto de aminoácidos de una serina proteasa en otra del mismo plegamiento

5 modifica la especificidad de los unos con respecto a los otros. Normalmente, los aminoácidos de la proteasa que contienen los sitios S1-S4 son aquellos que tienen cadenas laterales dentro de 4 a 5 angstroms del sustrato. Las interacciones que estos aminoácidos tienen con el sustrato de proteasa se llaman generalmente interacciones de “primera capa” debido a que se ponen directamente en contacto con el sustrato. Sin embargo, aquí puede haber interacciones de “segunda capa” y de “tercera capa” que en último lugar posicionan los aminoácidos de la primera

10 capa. Los efectos de unión al sustrato de la primera capa y segunda capa se determinan principalmente por bucles entre dominios de barril beta. Debido a que estos bucles no son elementos del núcleo de la proteína, la integridad del plegamiento se mantiene mientras que las variantes de bucle con especificidades por sustrato novedosas puedan seleccionarse durante el transcurso de la evolución para satisfacer nichos metabólicos o reguladores necesarios a nivel molecular. Normalmente para serina proteasas, los siguientes aminoácidos en la secuencia

15 primaria son determinantes de la especificidad: 195, 102, 57 (la tríada catalítica); 189, 190, 191, 192 y 226 (S1); 57, el bucle entre 58 y 64, y 99 (S2); 192, 217, 218 (S3); el bucle entre Cys168 y Cys180, 215, y 97 a 100 (S4); y 41 y 151 (S2'), basándose en la numeración de la quimotripsina, en la que un aminoácido en una posición S1 afecta la especificidad de P1, un aminoácido en una posición S2 afecta la especificidad de P2, un aminoácido en la posición S3 afecta la especificidad de P3 y un aminoácido en la posición S4 afecta la especificidad de P4. La posición 189 en

20 una serina proteasa es un residuo enterrado en el fondo del sitio que determina la especificidad de S1. Los determinantes estructurales para diversas serina proteasas se enumeran en la Tabla 8 con numeración basada en la numeración de la quimotripsina madura, con dominios de proteasa para cada una de las proteasas designadas alineadas con las del dominio de proteasa de la quimotripsina. El número debajo del encabezado de la columna de Cys168-Cys182 y el bucle 60 indica el número de aminoácidos en el bucle entre los dos aminoácidos y en el bucle.

25 La designación Sí/No bajo el encabezado de la columna de Cys191-Cys220 indica si el puente disulfuro está presente en la proteasa. Estas regiones son variables dentro de las serina proteasas de la familia de las quimotripsinas y representan determinantes estructurales en los mismos. La modificación de una proteasa para alterar uno cualquiera o más de los aminoácidos en el sitio S1-S4 afecta la especificidad o selectividad de una proteasa por un sustrato diana.

Tabla 8: Los determinantes estructurales para diversas serina proteasas

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

(a) MT-SP1

La serina proteasa de tipo membrana MT-SP1 (también llamada matriptasa, TADG-15, supresor de tumorigenicidad 14, ST14) es una proteasa a modo de ejemplo para la selección en los procedimientos descritos en este documento para seleccionar variantes con una especificidad por sustrato alterada contra una secuencia de escisión del sustrato deseada o predeterminada. La secuencia de MT-SP1 se expone en SEC ID N°: 252 y codifica un polipéptido de 855 aminoácidos que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 253. Es una proteinasa multidominio con un dominio de serina proteinasa en el extremo C (Friedrich y col. (2002) J Biol Chem 277(3):2160). Se ha aislado una variante de 683 aminoácidos de la proteasa, pero esta proteína parece ser una forma truncada o una forma de ectodominio.

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

La MT-SP1 contiene un dominio transmembrana, dos dominios CUB, cuatro repeticiones LDLR y un dominio de serina proteasa (o dominio de peptidasa S1; también llamado la cadena B) entre los aminoácidos 615-854 (o 615-855 dependiendo de variaciones en la bibliografía) en la secuencia expuesta en SEC ID N°: 253. La secuencia de aminoácidos del dominio de proteasa se expone en SEC ID N°: 505 y está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEC ID N°: 504. La MT-SP1 se sintetiza como un zimógeno, y se activa para formar la doble cadena por escisión. Además, el dominio proteolítico monocatenario solo es catalíticamente activo y funcional.

Una variante de MT-SP1, llamada CB469, que tiene una mutación de C122S correspondiente a la secuencia natural de MT-SP1 expuesta tanto en SEC ID N°: 253 como en 505, basada en la numeración de la quimotripsina, presenta exposición mejorada sobre vectores de fagémido. Una MT-SP1 variante tal se expone en SEC ID N°: 515 (MT-SP1 de longitud completa) o SEC ID N°: 507 (dominio de proteasa) y puede usarse en los procedimientos descritos más adelante en este documento.

La MT-SP1 pertenece a la familia de la peptidasa S1 de serina proteasas (también denominada en lo sucesivo la familia de las quimotripsinas), que también incluye quimotripsina y tripsina. Generalmente, los miembros de la familia de las quimotripsinas comparten homología de secuencias y estructural con la quimotripsina. La MT-SP1 se numera en este documento según la numeración de la quimotripsina madura, con su dominio de proteasa alineado con el del dominio de proteasa de la quimotripsina y sus residuos numerados consecuentemente. Basándose en la numeración de la quimotripsina, los residuos de sitio activo son Asp102, His57 y Ser195 (correspondientes a Asp711, His656 y Ser805 en SEC ID N°: 253). La secuencia de aminoácidos lineal puede alinearse con la de la quimotripsina y numerarse según las hojas β de quimotripsina. Las inserciones y deleciones se producen en los bucles entre las hojas beta, pero en toda la familia estructural, las hojas de núcleo se conservan. La serina proteasa interactúa con un sustrato en una forma de hoja beta conservada. Hasta 6 enlaces de nitrógeno conservados pueden producirse entre el sustrato y la enzima. Toda las serina proteasas de la familia de las quimotripsinas tienen una región conservada en su extremo N del dominio de proteasa que es necesario para actividad catalítica (es decir, IIGG, VVGG o IVGG, en el que el primer aminoácido en este cuartete está numerado según la numeración de la quimotripsina y se le ha dado la designación Ile16. Esta numeración no refleja la longitud de la secuencia del precursor).

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

La MT-SP1 puede escindir sustratos sintéticos seleccionados tan eficientemente como tripsina, pero presenta una especificidad más limitada por sustratos que la tripsina. El dominio catalítico de MT-SP1 tiene el plegamiento estructural global de una serina proteasa similar a (quimo)tripsina, pero muestra propiedades únicas tales como subsitios S2/S4 hidrófobos/ácidos y un bucle 60 expuesto. Similarmente, la MT-SP1 no escinde indiscriminadamente sustratos de péptidos en los residuos Lys o Arg accesibles, sino que requiere el reconocimiento de residuos adicionales que rodean el enlace peptídico escindible. Este requisito para una secuencia primaria extendida destaca la especificidad de MT-SP1 por sus sustratos. Por ejemplo, aunque la MT-SP1 escinde el receptor 2 activado por proteinasa (PAR-2) (que muestra una secuencia diana de P4 a P1 de Ser-Lys-Gly-Arg), la enzima no activa proteínas estrechamente relacionadas con este sustrato tales como PAR-1, PAR-3 y PAR-4 que no exponen secuencias diana que coinciden con la especificidad de MT-SP1 extendida próxima al enlace escindible (véase

Friedrich y col. (2002) J Biol Chem 277: 2160).

El dominio de proteasa MT-SP1 está compuesto por una pro-región y un dominio catalítico. La porción catalíticamente activa del polipéptido empieza después del sitio de autoactivación en el residuo de aminoácido 611 de la proteína madura (véase, por ejemplo, SEC ID N°: 253 en RQAR seguido de los residuos VVGG). El sitio S1 de MT-SP1 y la tripsina son similares con buena complementariedad para Lys, además de residuos Arg P1, representando así algunas similitudes en la escisión del sustrato con tripsina. La acomodación de los residuos de P1-Lys está mediada por Ser¹⁹⁰, cuya cadena lateral proporciona un enlace de hidrógeno adicional aceptor para estabilizar el grupo α -amonio enterrado (véase Friedrich y col. (2002) J Biol Chem 277: 2160). El sitio S2 está moldeado para acomodar cadenas laterales hidrófobas de tamaño pequeño a medio de aminoácidos P2 y generalmente acepta una amplia gama de aminoácidos en la posición P2. Tras la unión al sustrato, el subsitio S2 no es rígido como se prueba por la rotación del grupo bencilo de Phe⁹⁹. Los aminoácidos del sustrato en las posiciones P3 (para tanto Gln como residuos básicos) y P4 (para residuos Arg o Lys) parecen estar mediados por interacciones electrostáticas en los sitios S3 y S4 con las cadenas laterales ácidas de Asp-217 y/o Asp-96 que podrían preorientar favorablemente sustratos de péptidos básicos a medida que se aproximan a la hendidura del sitio activo de la enzima. La cadena lateral de un residuo P3 también puede unir hidrógeno al grupo carboxamida de Gln¹⁹² o, alternativamente, la cadena lateral P3 puede extenderse en el subsitio S4 para formar un enlace de hidrógeno con Phe⁹⁷, debilitándose así los enlaces de hidrógeno entre cadenas principales con Gly²¹⁶. En cualquier conformación, una cadena lateral de P3 básica puede interactuar favorablemente con el potencial negativo del sitio S4 de MT-SP1 S4. La compensación de cargas mutuas y la exclusión del mismo sitio S4 explica la baja probabilidad de la incidencia simultánea de residuos Arg/Lys en P3 y P4 en sustratos de MT-SP1 buenos. Generalmente, las posiciones de aminoácidos de MT-SP1 (basándose en la numeración de la quimotripsina) que contribuyen a la especificidad extendida por unión a sustrato incluyen: 146 y 151 (S1'); 189, 190, 191, 192, 216, 226 (S1); 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 99 (S2); 192, 217, 218, 146 (S3); 96, 97, 98, 99, 100, 168, 169, 170, 170A, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 215, 217, 224 (S4).

E. PROTEASAS MODIFICADAS Y CONJUNTOS PARA EL CRIBADO

Las proteasas o variantes de las mismas pueden usarse en los procedimientos descritos en este documento para identificar proteasas con una especificidad por sustrato deseada, casi siempre una especificidad por sustrato que es alterada, mejorada u optimizada. Las proteasas modificadas que van a usarse en el procedimiento descrito en este documento pueden generarse mutando uno cualquiera o más de los residuos de los aminoácidos de una proteasa usando cualquier procedimiento comúnmente conocido en la técnica (véase también la solicitud de EE.UU. publicada n° 2004/0146938). Las proteasas para la modificación y los procedimientos descritos en este documento incluyen, por ejemplo, proteasas naturales de longitud completa, formas variantes conocidas de proteasas, o fragmentos de proteasas que son suficientes para actividad catalítica, por ejemplo, proteólisis de un sustrato. Tales proteasas modificadas pueden cribarse individualmente contra una captura de proteasas diana tal como una serpina o serpina modificada, o pueden cribarse como un conjunto tal como, por ejemplo, usando una biblioteca de exposición que incluye una biblioteca combinatoria en la que la exposición de la proteasa es, por ejemplo, por exposición sobre fago, exposición sobre la superficie celular, exposición sobre perlas, exposición sobre ribosomas, u otros. La selección de una proteasa que presenta especificidad y/o selectividad por una captura de proteasas o forma modificada de la misma, debido a la formación de un complejo inhibidor covalente estable, puede facilitarse por cualquier esquema de detección conocido para un experto en la materia que incluye, pero no se limita a, marcado y/o purificación por afinidad, ELISA, ensayos cromogénicos, ensayos basados en fluorescencia (por ejemplo, extinción de fluorescencia o FRET), entre otros.

1. Generación de proteasas variantes

Ejemplos de procedimientos para mutar secuencias de proteasas incluyen procedimientos que producen mutagénesis al azar a través de toda la secuencia o procedimientos que producen mutagénesis dirigida de una región o dominio seleccionado de la secuencia de proteasa. En un ejemplo, el número de mutaciones hecho a la proteasa es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20. En una realización preferida, la(s) mutación (mutaciones) confiere(n) elevada especificidad por sustrato. En algunos ejemplos, la actividad de la proteasa variante aumenta al menos 10 veces, 100 veces o 1000 veces con respecto a la actividad de la proteasa natural. En aspectos relacionados, el aumento en la actividad es en la especificidad por sustrato.

a. Mutagénesis al azar

Los procedimientos de mutagénesis al azar incluyen, por ejemplo, uso de XL1red de *E. coli*, irradiación UV, modificación química tal como por desaminación, alquilación o mutágenos de análogos básicos, o procedimientos de PCR tales como barajado de ADN, mutagénesis en casete, mutagénesis al azar dirigida a sitio o PCR propensa a error (véase, por ejemplo, la solicitud de EE.UU. n° 2006-0115874). Tales ejemplos incluyen, pero no se limitan a, modificación química por hidroxilamina (Ruan, H., y col. (1997) Gene 188:35-39), el uso de análogos de dNTP (Zaccolo, M., y col. (1996) J. Mol. Biol. 255:589-603) o el uso de kits de mutagénesis al azar comercialmente disponibles tales como, por ejemplo, kits de mutagénesis al azar basada en PCR GeneMorph (Stratagene) o kits de mutagénesis al azar Diversify (Clontech). El kit de mutagénesis al azar Diversify permite la selección de una

velocidad de mutación deseada para una secuencia de ADN dada (de 2 a 8 mutaciones/1000 pares de bases) variando las cantidades de manganeso (Mn²⁺) y dGTP en la mezcla de reacción. El aumento de los niveles de manganeso aumenta inicialmente la velocidad de mutación, proporcionando un aumento de la velocidad de mutación adicional por el aumento de la concentración de dGTP. Incluso pueden lograrse velocidades de mutación mayores realizando rondas de PCR adicionales.

b. Mutagénesis dirigida

La mutación dirigida puede lograrse haciendo una o más mutaciones en una región predeterminada de una secuencia génica, por ejemplo, en regiones del dominio de la proteasa que median en la actividad catalítica. En un ejemplo, uno cualquiera o más de los aminoácidos de una proteasa se mutan usando cualquier kit convencional de mutagénesis dirigida a un solo sitio o a múltiples sitios tal como, por ejemplo, QuikChange (Stratagene). En otro ejemplo, uno cualquiera o más de los aminoácidos de una proteasa se mutan por mutagénesis por saturación (Zheng y col. (2004) Nucl. Acids. Res., 32:115) tal como, por ejemplo, mutagénesis de residuos de sitio activo. En este ejemplo, los residuos que forman el sitio S1-S4 de una proteasa (en el que la proteasa está en contacto con los residuos P1-P4 del sustrato de péptido) y/o que se ha mostrado que son importantes determinantes de la especificidad se mutan en cada aminoácido posible, tanto solos como en combinación. En algunos casos, hay poca (si la hay) interacción entre los sitios S1-S4 del sitio activo, de forma que parece que cada sitio reconoce y se une al residuo correspondiente en la secuencia del sustrato de péptido independiente de los otros sitios. Por tanto, los determinantes de la especificidad generalmente pueden cambiarse en un sitio sin afectar la especificidad de los otros sitios. En un ejemplo se usa una técnica de mutagénesis por saturación en la que el (los) residuo(s) que reviste(n) el sitio está(n) mutado(s) en cada uno de los 20 aminoácidos posibles (véase, por ejemplo, el procedimiento de Kunkle, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., Media Pa.). En una técnica tal puede sintetizarse un cebador de oligonucleótidos mutagénico degenerado que contiene aleatorización de nucleótidos en el (los) codón (codones) deseado(s) que codifica(n) el (los) aminoácido(s) seleccionado(s). Los esquemas de aleatorización a modo de ejemplo incluyen aleatorización de NNS o NNK en las que N representa cualquier nucleótido, S representa guanina o citosina y K representa guanina o timina. El cebador mutagénico degenerado se hibrida con el molde de ADN monocatenario y se añade ADN polimerasa para sintetizar la cadena complementaria del molde. Después de la ligación, el molde de ADN bicatenario se transforma en *E. coli* para la amplificación.

Los aminoácidos que forman el sitio de unión a sustrato extendido de proteasas a modo de ejemplo se describen en este documento. Generalmente, la especificidad por sustrato de una proteasa es conocida tal como, por ejemplo, por modelado molecular basado en estructuras tridimensionales del complejo de una proteasa y sustrato (véase, por ejemplo, Wang y col., (2001) Biochemistry 40(34):1003:8; Hopfner y col., Structure Fold Des. 1999 7(8):989; Friedrich y col., (2002) J Biol Chem 277(3):2160; Waugh y col., (2000) Nat Struct Biol. 7(9):762). Por ejemplo, las mutaciones dirigidas de MT-SP1 puede estar en uno cualquiera o más residuos (basándose en la numeración de la quimotripsina) que contribuyen a la especificidad por sustrato que incluyen 195, 102, 157 (la tríada catalítica); 189, 190, 191, 192, 216 y 226 (S1); 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 99 (S2); 146, 192, 217, 218 (S3); 96, 97, 98, 99, 100, 168, 169, 170, 170A, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 215, 217, 224 (S4). En otro ejemplo, la mutación de residuos de aminoácidos en una proteasa de la familia de la papaína puede estar en uno cualquiera o más residuos que afectan la especificidad de P2 (numeración de papaína convencional) que incluyen 66-68, 133, 157, 160 y/o 215. Además, también pueden mutarse residuos que no se ponen directamente en contacto con el sustrato de proteasa, pero que afectan la posición y/o conformación de residuos de contacto (tales como, por ejemplo, aquellos enumerados anteriormente) para alterar la especificidad de un andamiaje de proteasa.

En otro ejemplo, los aminoácidos dirigidos para la mutagénesis pueden seleccionarse por comparación de secuencias de proteasas homólogas con especificidades por sustrato similares. Los residuos de aminoácidos consenso pueden identificarse por alineamiento de las secuencias de amino de las proteínas homólogas, por ejemplo, alineamiento de regiones de la proteasa que participan en la unión a sustrato. Normalmente, las proteasas con especificidades por sustrato similares comparten aminoácidos consenso, por ejemplo, los aminoácidos en el sitio de unión a sustrato pueden ser idénticos o similares entre las proteasas comparadas. Adicionalmente, las secuencias de aminoácidos de proteasas con especificidades por sustrato diferentes pueden compararse para identificar aminoácidos que pueden participar en el reconocimiento de sustratos. Estos procedimientos pueden combinarse con procedimientos tales como modelado tridimensional para identificar residuos diana para mutagénesis.

En un ejemplo adicional, la mutagénesis dirigida puede limitarse a aminoácidos que se identifican como puntos calientes en las rondas iniciales del cribado de proteasas. Por ejemplo, tras la selección de proteasas de las bibliotecas combinatorias mutagenizadas al azar, normalmente se observan varias posiciones de "puntos calientes" y se seleccionan una y otra vez en los procedimientos de cribado. Casi siempre, ya que la mutagénesis al azar muta ampliamente una secuencia de polipéptidos, pero con sólo unas pocas mutaciones en cada uno sitio, la mutagénesis dirigida se usa como una segunda estrategia para elegir específicamente como diana posiciones de puntos calientes para la posterior mutagénesis. La mutagénesis dirigida de posiciones de puntos calientes permite una mutagénesis más diversa y profunda en posiciones especificadas particulares, a diferencia de la mutagénesis más superficial que se produce tras la mutagénesis al azar de una secuencia de polipéptidos. Por ejemplo, la mutagénesis por

saturación pueden usarse para mutar “puntos calientes” tal como usando oligonucleótidos que contienen Nnt/g o Nnt/c en estas posiciones. En un ejemplo, usando los procedimientos descritos en este documento se han identificado los siguientes puntos calientes en u-PA que contribuyen al aumento de la especificidad por sustrato: 73, 80, 30 y 155, basándose en la numeración de la quimotripsina. La mutación de estas posiciones puede lograrse tal como, por ejemplo, usando mutagénesis por saturación de una secuencia de proteasas natural o molde en uno o más de estos sitios para crear conjuntos de mutantes de proteasas que van a usarse en cribados posteriores.

2. Formas quiméricas de proteasas variantes

Las proteasas variantes descritas en este documento pueden incluir proteínas quiméricas o de fusión. En un ejemplo, una proteína de fusión de proteasas comprende al menos una porción catalíticamente activa de una proteína de proteasa. En otro ejemplo, una proteína de fusión de proteasas comprende al menos dos o más porciones catalíticamente activas de una proteasa. Dentro de la proteína de fusión, el polipéptido de no proteasa puede fusionarse al extremo N o extremo C del polipéptido de proteasa. En un ejemplo, la proteína de fusión puede incluir un ligador o espaciador de péptidos flexibles que separa la proteasa de un polipéptido de no proteasa. En otro ejemplo, la proteína de fusión puede incluir una marca o polipéptido detectable. Marcas a modo de ejemplo y proteínas detectables se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, una marca de histidina, una marca de hemaglutinina, una marca myc o una proteína fluorescente. En otro ejemplo más, la proteína de fusión es una proteína de fusión de GST-proteasa en la que las secuencias de proteasa están fusionadas al extremo N de las secuencias de GST (glutathión S-transferasa). Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de polipéptidos de proteasas recombinantes. En otro ejemplo, la proteína de fusión es un fusión de Fc en la que las secuencias de proteasa están fusionadas al extremo N del dominio Fc de la inmunoglobulina G. Tales proteínas de fusión pueden tener mejores propiedades farmacodinámicas *in vivo*. En otro ejemplo, la proteína de fusión es una proteína de proteasa que contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), la expresión y/o secreción de proteasa puede aumentarse mediante el uso de una secuencia señal heteróloga.

Una proteína quimérica o de fusión de proteasas puede producirse por técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan juntas en marco según técnicas convencionales, por ejemplo, empleando extremos romos o terminados en bisel para la ligación, digestión por enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, llenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseable y ligación enzimática. En otro ejemplo, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a nucleótidos protuberantes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que pueden hibridarse posteriormente y reamplificarse para generar una secuencia de genes quiméricos (véase, por ejemplo, Ausubel y col. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Además, están comercialmente disponibles muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido de GST). Un ácido nucleico que codifica proteasa puede clonarse en un vector de expresión tal que el resto de fusión se ligue en marco a la proteína de proteasa.

3. Bibliotecas combinatorias y otras bibliotecas

La fuente de compuestos para los ensayos de cribado puede ser conjuntos tales como bibliotecas que incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas combinatorias. Los procedimientos para sintetizar bibliotecas combinatorias y características de tales bibliotecas combinatorias se conocen en la técnica (véase generalmente Combinatorial Libraries: Synthesis, Screening and Application Potential (Cortese Ed.) Walter de Gruyter, Inc., 1995; Tietze y Lieb, Curr. Opin. Chem. Biol., 2(3):363-71 (1998); Lam, Anticancer Drug Des., 12(3):145-67 (1997); Blaney y Martin, Curr. Opin. Chem. Biol., 1(1):54-9 (1997); y Schultz y Schultz, Biotechnol. Prog., 12(6):729-43 (1996)).

Los procedimientos y estrategias para generar diversas bibliotecas, que incluyen bibliotecas de proteasas o de enzimas, que incluyen bibliotecas combinatorias sintéticas de barrido posicional (PSSCL), se han desarrollado usando procedimientos de biología molecular y/o metodologías simultáneas de síntesis química (véase, por ejemplo, Georgiou, y col. (1997) Nat. Biotechnol. 15:29-34; Kim y col. (2000) Appl Environ Microbiol. 66: 788 793; MacBeath, G.P. y col. (1998) Science 279:1958-1961; Soumillion, P.L. y col. (1994) Appl. Biochem. Biotechnol. 47:175-189; Wang, C. I. y col. (1996). Methods Enzymol. 267:52-68, patentes de EE.UU. 6.867.010, 6.168.919, solicitud de patente de EE.UU. nº 2006-0024289). Las bibliotecas combinatorias resultantes contienen posiblemente millones de compuestos que pueden cribarse para identificar compuestos que presentan una actividad seleccionada.

En un ejemplo, los componentes del conjunto o biblioteca de proteasas pueden exponerse sobre un paquete genético que incluye, pero no se limita a, cualquier vector replicable tal como un fago, virus o bacteria, que puede exponer un resto de polipéptido. La pluralidad de polipéptidos expuestos se expone por un paquete genético de tal forma que se permita que el polipéptido, tal como una proteasa o porción catalíticamente activa de la misma, se una y/o interactúe con un polipéptido diana. Paquetes genéticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos (véase, por ejemplo, Clackson y col. (1991) Making Antibody Fragments Using Phage Display

Libraries, *Nature*, 352:624-628; Glaser y col. (1992) Antibody Engineering by Codon-Based Mutagenesis in a Filamentous Phage Vector System, *J. Immunol.*, 149:3903-3913; Hoogenboom y col. (1991) Multi-Subunit Proteins on the surface of Filamentous Phage: Methodologies for Displaying Antibody (Fate) Heavy and 30 Light Chains, *Nucleic Acids Res.*, 19:4133-41370), baculovirus (véase, por ejemplo, Boublik y col. (1995) Eukaryotic Virus Display: Engineering the Major Surface Glycoproteins of the Autographa California Nuclear Polyhedrosis Virus (ACNPV) for the Presentation of Foreign Proteins on the Virus Surface, *Bio/Technology*, 13:1079-1084), bacterias y otros vectores adecuados para exponer una proteína tal como una proteasa expuesta en fago. Por ejemplo, los bacteriófagos de interés incluyen, pero no se limitan a, fago T4, fago M13 y fago HI. Los paquetes genéticos se amplifican opcionalmente tal como en un huésped bacteriano. Cualquiera de estos paquetes genéticos, además de cualquier otro conocido para aquellos expertos en la materia, se usa en los procedimientos proporcionados en este documento para exponer una proteasa o porción catalíticamente activa de la misma.

a. Bibliotecas de exposición sobre fago

Las bibliotecas de proteasas variantes, o porciones catalíticamente activas de las mismas, para el cribado pueden expresarse sobre las superficies de bacteriófagos tales como, pero no se limitan a, fagos M13, fd, f1, T7 y λ (véase, por ejemplo, Santini (1998) *J. Mol. Biol.* 282:125-135; Rosenberg y col. (1996) *Innovations* 6:1-6; Houshmand y col. (1999) *Anal Biochem* 268:363-370; Zanghi y col. (2005) *Nuc. Acid Res.* 33(18):e160:1-8). Las proteasas variantes pueden fusionarse a una proteína de la cubierta de bacteriófagos con enlaces covalentes, no covalentes o no peptídicos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.223.409, Crameri y col. (1993) *Gene* 137:69 y el documento WO 01/05950). Los ácidos nucleicos que codifican las proteasas variantes pueden fusionarse a ácidos nucleicos que codifican la proteína de la cubierta para producir una proteína de fusión de proteasa-proteína de la cubierta en la que la proteína variante se expresa sobre la superficie del bacteriófago. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la proteasa variante puede fusionarse a ácidos nucleicos que codifican el dominio del extremo C del gen III del fago filamentoso M13 (gIIIp; SEC ID Nº: 512). En algunos ejemplos, una proteasa mutante que presenta exposición mejorada sobre el fago se usa como molde para generar bibliotecas de exposición sobre fago mutantes como se describen en este documento. Por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 8, una MT-SP1 mutante que tiene la mutación de serina a cisteína en la posición correspondiente a la posición 122 de MT-SP1 natural, basándose en la numeración de la quimotripsina, presenta exposición sobre fago mejorada. Por tanto, un mutante tal puede usarse como molde a partir del cual se genera diversidad en la biblioteca.

Adicionalmente, la proteína de fusión puede incluir un ligador o espaciador de péptidos flexible, una marca o polipéptido detectable, un sitio de proteasa o modificaciones de aminoácidos adicionales para mejorar la expresión y/o utilidad de la proteína de fusión. Por ejemplo, la adición de un sitio de proteasa puede permitir la recuperación eficiente de bacteriófagos deseados tras un procedimiento de selección. Marcas y proteínas detectables a modo de ejemplo se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, una marca de histidina, una marca de hemaglutinina, una marca myc o una proteína fluorescente. En otro ejemplo, el ácido nucleico que codifica la fusión de proteasa-proteína de la cubierta puede fusionarse con una secuencia conductora con el fin de mejorar la expresión del polipéptido. A modo de ejemplo de secuencias conductoras se incluyen, pero no se limitan a, STII u OmpA. La exposición sobre fago se describe, por ejemplo, en Ladner y col., patente de EE.UU. nº 5.223.409; Rodi y col. (2002) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6:92-96; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317; documentos WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; de Haard y col. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:18218-30; Hoogenboom y col. (1998) *Immunotechnology* 4:1-20; Hoogenboom y col. (2000) *Immunol Today* 2:371-8; Fuchs y col. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay y col. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse y col. (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths y col. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins y col. (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson y col. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram y col. (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard y col. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Rebar y col. (1996) *Methods Enzymol.* 267:129-49; Hoogenboom y col. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; y Barbas y col. (1991) *PNAS* 88:7978-7982.

En la técnica se conocen ácidos nucleicos adecuados para la exposición sobre fago, por ejemplo, vectores de fago (véase, por ejemplo, Andris-Widhopf y col. (2000) *J Immunol Methods*, 28: 159-81; Armstrong y col. (1996) Academic Press, Kay y col., Ed. Pág. 35-53; Corey y col. (1993) *Gene* 128(1):129-34; Cwirla y col. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87(16):6378-82; Fowlkes y col. (1992) *Biotechniques* 13(3):422-8; Hoogenboom y col. (1991) *Nuc Acid Res* 19(15):4133-7; McCafferty y col. (1990) *Nature* 348(6301):552-4; McConnell y col. (1994) *Gene* 151(1-2):115-8; Scott y Smith (1990) *Science* 249(4967):386-90).

Una biblioteca de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión de proteasa-proteína de la cubierta, normalmente variantes de proteasas generadas como se ha descrito anteriormente, puede incorporarse en el genoma del bacteriófago, o alternativamente insertarse en un vector de fagémido. En un sistema de fagémido, el ácido nucleico que codifica la proteína expuesta se proporciona en un vector de fagémido, normalmente de longitud inferior a 6000 nucleótidos. El vector de fagémido incluye un origen de replicación de fago de manera que el plásmido se incorpora en partículas de bacteriófago cuando las células bacterianas que llevan el plásmido se infectan con fago colaborador, por ejemplo, M13K01 o M13VCS. Sin embargo, los fagémidos carecen de un conjunto suficiente de genes de fago con el fin de producir partículas de fago estables después de la infección. Estos genes de fago pueden proporcionarse por un fago colaborador. Normalmente, el fago colaborador proporciona una copia intacta de la proteína de la cubierta del gen III y otros genes de fago requeridos para la replicación y el

ensamblaje de fagos. Debido a que el fago colaborador tiene un origen de replicación defectuoso, el genoma del fago colaborador no se incorpora eficientemente en partículas de fago con respecto al plásmido que tiene un origen natural. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.821.047. El genoma del fagémido contiene un gen de marcador de selección, por ejemplo, Amp.sup.R o Kan.sup.R (para resistencia a ampicilina o kanamicina, respectivamente) para la selección de células que se infectan por un miembro de la biblioteca.

En otro ejemplo de exposición sobre fago pueden usarse vectores que llevan ácidos nucleicos que codifican un conjunto de genes de fago suficiente para producir una partícula de fago infecciosa cuando se expresa una señal de encapsidación de fago y una secuencia de replicación autónoma. Por ejemplo, el vector puede ser un genoma de fago que ha sido modificado para incluir una secuencia que codifica la proteína expresada. Los vectores de exposición sobre fago pueden incluir adicionalmente un sitio en el que una secuencia de ácidos nucleicos extraña puede insertarse, tal como un sitio de clonación múltiple que contiene sitios de digestión por enzimas de restricción. Las secuencias de ácidos nucleicos extrañas, por ejemplo, que codifican proteínas expuestas en vectores de fago pueden ligarse a un sitio de unión ribosómico, una secuencia señal (por ejemplo, una secuencia señal de M13) y una secuencia del terminador de la transcripción.

Los vectores pueden construirse por técnicas de clonación convencionales para contener la secuencia que codifica un polipéptido que incluye una proteasa y una parte de una proteína de la cubierta del fago, y que está operativamente ligada a un promotor regulable. En algunos ejemplos, un vector de exposición sobre fago incluye dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican la misma región de una proteína de la cubierta del fago. Por ejemplo, el vector incluye una secuencia que codifica una región tal en una posición operativamente ligada a la secuencia que codifica la proteína expuesta, y otra secuencia que codifica una región tal en el contexto del gen del fago funcional (por ejemplo, un gen de fago natural) que codifica la proteína de la cubierta. La expresión de tanto las proteínas de la cubierta naturales como de fusión puede ayudar en la producción de fago maduro reduciendo la cantidad de proteína de fusión preparada por partícula de fago. Tales procedimientos son particularmente útiles en situaciones en las que la proteína de fusión es menos tolerada por el fago.

Los sistemas de exposición sobre fago normalmente utilizan fago filamentoso tal como M13, fd y fl. En algunos ejemplos usando fago filamentoso, la proteína expuesta se fusiona con un dominio de anclaje de la proteína de la cubierta del fago. La proteína de fusión puede coexpresarse con otro polipéptido que tiene el mismo dominio de anclaje, por ejemplo, una copia natural o endógena de la proteína de la cubierta. Las proteínas de la cubierta del fago que pueden usarse para la exposición de proteínas incluyen (i) proteínas menores de la cubierta de fago filamentoso tales como proteína del gen III (gIIIp), y (ii) proteínas principales de la cubierta de fago filamentoso tales como proteína del gen VIII (gVIIIp). También pueden usarse fusiones con otras proteínas de la cubierta del fago tales como proteína del gen VI, proteína del gen VII o proteína del gen IX (véase, por ejemplo, documento el WO 00/71694).

También pueden usarse porciones (por ejemplo, dominios o fragmentos) de estas proteínas. Porciones útiles incluyen dominios que están establemente incorporados en la partícula de fago, por ejemplo, de manera que la proteína de fusión permanezca en la partícula en todo un procedimiento de selección. En un ejemplo se usa el dominio de anclaje de gIIIp (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.658.727 y los ejemplos más adelante). En otro ejemplo se usa gVIIIp (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.223.409), que puede ser un gVIIIp maduro de longitud completa fusionado con la proteína expresada. Los sistemas de exposición sobre fago filamentoso normalmente usan fusiones de proteínas para unir la secuencia de aminoácidos heteróloga a una proteína de la cubierta del fago o dominio de anclaje. Por ejemplo, el fago puede incluir un gen que codifica una secuencia señal, la secuencia de aminoácidos heteróloga y el dominio de anclaje, por ejemplo, un dominio de anclaje de gIIIp.

La valencia de la proteína de fusión expresada puede controlarse por la elección de la proteína de la cubierta del fago. Por ejemplo, las proteínas gIIIp normalmente se incorporan en la cubierta del fago a tres a cinco copias por virión. Por tanto, la fusión de gIIIp a proteasas variantes produce una baja valencia. En comparación, las proteínas de gVIII normalmente se incorporan en la cubierta del fago a 2700 copias por virión (Marvin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8:150-158). Debido a la alta valencia de gVIIIp, los péptidos superiores a diez residuos no son generalmente bien tolerados por el fago. Los sistemas de fagémido pueden usarse para aumentar la tolerancia del fago a péptidos mayores, proporcionándose copias naturales de las proteínas de la cubierta para disminuir la valencia de la proteína de fusión. Adicionalmente pueden usarse mutantes de gVIIIp que se optimizan para la de péptidos mayores. En un ejemplo tal, una gVIIp mutante se obtuvo en un cribado por mutagénesis para gVIIIp con propiedades de exposición superficial mejoradas (Sidhu y col. (2000) J. Mol. Biol. 296:487-495).

También pueden usarse promotores regulables para controlar la valencia de la proteína expuesta. La expresión regulada puede usarse para producir fago que tienen una baja valencia de la proteína expuesta. Se conocen muchas secuencias de promotor regulables (por ejemplo, inducibles y/o represibles). Tales secuencias incluyen promotores regulables cuya actividad puede alterarse o regularse por la intervención del usuario, por ejemplo, por manipulación de un parámetro medioambiental tal como, por ejemplo, temperatura o mediante la adición de molécula estimuladora o eliminación de una molécula de represor. Por ejemplo, puede añadirse un compuesto químico exógeno para regular la transcripción de algunos promotores. Los promotores regulables pueden contener sitios de unión para una o más proteínas de activador o represor de la transcripción. Pueden construirse promotores

sintéticos que incluyen sitios de unión a factor de transcripción y también pueden usarse como promotores regulables. Promotores regulables a modo de ejemplo incluyen promotores sensibles a un parámetro medioambiental, por ejemplo, cambios térmicos, hormonas, metales, metabolitos, antibióticos o agentes químicos. Promotores regulables apropiados para su uso en *E. coli* incluyen promotores que contienen sitios de unión a factor de transcripción de las secuencias del operador *lac*, *tac*, *trp*, *trc* y *tet*, u operones, el promotor de la fosfatasa alcalina (*pho*), un promotor de arabinosa tal como un promotor de araBAD, el promotor de ramnosa, los propios promotores, o fragmentos funcionales de los mismos (véase, por ejemplo, Elvin y col. (1990) *Gene* 37: 123-126; Tabor y Richardson, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1074-1078; Chang y col. (1986) *Gene* 44: 121-125; Lutz y Bujard, (1997) *Nucl. Acids. Res.* 25: 1203-1210; D. V Goeddel y col. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 76:106-110; J. D. Windass y col. (1982) *Nucl. Acids. Res.*, 10:6639-57; R. Crowl y col. (1985) *Gene*, 38:31-38; Brosius (1984) *Gene* 27: 161-172; Amanna y Brosius, (1985) *Gene* 40: 183-190; Guzman y col. (1992) *J Bacteriol.*, 174: 7716-7728; Haldimann y col. (1998) *J Bacteriol.*, 180: 1277-1286).

El promotor *lac*, por ejemplo, puede inducirse por lactosa o moléculas estructuralmente relacionadas tales como isopropil-beta-D-tiogalactósido (IPTG) y es reprimido por glucosa. Algunos promotores inducibles se inducen por un proceso de desrepresión, por ejemplo, inactivación de una molécula de represor.

Una secuencia de promotor regulable también puede regularse indirectamente. Ejemplos de promotores que pueden manipularse por ingeniería para la regulación indirecta incluyen: los promotores del fago lambda P_R, P_L, fago T7, SP6 y T5. Por ejemplo, la secuencia reguladora es reprimida o activada por un factor cuya expresión está regulada, por ejemplo, por un parámetro medioambiental. Un ejemplo de un promotor tal es un promotor T7. La expresión de la ARN polimerasa T7 puede regularse por un promotor medioambientalmente sensible tal como el promotor *lac*. Por ejemplo, la célula puede incluir un ácido nucleico heterólogo que incluye una secuencia que codifica la ARN polimerasa T7 y una secuencia reguladora (por ejemplo, el promotor *lac*) que está regulada por un parámetro medioambiental. La actividad de la ARN polimerasa T7 también puede regularse por la presencia de un inhibidor natural de ARN polimerasa, tal como la lisoizima T7.

En otra configuración, el P_L lambda puede manipularse por ingeniería para ser regulado por un parámetro medioambiental. Por ejemplo, la célula puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante sensible a la temperatura del represor lambda. El fomentar células a la temperatura no permisiva libera el promotor P_L de la represión.

Las propiedades reguladoras de una secuencia de promotor o reguladora de la transcripción pueden probarse fácilmente ligando operablemente el promotor o secuencia a una secuencia que codifica una proteína indicadora (o cualquier proteína detectable). Esta secuencia de fusión de promotor-indicador se introduce en una célula bacteriana, normalmente en un plásmido o vector, y la abundancia de la proteína indicadora se evalúa bajo una variedad de condiciones medioambientales. Un promotor o secuencia útil es uno que es selectivamente activado o reprimido en ciertas condiciones.

En algunos ejemplos se usan promotores no regulables. Por ejemplo, puede seleccionarse un promotor que produce una cantidad apropiada de transcripción bajo las condiciones relevantes. Un ejemplo de un promotor no regulable es el promotor de gIII.

b. Bibliotecas de exposición sobre la superficie celular

Las bibliotecas de proteasas variantes para el cribado pueden expresarse sobre las superficies de células, por ejemplo, células procariotas o eucariotas. Células a modo de ejemplo para la expresión sobre la superficie celular incluyen, pero no se limitan a, bacterias, levadura, células de insecto, células aviares, células vegetales y células de mamífero (Chen y Georgiou (2002) *Biotechnol Bioeng* 79: 496-503). En un ejemplo, las células bacterianas para la expresión son *Escherichia coli*.

Las proteasas variantes pueden expresarse como una proteína de fusión con una proteína que se expresa sobre la superficie de la célula, tal como una proteína de membrana o proteína asociada a la superficie celular. Por ejemplo, una proteasa variante puede expresarse en *E. coli* como una proteína de fusión con una proteína de la membrana externa de *E. coli* (por ejemplo, OmpA), una molécula híbrida genéticamente manipulada de la principal lipoproteína de *E. coli* (Lpp) y la proteína de la membrana externa OmpA, o una proteína asociada a la superficie celular (por ejemplo, subunidades de pilosidades y flagelares). Generalmente, cuando se usan proteínas de la membrana externa bacteriana para exponer péptidos o proteínas heterólogos, se logra mediante la inserción genética en sitios permisivos de las proteínas portadoras. La expresión de un péptido o proteína heterólogo depende de las propiedades estructurales del dominio de proteína insertado, ya que el péptido o proteína está más limitado cuando se inserta en un sitio permisivo con respecto a la fusión en el extremo N o C de una proteína. Pueden hacerse modificaciones a la proteína de fusión para mejorar la expresión de la proteína de fusión, tal como la inserción de secuencias de ligadores o espaciadores de péptidos o modificación de la proteína bacteriana (por ejemplo, por mutación, inserción o delección en la secuencia de aminoácidos). Enzimas tales como β-lactamasa y la exoglucanasa Cex de *Cellulomonas fimi* se han expresado satisfactoriamente como proteínas de fusión Lpp-OmpA en la superficie de *E. coli* (Francisco J.A. y Georgiou G. *Ann N Y Acad Sci.* 745:372-382 (1994) y Georgiou G. y col. *Protein Eng.*

9:239-247 (1996)). Otros péptidos de 15-514 aminoácidos se han expuesto en el segundo, tercero y cuarto bucles externos sobre la superficie de OmpA (Samuelson y col. J. Biotechnol. 96: 129-154 (2002)). Por tanto, las proteínas de la membrana externa pueden llevar y exponer productos génicos heterólogos sobre la superficie externa de bacterias.

En otro ejemplo, las proteasas variantes pueden fusionarse a dominios de autotransportadores de proteínas tales como la proteasa IgA1 de *N. gonorrhoeae*, serina proteasa de *Serratia marcescens*, la proteína VirG de *Shigella flexneri* y la adhesina AIDA-I de *E. coli* (Klauser y col. EMBO J. 1991-1999 (1990); Shikata S, y col. J Biochem. 114:723-731 (1993); Suzuki T y col. J Biol Chem. 270:30874-30880 (1995); y Maurer J y col. J Bacteriol. 179:794-804 (1997)). Otras proteínas autotransportadoras incluyen aquellas presentes en especies gram-negativas (por ejemplo, *E. coli*, *Salmonella* serovar *Typhimurium* y *S. flexneri*). Enzimas, tales como β -lactamasa, se han expresado satisfactoriamente sobre la superficie de *E. coli* usando este sistema (Lattemann CT y col. J Bacteriol. 182(13): 3726-3733 (2000)).

Las bacterias pueden manipularse por ingeniería recombinantemente para expresar una proteína de fusión, tal como una proteína de fusión de membranas. Los ácidos nucleicos que codifican las proteasas variantes pueden fusionarse a ácidos nucleicos que codifican una proteína de la superficie celular tal como, pero no se limitan a, una proteína OmpA bacteriana. Los ácidos nucleicos que codifican las proteasas variantes pueden insertarse en un sitio permisible en la proteína de la membrana tal como un bucle extracelular de la proteína de la membrana. Adicionalmente, un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión puede fusionarse a un ácido nucleico que codifica una marca o proteína detectable. Tales marcas y proteínas detectables se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, una marca de histidina, una marca de hemaglutinina, una marca myc o una proteína fluorescente. Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión pueden estar operativamente ligados a un promotor para la expresión en las bacterias. Por ejemplo, un ácido nucleico puede insertarse en un vector o plásmido, que puede llevar un promotor para la expresión de la proteína de fusión y opcionalmente genes adicionales para la selección, tal como para la resistencia a antibióticos. Las bacterias puede transformarse con tales plásmidos tal como por electroporación o transformación química. Tales técnicas son conocidas para un experto en la materia.

Las proteínas en la membrana externa o espacio periplásmico se sintetizan normalmente en el citoplasma como preproteína maduras, que se escinden en una secuencia señal para producir la proteína madura que es exportada fuera del citoplasma. Se conocen secuencias señal a modo de ejemplo usadas para la producción secretora de proteínas recombinantes para *E. coli*. La secuencia de aminoácidos del extremo N, sin la extensión de Met, puede obtenerse después de la escisión por la señal peptidasa cuando un gen de interés se fusiona correctamente a una secuencia señal. Por tanto, puede producirse una proteína madura sin cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés (Choi y Lee. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64: 625-635 (2004)).

En la técnica se conocen otros sistemas de exposición sobre la superficie celular e incluyen, pero no se limitan a, sistema de exposición sobre la superficie bacteriana basado en la proteína de nucleación del hielo (Inp) (Lebeault J M (1998) Nat Biotechnol. 16: 576 80), exposición sobre levadura (por ejemplo, fusiones con la proteína de la pared celular de levadura Aga2p; véase la patente de EE.UU. nº 6.423.538), exposición sobre células de insecto (por ejemplo, exposición sobre baculovirus; véase Ernst y col. (1998) Nucleic Acids Research, vol 26, número 7 1718-1723), exposición sobre células de mamífero y otros sistemas de exposición eucariotas (véanse, por ejemplo, los documentos 5.789.208 y WO 03/029456).

c. Otras bibliotecas de exposición

También es posible usar otras formas de exposición para cribar bibliotecas de proteasas variantes, por ejemplo, bibliotecas cuya variación se diseña como se describe en este documento. Otras formas de exposición a modo de ejemplo incluyen fusiones de ácido nucleico-proteína, exposición sobre ribozimas (véase, por ejemplo, Hanes y Pluckthun (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 13:4937-4942), exposición sobre perlas (Lam, K. S. y col. Nature (1991) 354, 82-84; K. S. y col. (1991) Nature, 354, 82-84; Houghten, R. A. y col. (1991) Nature, 354, 84-86; Furka, A. y col. (1991) Int. J. Peptide Protein Res. 37, 487-493; Lam, K. S., y col. (1997) Chem. Rev., 97, 411-448; solicitud de patente publicada de EE.UU. 2004-0235054) y matrices de proteínas (véase, por ejemplo, Cahill (2001) J. Immunol. Meth. 250:81-91, documentos WO 01/40803, WO 99/51773 y US2002-0192673-A1)

En otros casos específicos puede ser ventajoso en lugar de unir las proteasas, las proteasas variantes, o porciones catalíticamente activas o bibliotecas de fago o células que expresan proteasas variantes a un soporte sólido. Por ejemplo, en algunos ejemplos, las células que expresan proteasas variantes pueden adsorberse naturalmente a una perla, de forma que una población de perlas contiene una única célula por perla (Freeman y col. Biotechnol. Bioeng. (2004) 86:196-200). Tras la inmovilización a un soporte de vidrio, las microcolonias pueden cultivarse y cribarse con un sustrato cromogénico o fluorogénico. En otro ejemplo, las proteasas variantes o bibliotecas de fagos o células que expresan proteasas variantes pueden incorporarse en matrices en placas de titulación e inmovilizarse.

F. PROCEDIMIENTOS PARA PONER EN CONTACTO, AISLAR E IDENTIFICAR PROTEASAS SELECCIONADAS

Después de elegirse y prepararse una pluralidad de conjuntos o bibliotecas que exponen proteasas o porciones catalíticamente activas de las mismas, las bibliotecas se usan para poner en contacto un polipéptido de captura de proteasas diana con los componentes de proteasa. Los sustratos diana que incluyen, por ejemplo, un polipéptido de captura de proteasas tal como una serpina mutada en su bucle RSL para tener una secuencia de escisión deseada se ponen en contacto con las bibliotecas de proteasas expuestas para la selección de una proteasa con especificidad por sustrato alterada. La proteasa y el polipéptido de captura de proteasas pueden ponerse en contacto en suspensión, disolución, o mediante un soporte sólido. Los componentes se ponen en contacto durante un tiempo, temperatura o concentración suficiente para que se produzca la interacción y para la posterior reacción de escisión y formación de un complejo intermedio estable de la proteasa seleccionada y el polipéptido de captura de proteasas. La rigurosidad a la que la reacción se mantiene puede modularse cambiando uno o más parámetros de entre la temperatura de reacción, concentración de inhibidor de polipéptidos de captura de proteasas, concentración de un competidor (si está incluido), concentración del conjunto de proteasas en la mezcla y duración del tiempo de la incubación.

Las proteasas seleccionadas que forman complejos covalentes con el polipéptido de captura de proteasas se capturan y se aíslan. Para facilitar la captura, los polipéptidos de captura de proteasas contra los que se va a cribar puede proporcionarse en disolución, en suspensión, o unidos a un soporte sólido, según convenga para el procedimiento de ensayo. Por ejemplo, el polipéptido de captura de proteasas puede unirse a un soporte sólido tal como, por ejemplo, una o más perlas o partículas, microesferas, una superficie de un tubo o placa, una membrana de filtro y otros soportes sólidos conocidos en la técnica. Sistemas de soportes sólidos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, una superficie plana construida, por ejemplo, de vidrio, silicio, metal, nailon, celulosa, plástico o un material compuesto, que incluye placas de multipocillos o membranas; o pueden estar en forma de una perla tal como un gel de sílice, un vidrio de poro controlado, una perla magnética (Dynabead) o de celulosa. Tales procedimientos pueden adaptarse para su uso en suspensión o en forma de una columna. Los polipéptidos de captura de proteasas diana pueden unirse directamente o indirectamente a un soporte sólido tal como una perla de poliacrilamida. Para la unión pueden usarse procedimientos covalentes o no covalentes. Los procedimientos covalentes de unión de compuestos diana incluyen procedimientos de reticulación química. Los reactivos pueden crear enlaces covalentes entre grupos funcionales en la molécula diana y el soporte. Ejemplos de grupos funcionales que pueden reaccionar químicamente son grupos amino, tiol y carboxilo. N-etilmaleimida, yodoacetamida, N-hidrosuccinimida y glutaraldehído son ejemplos de reactivos que reaccionan con grupos funcionales. En otros ejemplos, los sustratos diana pueden unirse indirectamente a un soporte sólido mediante procedimientos tales como, pero no se limitan a, inmunoafinidad o interacciones ligando-receptor (por ejemplo, biotina-estreptavidina o glutatión S-transferasa-glutatión). Por ejemplo, un polipéptido de captura de proteasas puede recubrir una placa de ELISA, u otra matriz direccionable similar. En un ejemplo, los pocillos de la placa pueden recubrirse con un agente de captura por afinidad que se une a y captura el polipéptido de captura de proteasas. El Ejemplo 9 ejemplifica un procedimiento por el que anticuerpo anti-His biotinilado se recubre sobre una placa que contiene estreptavidina para facilitar la captura de un polipéptido de captura de proteasas que contiene una marca His.

La unión del polipéptido de captura de proteasas a un soporte sólido puede realizarse tanto antes, durante como después de su contacto con proteasas variantes o bibliotecas de fagos o células que expresan proteasas variantes. Por ejemplo, los sustratos diana pueden pre-absorberse a un soporte sólido tal como una columna de cromatografía antes de incubación con la variante proteasa. En otros ejemplos, la unión de un soporte sólido se realiza después de que el sustrato diana se una a la proteasa variante.

En un ejemplo tal, el soporte sólido que contiene el par sustrato-proteasa complejo puede lavarse para eliminar cualquier proteasa sin unir. El complejo puede recuperarse del soporte sólido mediante cualquier procedimiento conocido para un experto en la materia tal como, por ejemplo, mediante tratamiento con ácido diluido, seguido de neutralización (Fu y col. (1997) *J Biol. Chem.* 272:25678-25684) o con trietilamina (Chiswell y col. (1992) *Trends Biotechnol.* 10:80-84). Esta etapa puede optimizarse para garantizar la recuperación reproducible y cuantitativa de la fuente de exposición del sustrato sólido. Por ejemplo, la unión de la fuente de exposición al sustrato diana unido al soporte sólido puede monitorizarse independientemente usando procedimientos muy conocidos para aquellos expertos en la materia tales como usando un anticuerpo dirigido contra el fago tal como contra el fago M13 (por ejemplo, New England Biolabs, MA) y un ELISA convencional (véase, por ejemplo, Ausubel y col. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York).

Otro procedimiento de captura y aislamiento de un complejo de sustrato-proteasa es a partir de la disolución. Normalmente, en un procedimiento tal, un polipéptido de captura de proteasas o variante del mismo se pone en contacto con un conjunto de proteasas tal como, por ejemplo, en un volumen pequeño de un tampón de unión apropiado (es decir, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o más microlitros) en el que cada polipéptido de captura de proteasas está asociado a un marcador predeterminado, marca u otro resto para la identificación detectable y aislamiento del mismo. El resto detectable puede ser cualquier resto que facilite la detección y el aislamiento del complejo de sustrato-proteasa. Por ejemplo, el resto puede ser una marca de epítipo para el que existe un anticuerpo específico para la marca (es decir, marca myc, marca His, u otras). El anticuerpo

puede unirse a un soporte sólido tal como una perla para facilitar la captura del complejo estable. Pueden usarse otras estrategias similares e incluyen, por ejemplo, marcar el sustrato diana con biotina y capturar usando estreptavidina unida a un soporte sólido tal como perlas magnéticas o una placa de microtitulación, o marcar con polihistidina (por ejemplo, marca His 6) y capturar usando un agente quelante metálico tal como, pero no se limita a, sulfato de níquel (NiSO_4) cloruro de cobalto (CoCl_2), sulfato de cobre (CuSO_4) o cloruro de cinc (ZnCl_2). Los agentes de captura pueden acoplarse a perlas grandes tales como, por ejemplo, perlas Sepharose, por lo que el aislamiento de las perlas unidas puede conseguirse fácilmente por centrifugación. Alternativamente, los agentes de captura pueden acoplarse a perlas más pequeñas tales como, por ejemplo, perlas magnéticas (es decir, Miltenyi Biotec), que pueden aislarse fácilmente usando una columna magnética. Además, el resto puede ser un resto fluorescente. Por ejemplo, en algunos sistemas de exposición tales como, por ejemplo, sistemas de exposición sobre superficie celular, una marca fluorescente puede facilitar el aislamiento del complejo seleccionado por citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS; véase, por ejemplo, Levin y col. (2006) *Molecular BioSystems*, 2: 49-57).

En algunos casos, uno o más polipéptidos de captura de proteasas distintos se ponen en contacto con un conjunto de proteasas, estando cada uno de los polipéptidos de captura de proteasas asociado a diferentes restos de detección de manera que se aísla individualmente uno o más de un complejo de polipéptido de captura de proteasas-proteasa. La capacidad para incluir en una única reacción 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más polipéptidos de captura de proteasas distintos, cada uno con una secuencia de escisión de RSL deseada diferente, permite la detección y el aislamiento simultáneo de decenas de cientos o miles de complejos covalentes.

Las proteasas seleccionadas, capturadas como complejos covalentes con el polipéptido de captura de proteasas, pueden separarse de las proteasas sin complejar del conjunto de proteasas. Las proteasas seleccionadas pueden entonces amplificarse para facilitar la identificación de la proteasa seleccionada. Después de eliminar cualquier proteasa sin complejar con el polipéptido de captura de proteasas, la fuente de material a la que se expone la proteasa (es decir, fago, células, perlas, etc.) se amplifica y se expresa en una célula huésped apropiada. Por ejemplo, si la proteasa se expone sobre fago, generalmente la proteasa-fago en complejo con un polipéptido de captura de proteasas se incuba con una célula huésped para permitir la adsorción de fago, seguido de la adición de un volumen pequeño de caldo nutritivo y agitación del cultivo para facilitar la replicación del ADN de sonda del fago en el huésped que se multiplica. En algunos ejemplos, esto se hace en presencia de fago colaborador con el fin de garantizar que las células huésped se infecten por el fago. Después de esta incubación, los medios se complementan con un antibiótico y/o un inductor. El genoma de la proteasa del fago también puede contener un gen que codifica resistencia al antibiótico para permitir el crecimiento selectivo de aquellas células bacterianas que mantienen el ADN de proteasa del fago. Normalmente, para la amplificación de fago como fuente de sobrenadante de fagos que contiene proteasas seleccionadas se requiere el rescate del fago usando fago colaborador. En algunos ejemplos es posible ensayar la presencia de una proteasa seleccionada sin una etapa de rescate. Por ejemplo, tras la incubación del complejo capturado que contiene las proteasas seleccionadas o identificadas con una célula huésped, por ejemplo, bacterias, y crecimiento en presencia de un agente selectivo, el medio de cultivo de periplasma o celular puede muestrearse directamente como una fuente de la proteasa seleccionada, por ejemplo, para medir la actividad de proteasa. Un procedimiento tal se describe en el Ejemplo 17.

Adicionalmente, la amplificación de la fuente de exposición, tal como en un huésped bacteriano, puede optimizarse en una variedad de formas. Por ejemplo, la cantidad de bacterias añadida al material de ensayo tal como en micropocillos puede estar en enorme exceso de la fuente de fago recuperada de la etapa de unión, asegurándose así la transducción cuantitativa del genoma de fago. La eficiencia de transducción puede medirse opcionalmente cuando se seleccionan fagos. La etapa de amplificación amplifica el genoma de la fuente de exposición, tal como genomas de fago, permitiendo la expresión en exceso del polipéptido de firma asociado y la identificación del mismo tal como por secuenciación de ADN.

Puede usarse un enfoque de inmunoadsorción, por el que proteasas o porciones catalíticamente activas de las mismas que interactúan con una proteína diana, tal como un polipéptido de captura de proteasas o variante de RSL del mismo, se seleccionan rápidamente. La inmunoadsorción se lleva a cabo, por ejemplo, incubando una biblioteca de polipéptidos expuestos sobre fago tales como proteasas expuestas sobre fago, con una proteína diana unida a superficie o soluble, lavando el fago sin unir y eluyendo el fago específicamente y covalentemente unido. Entonces, el fago eluido se amplifica, tal como por infección de un huésped, y se pasa por ciclos adicionales de inmunoadsorción y amplificación para enriquecer sucesivamente el conjunto de fago en aquellos con las mayores afinidades por el polipéptido diana. Después de varias rondas, los clones individuales se identifican tal como por secuenciación de ADN y su actividad puede medirse tal como mediante cualquier procedimiento expuesto en la Sección G más adelante.

Una vez se identifica la proteasa seleccionada, puede purificarse de la fuente de exposición y probarse para actividad. Generalmente, tales procedimientos incluyen técnicas bioquímicas generales y de ADN recombinante y son rutina para aquellos expertos en la materia. En un procedimiento puede usarse precipitación con polietilenglicol (PEG) para eliminar actividad de proteasa potencialmente contaminante en los sobrenadantes de fagos seleccionados purificados. En un ejemplo tal, tras el rescate de fagos en presencia de fago colaborador, el sobrenadante de fagos que contiene la proteasa seleccionada puede precipitarse en presencia de PEG. Un experto en la materia puede determinar el porcentaje de PEG requerido para la aplicación de precipitación particular.

Generalmente, para la precipitación de sobrenadantes de proteasas se usa 20% de PEG.

En algunos ejemplos, el sobrenadante, tanto del sobrenadante de fagos rescatados como del medio de periplasma de células o de células bacterianas (sin rescate de fagos) puede ensayarse para actividad de proteasa como se describe en este documento. Alternativamente o adicionalmente, la proteasa seleccionada puede purificarse del sobrenadante u otra fuente. Por ejemplo, el ADN que codifica el dominio de proteasa seleccionado puede aislarse de la fuente de exposición para permitir la purificación de la proteína seleccionada. Por ejemplo, tras la infección de células huésped de *E. coli* con fago pueden seleccionarse como se expone anteriormente, los clones individuales pueden recogerse y cultivarse para la purificación de plásmidos usando cualquier procedimiento conocido para un experto en la materia y, si fuera necesario, pueden prepararse en grandes cantidades tal como, por ejemplo, usando el kit de purificación de plásmidos Midi (Qiagen). El plásmido purificado puede usarse para secuenciación de ADN para identificar la secuencia de la proteasa variante, o puede usarse para transfectar en cualquier célula para la expresión tal como, pero no se limita a, un sistema de expresión en mamífero. Si fuera necesario puede realizarse PCR de una o dos etapas para amplificar la secuencia seleccionada que puede subclonarse en un vector de expresión de elección. Los cebadores de PCR pueden diseñarse para facilitar la subclonación tal como incluyendo la adición de sitios de enzimas de restricción. El Ejemplo 4 ejemplifica un procedimiento de PCR de dos etapas para realizar la amplificación y purificación del gen u-PA de longitud completa, en el que el fago de proteasa seleccionado sólo contenía el dominio de proteasa del gen u-PA. Tras la transfección en las células apropiadas para la expresión tal como se describe en detalle más adelante, el medio acondicionado que contiene el polipéptido de proteasa, o porción catalíticamente activa del mismo, puede probarse en ensayos de actividad o puede usarse para más purificación. Además, si fuera necesario, la proteasa puede procesarse consiguientemente para dar una proteasa activa tal como por escisión de una forma monocatenaria en una forma bicatenaria. Tales manipulaciones son conocidas para un experto en la materia. Por ejemplo, el u-PA monocatenario puede hacerse activo por la escisión de plasmina tal como se describe en este documento.

1. Cribado iterativo

En los procedimientos descritos en este documento, el cribado iterativo se emplea para optimizar la modificación de las proteasas. Por tanto, en procedimientos de cribado iterativo, una proteasa puede desarrollarse realizando las reacciones de inmuoadsorción una pluralidad de veces bajo diversos parámetros tales como, por ejemplo, usando diferentes polipéptidos de captura de proteasas o competidores. En tales procedimientos de cribado iterativo, el conjunto de proteasas puede mantenerse constante en rondas sucesivas de cribado. Alternativamente puede generarse un nuevo conjunto de proteasas que sólo contiene las proteasas seleccionadas identificadas en las rondas precedentes y/o creando un nuevo conjunto de proteasas mutantes que se han mutado adicionalmente con respecto a una proteasa molde identificada en la primera ronda.

En un ejemplo, una primera ronda de cribado de la biblioteca de proteasas puede identificar proteasas variantes que contienen una o más mutaciones que alteran la especificidad de la proteasa. Entonces puede realizarse una segunda ronda de síntesis de bibliotecas de la que las posiciones de aminoácidos de la una o mutaciones se mantienen constantes, y se lleva a cabo mutagénesis dirigida o al azar en el resto de la proteína o región o residuo deseado. Después de una ronda adicional de cribado, la proteasa seleccionada puede someterse a rondas adicionales de síntesis de bibliotecas y cribado. Por ejemplo, pueden realizarse 2, 3, 4, 5 o más rondas de síntesis de bibliotecas y cribado. En algunos ejemplos, la especificidad de la proteasa variante hacia el sustrato alterado se optimiza adicionalmente con cada ronda de selección.

En otro procedimiento de cribado iterativo, una primera ronda de cribado de un conjunto de proteasas puede ser contra un polipéptido de captura de proteasas intermedio para identificar proteasas variantes que contienen una o más mutaciones que alteran la especificidad de la proteasa por el sustrato intermedio. Los complejos de proteasa seleccionados pueden aislarse, cultivarse y amplificarse en células huésped apropiadas y usarse como el conjunto de proteasas en una segunda ronda de cribado contra un polipéptido de captura de proteasas que contiene la secuencia de escisión completa de un polipéptido diana. Por ejemplo, un enfoque tal puede usarse para seleccionar proteasas que tienen especificidad por sustrato por una secuencia de escisión de VEGFR en la que la una o más rondas de inmuoadsorción son contra una secuencia de escisión intermedia RRARM, y se realizan rondas de inmuoadsorción posteriores contra un polipéptido de captura de proteasas que contiene la secuencia de escisión de VEGFR2 RRVR.

En un ejemplo adicional de cribado iterativo se usan dos o más polipéptidos de captura de proteasas que contienen diferentes secuencias de reconocimiento o de escisión de sustrato para dos o más polipéptidos diferentes en los procedimientos en rondas alternativas de inmuoadsorción. Un procedimiento tal es útil para seleccionar proteasas que se optimizan para tener selectividad por dos sustratos diferentes. Las variantes seleccionadas normalmente tienen una estrecha especificidad, pero alta actividad hacia dos o más secuencias de reconocimiento de sustrato. En tales procedimientos, una primera ronda de cribado de un conjunto de proteasas contra un primer polipéptido de captura de proteasas, que ha sido modificado para seleccionar una proteasa con una primera especificidad por sustrato predeterminada, puede identificar proteasas variantes que contienen una o más mutaciones que alteran la especificidad de la proteasa. Las proteasas seleccionadas pueden aislarse, cultivarse y amplificarse en las células huésped apropiadas y usarse como conjunto de proteasas en una segunda ronda de cribado contra un segundo

polipéptido de captura de proteasas que ha sido modificado para seleccionar una proteasa con una segunda especificidad por sustrato predeterminada. El primer y segundo polipéptidos de captura de proteasas usado en los procedimientos pueden ser iguales o diferentes, pero cada uno está modificado de forma diferente en su sitio reactivo para imitar un sitio de reconocimiento de sustrato (es decir, secuencia de escisión) de sustratos diana diferentes. En algunos ejemplos, la rigurosidad en la selección puede potenciarse en presencia de competidores tales como, por ejemplo, competidores estrechos o amplios como se describen en este documento.

2. Proteasas seleccionadas a modo de ejemplo

En este documento se proporcionan polipéptidos de MT-SP1 variantes identificados en los procedimientos descritos en este documento que tienen una especificidad por sustrato alterada y/o mejorada. Se identificó que tales polipéptidos de MT-SP1 variantes tenían un aumento de especificidad por una secuencia de escisión seleccionada o deseada de una proteína diana. A modo de ejemplo de tales proteínas diana se incluyen, pero no se limitan a, una secuencia de escisión en un VEGFR o una proteína del complemento, por ejemplo, proteína del complemento C2. Cualquier serpina modificada puede usarse en los procedimientos de selección en este documento para identificar proteasas variantes. A modo de ejemplo de tales serpinas modificadas está AT3 modificado en su RSL para contener secuencias de escisión para una proteína diana, por ejemplo, una C2, como se describen en este documento anteriormente. Las proteasas seleccionadas modificadas resultantes presentan especificidad por sustrato alterada, normalmente mejorada, por la secuencia de escisión en la proteína diana con respecto a la proteasa molde o de partida, que no contiene las modificaciones seleccionadas. Como se describe más adelante, la especificidad es normalmente elevada y es generalmente al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 veces o más cuando se compara con la especificidad de una proteasa natural o molde para el sustrato diana seleccionado frente a un sustrato no diana.

a. Polipéptidos de MT-SP1 variante

Los polipéptidos de MT-SP1 variante proporcionados en este documento se seleccionaron para tener un aumento de la reactividad para un polipéptido de serpina mutante modificado en su secuencia del RSL reemplazando los aminoácidos de sitio reactivo P4-P2' nativo con aquellos de una proteína diana deseada o seleccionada. En un ejemplo, los polipéptidos de MT-SP1 variante se identificaron contra la selección de un polipéptido de AT3 modificado. Ejemplos de moléculas de polipéptidos de AT3 modificados como se usan en los procedimientos de selección de MT-SP1 descritos en este documento incluyen, por ejemplo, AT3 modificada en sus residuos de P4-P2' nativos IAGRSL (SEC ID N°: 478) con residuos de aminoácidos para una secuencia de escisión de la proteína del complemento C2 SLGRKI (SEC ID N°: 479).

Usando los procedimientos descritos en este documento se identificó que las siguientes posiciones contribuían a la especificidad por sustrato de un polipéptido de MT-SP1: 23, 41, 52,60(g), 65, 71, 93, 95, 97, 98, 99, 126, 129, 131, 136, 143,144, 154, 164, 166, 171, 173, 175, 184(a), 192, 201, 209, 217, 221(a), 230, 234 y 244, basándose en la numeración de la quimotripsina. Un reemplazo de aminoácidos se corresponde con las siguientes posiciones Y60(g) de un polipéptido de MT-SP1 tal como el polipéptido de MT-SP1 de longitud completa expuesto en SEC ID N°: 253 ó 515, o porción catalíticamente activa del mismo expuesta en SEC ID N°: 505 ó 507, basándose en la numeración de la quimotripsina. Un polipéptido de MT-SP1 modificado proporcionado en este documento según las presentes reivindicaciones que presenta elevada especificidad por sustrato puede contener un reemplazo de aminoácido Y60(g)S y una o más modificaciones de aminoácidos correspondientes a una cualquiera o más de las modificaciones de D23E, I41F, I41T, L52M, T56K, H71R, F93L, N95K, F97Y, F97L, T98P, F99L, A126T, V129D, P131S, I136T, I136V, H143R, T144I, I154V, N164D, T166A, L171F, P173S, Q175R, F184(a)L, Q192H, S201I, Q209L, D217V, Q221(a)L, R230W, F234L y V244G de un polipéptido de MT-SP1, tal como el polipéptido de MT-SP1 de longitud completa expuesto en SEC ID N°: 253 ó 515, o porción catalíticamente activa del mismo expuesto en SEC ID N°: 505 ó 507, basándose en la numeración de la quimotripsina.

Normalmente, un polipéptido de MT-SP1 modificado tal presenta elevada especificidad por sustrato por la proteína del complemento C2. A modo de ejemplo de tales polipéptidos están aquellos polipéptidos de MT-SP1 que contienen una o más de las modificaciones de aminoácidos correspondientes a Y60(G)S en un polipéptido de MT-SP1 tal como un polipéptido de MT-SP1 que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 253, o un fragmento catalíticamente activo del mismo expuesto en SEC ID N°: 505. A modo de ejemplo de tales secuencias están aquellas expuestas en SEC ID N°: 609, o fragmentos de las mismas de aminoácidos contiguos que contienen la mutación y que tienen actividad catalítica tal como, por ejemplo, expuesta en SEC ID N°: 588. En algunos ejemplos, los polipéptidos de MT-SP1 variante proporcionados en este documento contienen adicionalmente una modificación correspondiente a C122S en un polipéptido de MT-SP1 tal como un polipéptido de MT-SP1 que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 253 o un fragmento catalíticamente activo de la misma expuesta en SEC ID N°: 505. A modo de ejemplo de tales polipéptidos de MT-SP1 variante se exponen en SEC ID N°: 557, o fragmentos de los mismos de aminoácidos contiguos que contienen la mutación y que tienen actividad catalítica tal como, por ejemplo, expuesto en SEC ID N°: 536.

G. PROCEDIMIENTOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PROTEASA

Las proteasas seleccionadas en los procedimientos descritos en este documento pueden probarse para determinar si, tras la selección, las proteasas retienen eficiencia catalítica y presentan la especificidad por sustrato deseada. La evaluación de la actividad puede realizarse usando sobrenadante de la fuente de exposición amplificada o de proteína purificada. Por ejemplo, como se trata anteriormente, el sobrenadante de fagos puede ensayarse tras el rescate de fagos con fago colaborador y amplificación de fagos. Alternativamente, la actividad de proteasa puede ensayarse directamente a partir del medio celular o periplasma de bacterias infectadas. También puede determinarse la actividad de proteasa de la proteasa seleccionada purificada.

La eficiencia catalítica y/o la especificidad por sustrato pueden evaluarse ensayando la escisión del sustrato usando sustratos conocidos de la proteasa. Por ejemplo, la escisión de plasminógeno puede evaluarse en el caso en el que t-PA o u-PA se usen en el procedimiento de selección en este documento. En otro ejemplo puede usarse un sustrato de péptido reconocido por la proteasa. Por ejemplo, RQAR (SEC ID N°: 513), que es el sitio de autoactivación de MT-SP1, puede usarse para evaluar la actividad de proteasas MT-SP1 seleccionadas. En una realización puede usarse un tetrapéptido fluorogénicamente marcado del sustrato de péptido, por ejemplo, un tetrapéptido de ACC o AMC. Además, puede usarse un sustrato de péptido fluorogénico diseñado basándose en la secuencia de escisión de un sustrato diana deseado contra la que se seleccionó la proteasa para evaluar la actividad.

En algunos ejemplos, la proteasa seleccionada puede evaluarse para su actividad contra un sustrato de péptido conocido en presencia o ausencia del polipéptido de captura de proteasas variante usado en el procedimiento de selección. Normalmente se realiza una evaluación tal de la actividad con el fin de seleccionar adicionalmente aquellas proteasas que son inhibidas en presencia de polipéptido de captura de proteasas que contiene la secuencia de escisión deseada del sustrato diana, y así optimizar las proteasas seleccionadas que tienen selectividad mejorada por el sustrato diana. Pueden hacerse comparaciones de inhibición contra la proteasa natural o molde y/o con todas las otras proteasas identificadas en el procedimiento de selección.

El análisis cinético de la escisión de sustratos nativos de una proteasa seleccionada puede compararse con el análisis de escisión de sustratos diana deseados para evaluar la especificidad de la proteasa seleccionada por la secuencia diana. Además, pueden evaluarse las constantes de velocidad de segundo orden de inhibición (k_i) para monitorizar la eficiencia y reactividad de una proteasa seleccionada por un sustrato tal como, por ejemplo, el polipéptido de captura de proteasas, o variante del mismo, usado en el procedimiento de selección. El Ejemplo 5 ejemplifica diversos ensayos usados para evaluar la eficiencia y reactividad catalítica de polipéptidos de u-PA mutantes identificados en los procedimientos descritos en este documento. El Ejemplo 10 y el Ejemplo 12 ejemplifican diversos ensayos usados para evaluar la eficiencia catalítica de sobrenadantes de fagos de MT-SP1 seleccionados. El Ejemplo 14 ejemplifica diversos ensayos usados para evaluar la eficiencia y reactividad catalítica de proteasas MT-SP1 variantes purificadas seleccionadas.

En un ejemplo, las proteasas seleccionadas tales como, por ejemplo, proteasas u-PA o MT-SP1 seleccionadas, que se seleccionan para corresponderse con el perfil de especificidad deseada del polipéptido de captura de proteasas mutado, pueden ensayarse usando sustratos de péptidos fluorogénicos individuales correspondientes a la secuencia de escisión deseada. Por ejemplo, un procedimiento de ensayar una proteasa modificada que puede escindir una cualquiera o más de las secuencias de escisión deseadas de un sustrato diana incluye: (a) poner en contacto una muestra fluorogénica de péptidos (que contiene una secuencia de escisión diana deseada) con una proteasa de tal forma que un resto fluorogénico sea liberado de una secuencia de sustrato de péptido tras la acción de la proteasa, produciéndose así un resto fluorescente; y (b) observar si la muestra experimenta o no un cambio detectable en la fluorescencia, siendo el cambio detectable una indicación de la presencia de la proteasa enzimáticamente activa en la muestra. En un ejemplo tal, la secuencia de escisión deseada contra la que se seleccionó la proteasa se prepara en un péptido fluorogénico mediante procedimientos conocidos en la técnica. En un ejemplo, las secuencias de escisión de péptidos individuales pueden unirse a un sustrato fluorogénicamente marcado tal como, por ejemplo, un grupo saliente fluorogénico ACC o AMC, y la liberación del resto fluorogénico puede determinarse como una medida de la especificidad de una proteasa por una secuencia de escisión de péptidos. La tasa de aumento en la fluorescencia de la secuencia de escisión diana puede medirse tal como usando un espectrofotómetro de fluorescencia. La tasa de aumento en la fluorescencia puede medirse con el tiempo. Las constantes cinéticas de Michaelis-Menten pueden determinarse por los procedimientos cinéticos convencionales. Las constantes cinéticas k_{cat} , K_m y k_{cat}/K_m pueden calcularse representando la inversa de la concentración del sustrato frente a la inversa de la velocidad de escisión del sustrato, y ajustándolas a la ecuación de Lineweaver-Burk ($1/\text{velocidad} = (K_m/V_{max})(1/[S]) + 1/V_{max}$, en la que $V_{max} = [ET]k_{cat}$). La constante de velocidad de segundo orden o constante de especificidad (k_{cat}/K_m) es una medida de cómo de bien un sustrato es cortado por una proteasa particular. Por ejemplo, puede prepararse un tetrapéptido de ACC o AMC tal como Ac-RRAR-AMC, Ac-SLGR-AMC, Ac-SLGR-ACC, Ac-RQAR-ACC, e incubarse con una proteasa seleccionada en los procedimientos descritos en este documento y la actividad de la proteasa puede evaluarse ensayando la liberación del resto fluorogénico. La elección del tetrapéptido depende de la secuencia de escisión deseada que va a ensayarse y puede determinarse empíricamente.

El ensayo de una proteasa en una disolución requiere simplemente añadir una cantidad de la disolución madre a una proteasa a un péptido indicador de proteasa fluorogénico y medir el posterior aumento en la fluorescencia o

disminución en la banda de excitación en el espectro de absorción. La disolución y el indicador fluorogénico también pueden combinarse y ensayarse en un “tampón de digestión” que optimiza la actividad de la proteasa. Tampones adecuados para ensayar la actividad de proteasa son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. En general, un tampón se selecciona con un pH que se corresponde con el óptimo de pH de la proteasa particular. Por ejemplo, un tampón particularmente adecuado para ensayar la actividad de elastasa contiene fosfato de sodio 50 mM, EDTA 1 mM a pH 8,9. La medición se realiza fácilmente en un fluorímetro, un instrumento que proporciona una fuente de luz de “excitación” para el fluoróforo y luego mide la luz posteriormente emitida a una longitud de onda particular. La comparación con una disolución de indicador de control que carece de la proteasa proporciona una medida de la actividad de proteasa. El nivel de actividad puede cuantificarse precisamente generando una curva estándar para la combinación de proteasa/indicador en la que se determina la tasa de cambio en fluorescencia producida por las disoluciones de proteasa de actividad conocida.

Aunque la detección de compuestos fluorogénicos puede llevarse a cabo usando un fluorímetro, la detección puede llevarse a cabo mediante una variedad de otros procedimientos muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Por tanto, por ejemplo, si los fluoróforos emiten en las longitudes de onda visibles, la detección puede ser simplemente por inspección visual de fluorescencia en respuesta a excitación por una fuente de luz. La detección también puede ser por medio de un sistema de análisis de imágenes utilizando una cámara de vídeo conectada a un digitalizador u otro sistema de adquisición de imágenes. La detección también puede ser por visualización a través de un filtro, como bajo un microscopio de fluorescencia. El microscopio puede proporcionar una señal que es simplemente visualizada por el operario. Alternativamente, la señal puede registrarse en película fotográfica o usar un sistema de análisis de vídeo. La señal también puede cuantificarse simplemente en tiempo real usando tanto un sistema de análisis de imágenes como un fotómetro.

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

Las proteasas seleccionadas también pueden ensayarse para establecer que escindirán la secuencia deseada cuando se presenten en el contexto de la proteína de longitud completa. En un ejemplo, una proteína diana purificada, es decir, VEGFR2 o proteína del complemento C2, puede incubarse en presencia o ausencia de una proteasa seleccionada y el acontecimiento de escisión puede monitorizarse por SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie para proteína y análisis de productos de escisión usando densitometría. La constante de especificidad de la escisión de una proteína de longitud completa por una proteasa puede determinarse usando densitometría de gel para evaluar cambios en la densitometría con el tiempo de una banda de sustrato diana de longitud completa incubada en presencia de una proteasa. Además, la actividad de la proteína diana también puede ensayarse usando procedimientos muy conocidos en la técnica para ensayar la actividad de una proteína diana deseada, para verificar que su función se ha destruido por el acontecimiento de escisión.

En ejemplos específicos, la comparación de las especificidades de una proteasa seleccionada, normalmente una proteasa modificada, puede usarse para determinar si la proteasa seleccionada presenta especificidad alterada, por ejemplo, aumentada, en comparación con la proteasa natural o molde. La especificidad de una proteasa por un sustrato diana puede medirse observando cuántas secuencias distintas escinde una proteasa modificada a una actividad dada en comparación con una proteasa natural o molde. Si la proteasa modificada escinde menos sustratos diana que la proteasa natural, la proteasa modificada tiene mayor especificidad que la proteasa natural por aquellos sustratos diana. La especificidad de una proteasa por un sustrato diana puede determinarse a partir de la constante de especificidad de escisión de un sustrato diana en comparación con un sustrato no diana (es decir, una secuencia de sustrato natural nativo de una proteasa). Puede hacerse una relación de las constantes de especificidad de una proteasa modificada por un sustrato diana frente a un sustrato no diana para determinar una relación de la eficiencia de escisión de la proteasa. La comparación de la relación de la eficiencia de escisión entre una proteasa modificada y una proteasa natural o molde puede usarse para evaluar el cambio en veces en la especificidad por un sustrato diana. La especificidad puede ser al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 veces o más cuando se compara con la especificidad de una proteasa natural o molde por un sustrato diana frente a un sustrato no diana.

H. PROCEDIMIENTOS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN POLIPÉPTIDOS DE CAPTURA DE PROTEASAS (ES DECIR, SERPINAS) O VARIANTES DE LOS MISMOS O PROTEASAS/PROTEASAS MODIFICADAS

Los polipéptidos expuestos en este documento, que incluyen polipéptidos de captura de proteasas o polipéptidos de proteasas o porciones catalíticamente activas de los mismos, que incluyen polipéptidos de MT-SP1 modificados, pueden obtenerse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica para la purificación de proteínas y

expresión de proteínas recombinantes. Puede usarse cualquier procedimiento conocido para aquellos expertos en la materia para la identificación de ácidos nucleicos que codifican genes deseados. Puede usarse cualquier procedimiento disponible en la materia para obtener un clon de ADNc o ADN genómico de longitud completa (es decir, que engloba la región codificante entera) que codifica un polipéptido de captura de proteasas deseado o

- 5 proteína de proteasa tal como de una fuente de células o de tejido. Los polipéptidos modificados, tales como polipéptidos de captura de proteasas variantes o proteasas variantes seleccionadas, pueden manipularse por ingeniería como se describe en este documento a partir de un polipéptido natural tal como por mutagénesis dirigida a sitio.
- 10 Los polipéptidos pueden clonarse o aislarse usando cualquier procedimiento disponible conocido en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácidos nucleicos. Tales procedimientos incluyen amplificación por PCR de ácidos nucleicos y cribado de bibliotecas, que incluye cribado por hibridación de ácidos nucleicos, cribado basado en anticuerpos y cribado basado en actividad.
- 15 Los procedimientos para la amplificación de ácidos nucleicos pueden usarse para aislar moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido deseado que incluyen, por ejemplo, procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Un material que contiene ácido nucleico puede usarse como material de partida a partir del cual puede aislarse una molécula de ácido nucleico deseada que codifica polipéptido. Por ejemplo, en los procedimientos de amplificación pueden usarse preparaciones de ADN y ARNm, extractos de células, extractos de
- 20 tejido, muestras de fluido (por ejemplo, sangre, suero, saliva), muestras de sujetos sanos y/o enfermos. También pueden usarse bibliotecas de ácido nucleico como fuente de material de partida. Los cebadores pueden diseñarse para amplificar un polipéptido deseado. Por ejemplo, los cebadores pueden diseñarse basándose en las secuencias expresadas a partir de las cuales se genera un polipéptido deseado. Pueden diseñarse cebadores basándose en la traducción inversa de una secuencia de aminoácidos de polipéptido. Las moléculas de ácidos nucleicos generadas
- 25 por amplificación pueden secuenciarse y confirmarse que codifican un polipéptido deseado.

Secuencias de nucleótidos adicionales pueden unirse a una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido que incluye secuencias de ligador que contienen sitios de endonucleasa de restricción con el fin de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteína o un vector diseñado para la amplificación de las

- 30 secuencias de ADN que codifican la proteína del núcleo. Además, secuencias de nucleótidos adicionales que especifican elementos de ADN funcional pueden ligarse operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido. Ejemplos de tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias de promotor diseñadas para facilitar la expresión de proteínas intracelulares y las secuencias de secreción diseñadas para facilitar la secreción de proteínas. Secuencias de residuos de nucleótidos adicionales tales como secuencias de bases que especifican regiones de unión a proteína también pueden ligarse a moléculas de ácidos nucleicos que codifican
- 35 proteasa. Tales regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias de residuos que facilitan o codifican proteínas que facilitan la captación de una proteasa en células diana específicas, o alteran de otro modo la farmacocinética de un producto de un gen sintético.
- 40 Además, pueden añadirse marcas u otros restos, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación por afinidad del polipéptido. Por ejemplo, secuencias de residuos de nucleótido adicionales tales como secuencias de bases que especifican una marca de epítipo u otro marcador detectable también puede ligarse a moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteasa o a una molécula de ácido nucleico que codifica serpina, o variantes de las mismas. A modo de ejemplo de tales secuencias y secuencias de ácidos nucleicos que codifican una marca His (por
- 45 ejemplo, 6xHis, HHHHH; SEC ID N°: 496) o marca Flag (DYKDDDDK; SEC ID N°: 495).

Los ácidos nucleicos identificados y aislados pueden entonces insertarse en un vector de clonación apropiado. Puede usarse un gran número de sistemas de vector-huésped conocidos en la técnica. Vectores posibles incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula

- 50 huésped usada. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como derivados de plásmidos pCMV4, pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). La inserción en un vector de clonación puede llevarse a cabo, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene extremos cohesivos complementarios. La inserción puede efectuarse usando vectores de clonación TOPO (INVITROGEN, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios usados para
- 55 fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente. Alternativamente, cualquier sitio deseado puede producirse ligando secuencias de nucleótidos (ligadores) sobre los extremos de ADN; estos ligadores ligados pueden contener oligonucleótidos químicamente sintetizados específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. En un procedimiento alternativo, el vector escindido y el gen de la proteína pueden modificarse por prolongación
- 60 homopolimérica. Las moléculas recombinantes pueden introducirse en células huésped, por ejemplo, por transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de manera que se generan muchas copias de la secuencia génica.

En ejemplos específicos, la transformación de células huésped con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen de proteína aislado, ADNc o secuencia de ADN sintetizada permite la generación de múltiples copias del gen. Por tanto, el gen puede obtenerse en grandes cantidades cultivando transformantes, aislando las moléculas de ADN

- 65

recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperando el gen insertado del ADN recombinante aislado.

1. Vectores y células

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

También se proporcionan vectores que contienen un ácido nucleico que codifica la proteasa modificada según las presentes reivindicaciones. También se proporcionan células que contienen los vectores. Las células incluyen células eucariotas y procariotas, y los vectores son cualquiera adecuado para su uso en este documento.

Se proporcionan células procariotas y eucariotas, que incluyen células endoteliales, que contienen los vectores. Tales células incluyen células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, *Archea*, células vegetales, células de insecto y células animales. Las células se usan para producir una proteína de la misma cultivando las células anteriormente descritas en condiciones a las que la proteína codificada es expresada por la célula, y recuperando la proteína expresada. Para los fines en este documento, por ejemplo, la proteasa puede secretarse en el medio.

En un ejemplo se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de proteasa, y contiene toda o una parte del dominio de proteasa, o múltiples copias del mismo. También se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de proteasa y porciones adicionales de una proteína de proteasa hasta y que incluyen una proteína de proteasa de longitud completa, además de múltiples copias de la misma. Los vectores pueden seleccionarse para la expresión de la proteína de proteasa modificada o dominio de proteasa de la misma en la célula o de forma que la proteína de proteasa se exprese como una proteína secretada. Cuando se expresa el dominio de proteasa, el ácido nucleico se liga a un ácido nucleico que codifica una señal de secreción, tal como la secuencia señal del factor de apareamiento de *Saccharomyces cerevisiae* o una parte de la misma, o la secuencia señal nativa.

Puede usarse una variedad de sistemas de huésped-vector para expresar la secuencia codificante de proteínas. Éstos incluyen, pero no se limitan a, sistemas de células de mamífero infectados con virus (por ejemplo, virus de la varíola, virus de la gripe, adenovirus y otros virus); sistemas de células de insecto infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como vectores de levadura que contienen levadura; o bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN de plásmido o ADN de cósmido. Los elementos de expresión de vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiendo del sistema de huésped-vector usado puede usarse uno cualquiera de varios elementos de transcripción y de traducción adecuados.

Puede usarse cualquier procedimiento conocido para aquellos expertos en la materia para la inserción de fragmentos de ADN en un vector para construir vectores de expresión que contienen un gen quimérico que contiene señales de control de la transcripción/de la traducción apropiadas y secuencias codificantes de proteínas. Estos procedimientos pueden incluir técnicas de ADN recombinante *in vitro* y sintéticas y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteína, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos, puede regularse por una segunda secuencia de ácidos nucleicos de manera que los genes o fragmentos de los mismos se expresan en un huésped transformado con la(s) molécula(s) de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas puede controlarse por cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. En un ejemplo específico, el promotor no es nativo para los genes para una proteína deseada. Promotores que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, el promotor temprano del SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290:304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición del extremo largo 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto y col. Cell 22:787-797 (1980)), el promotor de la timidina cinasa del herpes (Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster y col., Nature 296:39-42 (1982)); vectores de expresión procariotas tales como el promotor de la β -lactamasa (Jay y col., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5543) o el promotor *tac* (DeBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)); véase también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria" en Scientific American 242:79-94 (1980)); vectores de expresión en plantas que contienen el promotor de la nopalina sintetasa (Herrera-Estrella y col., Nature 303:209-213 (1984)) o el promotor 35S del ARN del virus del mosaico de la coliflor (Gardner y col., Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa-bisfosfato-carboxilasa (Herrera-Estrella y col., Nature 310:115-120 (1984)); elementos promotores de levadura y otros hongos tales como el promotor Gal4, el promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de la fosfoglicerol cinasa, el promotor de la fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control de la transcripción animal que presentan especificidad por tejido y se han usado en animales transgénicos: región de control del gen de la elastasa I que es activo en células acinares pancreáticas (Swift y col., Cell 38:639-646 (1984)); Ornitz y col., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7:425-515 (1987)); región de control del gen de la insulina que es activo en células beta pancreáticas (Hanahan y col., Nature 315:115-122 (1985)), región de control del gen

de la inmunoglobulina que es activo en células linfoides (Grosschedl y col., Cell 38:647-658 (1984); Adams y col., Nature 318:533-538 (1985); Alexander y col., Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987)), región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activo en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder y col., Cell 45:485-495 (1986)), región de control del gen de la albúmina que es activo en hígado (Pinckert y col., Genes and Devel. 1:268-276 (1987)), región de control del gen de la alfa-fetoproteína que es activo en hígado (Krumlauf y col., Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer y col., Science 235:53-58 (1987)), región de control del gen de alfa-1-antitripsina que es activo en hígado (Kelsey y col., Genes and Devel. 1:161-171 (1987)), región de control del gen de la beta-globina que es activo en células mieloides (Mogam y col., Nature 315:338-340 (1985); Kollias y col., Cell 46:89-94 (1986)), región de control del gen de la proteína básica de mielina que es activo en células de oligodendrocitos del cerebro (Readhead y col., Cell 48:703-712 (1987)), región de control del gen de la cadena ligera 2 de la miosina que es activo en músculo esquelético (Sani, Nature 314:283-286 (1985)) y región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina que es activo en gonadótropos del hipotálamo (Mason y col., Science 234:1372-1378 (1986)).

En un ejemplo específico se usa un vector que contiene un promotor operativamente ligado a ácidos nucleicos que codifican una proteína deseada, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo de la misma, uno o más orígenes de replicación y opcionalmente uno o más marcadores de selección (por ejemplo, un gen de resistencia a antibiótico). Por ejemplo, vectores y sistemas para la expresión de los dominios de las proteínas de proteasa incluyen los muy conocidos vectores de *Pichia* (disponibles, por ejemplo, de Invitrogen, San Diego, CA), particularmente aquellos diseñados para la secreción de las proteínas codificadas. Vectores de plásmido a modo de ejemplo para la transformación de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA; véase también la bibliografía publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor T5 de fago (reconocido por ARN polimerasa de *E. coli*) y un módulo doble de represión del operador *lac* para proporcionar expresión de alto nivel fuertemente regulada de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de unión ribosómico sintético (RBS II) para la traducción eficiente, una secuencia codificante de la marca 6xHis, terminadores de la transcripción t_0 y T1, origen ColE1 de replicación y un gen de beta-lactamasa para conferir resistencia a ampicilina. Los vectores pQE permiten la colocación de una marca 6xHis en tanto el extremo N como C de la proteína recombinante. Tales plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30 y pQE 31 que proporcionan múltiples sitios de clonación para los tres marcos de lectura y proporcionan la expresión de proteínas marcadas con 6xHis en el extremo N. Otros vectores de plásmido a modo de ejemplo para la transformación de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase la patente de EE.UU. 4.952.496; disponible de NOVAGEN, Madison, WI; véase también la bibliografía publicada por Novagen describiendo el sistema). Tales plásmidos incluyen pET 11a, que contiene el promotor T7lac, terminador T7, el operador *lac* de *E. coli* inducible y el gen del represor *lac*; pET 12a-c, que contiene el promotor T7, terminador T7 y la señal de secreción ompT de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (NOVAGEN, Madison, WI), que contienen una secuencia conductora de His-Tag[™] para su uso en la purificación con una columna de His y un sitio de escisión de trombina que permite la escisión tras la purificación en la columna, la región del promotor T7-lac y el terminador T7.

2. Expresión

Las proteínas, tales como cualquiera expuesta en este documento, que incluyen cualquier polipéptido de captura de proteasas o variantes del mismo, o proteasas seleccionadas o porciones catalíticamente activas de las mismas, pueden producirse mediante cualquier procedimiento conocido para aquellos expertos en la materia que incluye procedimientos *in vivo* e *in vitro*. Las proteínas deseadas pueden expresarse en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades y formas requeridas de las proteínas tales como, por ejemplo, las necesarias para la administración y el tratamiento. Los huéspedes de expresión incluyen organismos procariotas y eucariotas tales como *E. coli*, levadura, plantas, células de insecto, células de mamífero, que incluyen líneas celulares humanas y animales transgénicos. Los huéspedes de expresión pueden diferenciarse en sus niveles de producción de proteínas, además de en los tipos de modificaciones postraduccionales que están presentes en las proteínas expresadas. La elección del huésped de expresión puede hacerse basándose en estos y otros factores tales como consideraciones reguladoras y de seguridad, costes de producción y la necesidad y procedimientos para purificación.

Están disponibles muchos vectores de expresión y son conocidos para aquellos expertos en la materia y pueden usarse para la expresión de proteínas. La elección del vector de expresión estará influida por la elección del sistema de expresión huésped. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores de la transcripción y opcionalmente potenciadores, señales de traducción, y señales de terminación de la transcripción y de la traducción. Los vectores de expresión que se usan para la transformación estable normalmente tienen un marcador de selección que permite la selección y el mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos puede usarse un origen de replicación para amplificar el número de copias del vector.

Proteínas tales como, por ejemplo, cualquier proteasa variante descrita en este documento o cualquier polipéptido de captura de proteasas o variante del mismo también puede utilizarse o expresarse como fusiones de proteínas. Por ejemplo, puede generarse una fusión de proteasas añadiendo funcionalidad adicional a una proteasa. Ejemplos de proteínas de fusión de proteasas incluyen, pero no se limitan a, fusiones de una secuencia señal, una marca tal como para la localización, por ejemplo, una marca his₆ o una marca myc, o una marca para la purificación, por

ejemplo, un fusión GST, y una secuencia para dirigir la secreción de proteínas y/o asociación de membranas.

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

5

a. Células procariotas

Los procariotas, especialmente *E. coli*, proporcionan un sistema para producir grandes cantidades de proteínas. La transformación de *E. coli* es una técnica simple y rápida muy conocida para aquellos expertos en la materia. Los

10

vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles, tales promotores son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteínas y para expresar proteínas que presentan alguna toxicidad para las células huésped. Ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor *lac*, el promotor *trp*, el promotor *tac* híbrido, los promotores de ARN T7 y SP6 y el promotor λ PL regulado por temperatura.

Las proteínas, tales como cualquiera descrita en este documento, pueden expresarse en el entorno citoplásmico de *E. coli*. El citoplasma es un entorno reductor y para algunas moléculas esto puede producir la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Los agentes reductores tales como ditioneitol y β -mercaptoetanol y desnaturizantes tales como guanidina-HCl y urea pueden usarse para resolubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de bacterias que proporciona un entorno oxidante e isomerasas similares a chaperonina y disulfuro isomerasas y puede conducir a la producción de proteína soluble. Normalmente, una secuencia conductora se fusiona con la proteína que va a expresarse que dirige la proteína al periplasma. Entonces, el conductor es eliminado por peptidasas señal dentro del periplasma. Ejemplos de secuencias conductoras que eligen como diana el periplasma incluyen el conductor *pelB* del gen de la *pectato* liasa y el conductor derivado del gen de la *fosfatasa alcalina*. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la fuga de la proteína expresada en el medio de cultivo. La secreción de proteínas permite la rápida y simple purificación del sobrenadante de cultivo. Las proteínas que no son secretadas pueden obtenerse a partir del periplasma por lisis osmótica. Similar a la expresión citoplásmica, en algunos casos las proteínas pueden volverse insolubles, y los desnaturizantes y agentes reductores pueden usarse para facilitar la solubilización y repliegamiento. La temperatura de inducción y el crecimiento también pueden influir los niveles de expresión y solubilidad, normalmente se usan temperaturas entre 25°C y 37°C. Normalmente, las bacterias producen proteínas aglicosiladas. Por tanto, si las proteínas requieren la glicosilación para funcionar, la glicosilación puede añadirse *in vitro* después de la purificación de células huésped.

15

20

25

30

b. Células de levadura

Levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son huéspedes de expresión en levaduras muy conocidos que pueden usarse para la producción de proteínas tales como cualquiera de las descritas en este documento. La levadura puede transformarse con vectores de replicación episómicos o por integración cromosómica estable por recombinación de homólogos. Normalmente se usan promotores inducibles para regular la expresión génica. Ejemplos de tales promotores incluyen GAL1, GAL7 y GAL5 y promotores de la metalotioneína tales como CUP1, AOX1 u otra *Pichia* u otro promotor de la levadura. Los vectores de expresión frecuentemente incluyen un marcador de selección tal como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para la selección y el mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levadura son frecuentemente solubles. La co-expresión con chaperoninas tales como Bip y la proteína disulfuro isomerasa puede mejorar los niveles de expresión y solubilidad. Adicionalmente, las proteínas expresadas en levadura pueden dirigirse para la secreción usando fusiones de péptidos señal de secreción tales como la señal de secreción del factor tipo alfa de apareamiento en levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y fusiones con proteínas de la superficie celular de la levadura tales como el receptor de adhesión del apareamiento Aga2p o la glucoamilasa *Arxula adeninivorans*. Un sitio de escisión de proteasas tal como para la proteasa Kex-2 puede manipularse por ingeniería para eliminar las secuencias fusionadas de los polipéptidos expresados a medida que salen de la vía de secreción. La levadura también puede glicosilarse en los motivos Asn-X-Ser/Thr.

35

40

45

50

c. Células de insecto

Las células de insecto, particularmente usando exposición sobre baculovirus, son útiles para expresar polipéptidos tales como proteasas modificadas o polipéptidos de captura de proteasas modificados. Las células de insecto expresan altos niveles de proteína y son capaces de la mayoría de las modificaciones postraduccionales usadas por eucariotas superiores. Los baculovirus tienen un intervalo huésped restrictivo que mejora la seguridad y reduce los asuntos reguladores de la expresión eucariota. Vectores de expresión típicos usan un promotor para la expresión de alto nivel tal como el promotor de polihedrina de baculovirus. Sistemas de baculovirus comúnmente usados incluyen baculovirus tales como el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) y el virus de la poliedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea de células de insecto tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (AT5) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para la expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótidos de la molécula que va a expresarse se fusiona inmediatamente en la dirección 3' del codón de iniciación de la polihedrina del virus. Las señales de secreción de mamíferos se procesan con exactitud en células de insecto y pueden usarse para secretar la proteína expresada en el medio de cultivo. Además, las líneas celulares *Pseudaletia unipuncta* (AT5) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a sistemas

55

60

65

de células de mamífero.

Un sistema de expresión alternativo en células de insecto es el uso de células establemente transformadas. Líneas celulares tales como las células Schnieder 2 (S2) y Kc (*Drosophila melanogaster*) y las células C7 (*Aedes albopictus*) puede usarse para la expresión. El promotor de la metalotioneína de *Drosophila* puede usarse para inducir altos niveles de expresión en presencia de inducción de metales pesados con cadmio o cobre. Los vectores de expresión se mantienen normalmente por el uso de marcadores de selección tales como neomicina e higromicina.

10 d. Células de mamífero

Los sistemas de expresión de mamífero pueden usarse para expresar proteínas que incluyen proteasas modificadas o porciones catalíticamente activas de las mismas, o polipéptidos de captura de proteasas o variantes de los mismos. Las construcciones de expresión pueden transferirse a células de mamífero por infección vírica tal como adenovirus o por transferencia directa de ADN tal como liposomas, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamífero normalmente incluyen un sitio de caperuza de ARNm, una caja TATA, una secuencia de iniciación de la traducción (secuencia consenso de Kozak) y elementos de poliadenilación. Tales vectores incluyen frecuentemente promotores-potenciadores de la transcripción para la expresión de alto nivel, por ejemplo, el promotor-potenciador del SV40, el promotor del citomegalovirus (CMV) humano y la repetición del extremo largo del virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores-potenciadores son activos en muchos tipos de células. Los promotores de tipos de tejidos y de célula y las regiones de potenciador también pueden usarse para la expresión. Regiones de promotor/potenciador a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aquellas de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus del tumor mamario de ratón, albúmina, alfa-fetoproteína, alfa-1-antitripsina, beta-globina, proteína básica de la mielina, cadena ligera 2 de miosina y control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina. Los marcadores de selección pueden usarse para seleccionar y mantener células con la construcción de expresión. Ejemplos de genes de marcadores de selección incluyen, pero no se limitan a, higromicina B fosfotransferasa, adenosina desaminasa, xantina-guanina fosforibosil transferasa, aminoglucósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa y timidina cinasa. La fusión con moléculas de señalización de la superficie celular tales como TCR- ζ y Fc ϵ RI- γ puede dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo sobre la superficie celular.

Están disponibles muchas líneas celulares para la expresión de mamíferos que incluyen células de ratón, rata, humanas, de mono, pollo y hámster. Líneas celulares a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 de ratón (no secretoras) y otras líneas de células de mieloma, líneas de células de hibridoma y heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, células Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 y HKB. Las líneas celulares también están disponibles adaptadas a medio libre de suero que facilita la purificación de proteínas secretadas del medio de cultivo celular. Un ejemplo tal es la línea celular EBNA-1 libre de suelo (Pham y col., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42.)

40 e. Plantas

Las células vegetales y plantas transgénicas pueden usarse para expresar proteínas tales como cualquiera descrita en este documento. Las construcciones de expresión se transfieren normalmente a plantas usando transferencia directa de ADN tal como bombardeo con microproyectiles y transferencia mediada por PEG en protoplastos, y con transformación mediada por agrobacterias. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias de promotor y de potenciador, elementos de terminación de la transcripción y elementos de control de la traducción. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación se dividen normalmente entre huéspedes dicotiledóneos, tales como *Arabidopsis* y tabaco, y huéspedes monocotiledóneos, tales como maíz y arroz. Ejemplos de promotores de plantas usados para la expresión incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, el promotor de la nopalina sintasa, el promotor de la ribosa-bisfosfato-carboxilasa y los promotores de ubiquitina y UBQ3. Los marcadores de selección tales como higromicina, isomerasa de fosfomanosa y neomicina fosfotransferasa se usan frecuentemente para facilitar la selección y el mantenimiento de células transformadas. Las células vegetales transformadas pueden mantenerse en cultivo como células, agregados (tejido de callo) o regenerarse en plantas completas. Las células vegetales transgénicas también pueden incluir algas manipuladas por ingeniería para producir proteasas o proteasas modificadas (véase, por ejemplo, Mayfield y col. (2003) PNAS 100:438-442). Debido a que las plantas tienen patrones de glicosilación diferentes a los de las células de mamífero, esto puede influir en la elección de proteína producida en estos huéspedes.

60 3. Técnicas de purificación

El procedimiento para la purificación de polipéptidos, que incluyen polipéptidos de proteasas u otras proteínas, de células huésped dependerá de las células huésped y de los sistemas de expresión elegidos. Para moléculas secretadas, las proteínas se purifican generalmente a partir del medio de cultivo después de eliminar las células. Para expresión intracelular, las células pueden lisarse y las proteínas purificarse a partir del extracto. Si se usan organismos transgénicos tales como plantas y animales transgénicos para la expresión, los tejidos u órganos

pueden usarse como material de partida para preparar un extracto de células lisadas. Adicionalmente, la producción de animales transgénicos puede incluir la producción de polipéptidos en leche o huevos, que pueden recogerse y, si fuera necesario, las proteínas pueden extraerse y purificarse adicionalmente usando procedimientos convencionales en la materia.

En un ejemplo, las proteasas pueden expresarse y purificarse para estar en una forma inactiva (forma de zimógeno) o alternativamente la proteasa expresada puede purificarse en una forma activa, tal como una forma bicatenaria, por autocatálisis para eliminar la proregión. Normalmente, la autoactivación se produce durante el procedimiento de purificación tal como incubando a temperatura ambiente durante 24-72 horas. La tasa y el grado de activación depende de la concentración de proteína y la proteasa modificada específica de forma que, por ejemplo, una muestra más diluida puede necesitar incubarse a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo más largo. La activación puede monitorizarse por SDS-PAGE (por ejemplo, un desplazamiento de 3 kilodalton) y por actividad enzimática (escisión de un sustrato fluorogénico). Normalmente se deja que una proteasa alcance >75% de activación antes de la purificación.

Proteínas tales como proteasas o polipéptidos de captura de proteasas pueden purificarse usando técnicas de purificación de proteínas convencionales conocidas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, SDS-PAGE, cromatografía de fraccionamiento de tamaño y de exclusión por tamaño, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tal como intercambio aniónico. Las técnicas de purificación por afinidad también pueden utilizarse para mejorar la eficiencia y pureza de las preparaciones. Por ejemplo, anticuerpos, receptores y otras moléculas que unen proteasas o polipéptidos de captura de proteasas pueden usarse en la purificación por afinidad. Las construcciones de expresión también pueden manipularse por ingeniería añadiendo una marca de afinidad a una proteína tal como un epítopo myc, fusión GST o His₆ y purificarse por afinidad con anticuerpo myc, resina de glutatión y resina de Ni, respectivamente. La pureza puede evaluarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica que incluya electroforesis en gel y tinción y técnicas espectrofotométricas.

4. Proteínas de fusión

También se describen proteínas de fusión que contienen una proteasa variante descrita en este documento y uno o varios polipéptidos. Se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen tales proteínas de fusión formuladas para administración por una vía adecuada. Las proteínas de fusión se forman ligando en cualquier orden la proteasa modificada y otro polipéptido, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, factor de crecimiento, receptor, ligando y otro agente tal con los fines de facilitar la purificación de una proteasa, alterar las propiedades farmacodinámicas de una proteasa dirigiendo la proteasa a una célula o tejido elegido como diana, y/o aumentando la expresión o secreción de una proteasa. Dentro de una proteína de fusión de proteasas, el polipéptido de proteasa puede corresponderse con toda o una porción catalíticamente activa de la misma de una proteína de proteasa. En algunos ejemplos, la proteasa o porción catalíticamente activa de la misma es una proteasa modificada. Las proteínas de fusión descritas en este documento retienen sustancialmente toda su especificidad y/o selectividad por uno cualquiera o más de los sustratos diana deseados. Generalmente, los polipéptidos de fusión de proteasas retienen al menos aproximadamente el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o el 95% de especificidad y/o selectividad por sustrato en comparación con una proteasa de no fusión, que incluye el 96%, 97%, 98%, 99% o especificidad por sustrato mayor en comparación con una proteasa de no fusión.

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

Una proteína de fusión de proteasas puede producirse por técnicas recombinantes convencionales. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos pueden ligarse juntas en marco según técnicas convencionales, por ejemplo, empleando extremos romos o terminados en bisel para la ligación, digestión por enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, llenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseable y ligación enzimática. En otro ejemplo, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a nucleótidos protuberantes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que pueden hibridarse posteriormente y reamplificarse para generar una secuencia de genes quiméricos (véase, por ejemplo, Ausubel y col. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Además, están comercialmente disponibles muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido de GST). Un ácido nucleico que codifica proteasa puede clonarse en un vector de expresión tal de forma que el resto de fusión esté ligado en marco a la proteína de proteasa.

5. Secuencias de nucleótidos

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteasas modificadas según las presentes reivindicaciones se proporcionan en este documento. Las moléculas de ácidos nucleicos incluyen variantes alélicas o variantes de corte y empalme de cualquier proteasa codificada, o porción catalíticamente activa de la misma. En un ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos proporcionadas en este documento tienen al menos el 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o el 99% de identidad de secuencias o se hibridan en condiciones de rigurosidad medio o alta a lo largo de al menos el 70% de una longitud completa de cualquier ácido nucleico codificado por proteasa natural, o porción catalíticamente activa de la misma. En otro ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede incluir aquellas con secuencias de codones degeneradas de cualquiera de las proteasas o porciones catalíticamente activas de las mismas tal como aquellas descritas en este documento.

También se describen moléculas de ácidos nucleicos, o proteínas de fusión que contienen una porción catalíticamente activa de una molécula de ácido nucleico, operativamente ligadas a un promotor, tal como un promotor inducible para la expresión en células de mamífero. Tales promotores incluyen, pero no se limitan a, promotores del CMV y SV40; promotores de adenovirus tales como el promotor del gen E2 que es responsable de la oncoproteína E7 del HPV; un promotor de PV tal como el promotor p89 del PBV que es responsable de la proteína E2 del PV; y otros promotores que son activados por los oncogenes del VIH o PV.

Las proteasas modificadas proporcionadas en este documento según las presentes reivindicaciones también pueden administrarse a las células en vectores de transferencia de genes. Los vectores de transferencia también pueden codificar otro(s) agente(s) terapéutico(s) adicional(es) para el tratamiento de la enfermedad o trastorno, tal como trastornos de la coagulación o cáncer para los que se administra la proteasa. Los vectores de transferencia que codifican una proteasa pueden usarse sistémicamente administrando el ácido nucleico a un sujeto. Por ejemplo, el vector de transferencia puede ser un vector vírico, tal como un vector de adenovirus. Los vectores que codifican una proteasa también pueden incorporarse en citoblastos y administrarse tales citoblastos a un sujeto tal como por trasplante o injerto de los citoblastos en sitios para terapia. Por ejemplo, los citoblastos mesenquimatosos (MSC) pueden manipularse por ingeniería para expresar una proteasa y tales MSC injertarse en un sitio tumoral para terapia.

I. PREPARACIÓN, FORMULACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE POLIPÉPTIDOS DE PROTEASAS SELECCIONADOS

1. Composiciones y administración

Las composiciones de proteasas seleccionadas pueden formularse para administración por cualquier vía conocida para aquellos expertos en la materia que incluye inyección intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, administración subcutánea, epidural, nasal, oral, rectal, tópica, por inhalación, bucal (por ejemplo, sublingual) y transdérmica o cualquier vía. Las proteasas seleccionadas pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse con otros agentes biológicamente activos, tanto secuencialmente, intermitentemente como en la misma composición. La administración puede ser local, tópica o sistémica dependiendo del sitio de tratamiento. La administración local a un área en necesidad de tratamiento puede lograrse, por ejemplo, pero no se limita a, por infusión local durante cirugía, administración tópica, por ejemplo, conjuntamente con un vendaje para heridas después de cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante. La administración también puede incluir sistemas de liberación controlada que incluyen formulaciones de liberación controlada y dispositivo de liberación controlada tal como por medio de una bomba. La vía más adecuada en cualquier caso dado depende de una variedad de factores tales como la naturaleza de la enfermedad, el progreso de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad, la composición particular que se usa.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar proteasas seleccionadas tales como, pero no se limitan a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que pueden expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor y administración de moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteasas seleccionadas tales como sistemas de administración de retrovirus.

Pueden prepararse composiciones farmacéuticas que contienen proteasas seleccionadas. Generalmente, las composiciones farmacéuticamente aceptables se preparan en vista de las aprobaciones de una agencia reguladora u otra agencia preparadas según la farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y en seres humanos. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos tales como un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra una isoforma. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites que incluyen aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es un vehículo típico cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las soluciones salinas y la dextrosa acuosa y las disoluciones de glicerol también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Las composiciones pueden contener junto con un principio activo: un diluyente tal como lactosa,

- sacarosa, fosfato de dicalcio o carboximetilcelulosa; un lubricante tal como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales tales como goma arábica, gelatina, glucosa, molasas, polivinilpirrolidina, celulosas y derivados de los mismos, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes tales conocidos para aquellos expertos en la materia. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitano, trietanolamina, acetato sódico, oleato de trietanolamina y otros agentes tales. Estas composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Una composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y otros agentes tales. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, generalmente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo de manera que se proporcione la forma para administración apropiada al paciente. La formulación debería adecuarse al modo de administración.
- Las formulaciones se proporcionan para administración a seres humanos y animales en formas de dosificación unitaria tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, disoluciones o suspensiones parenterales estériles y disoluciones o suspensiones orales, y emulsiones de aceite en agua que contienen cantidades adecuadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos farmacéuticamente terapéuticamente activos y derivados de los mismos se formulan y se administran normalmente en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiple. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el excipiente, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Ejemplos de formas de dosis unitaria incluyen ampollas y jeringuillas y comprimidos o cápsulas individualmente envasados. Las formas de dosis unitaria pueden administrarse en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitaria idénticas envasadas en un único recipiente que va a administrarse en forma de dosis unitaria segregada. Ejemplos de formas de dosis múltiple incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o frascos de pintas o galones. Por tanto, la forma de dosis múltiple es un múltiplo de dosis unitarias que no están segregadas en el envase.
- Pueden prepararse formas de dosificación o composiciones que contienen principio activo en el intervalo del 0,005% al 100% con el equilibrio constituido por vehículo no tóxico. Para administración por vía oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas mediante medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica.
- La preparación farmacéutica también puede ser en forma líquida, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o puede presentarse como un producto terminado para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico).
- Las formulaciones adecuadas para administración rectal pueden proporcionarse como supositorios de dosis unitaria. Éstos pueden prepararse mezclando el compuesto activo con uno o más vehículos sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y luego moldeando la mezcla resultante.
- Las formulaciones adecuadas para administración tópica a la piel o al ojo incluyen pomadas, cremas, lociones, pastas, geles, esprays, aerosoles y aceites. Vehículos a modo de ejemplo incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes y combinaciones de dos o más de los mismos. Las formulaciones tópicas también pueden contener del 0,05 al 15, 20, 25 por ciento en peso de espesantes seleccionados de entre hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), poli(alquilenglicoles), poli(hidroxi)alquilo, (met)acrilatos o poli(met)acrilamidas. Una formulación tópica se aplica frecuentemente por instilación o como una pomada en el saco conjuntival. También puede usarse para irrigación o lubricación del ojo, senos faciales y meato auditivo externo. También puede inyectarse en la cámara anterior del ojo y otros sitios. Una formulación tópica en estado líquido también puede estar presente en una matriz polimérica tridimensional hidrófila en forma de una tira reactiva o lente de contacto, de las que se liberan los componentes activos.

Para administración por inhalación, los compuestos para su uso en este documento pueden administrarse en forma de una presentación en spray de aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionándose una válvula para administrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para su uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las formulaciones adecuadas para administración bucal (sublingual) incluyen, por ejemplo, pastillas para chupar que contienen el compuesto activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; y pastillas que contienen el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga.

Las composiciones farmacéuticas de proteasas seleccionadas pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril u otros disolventes, antes de uso.

Se proporcionan formulaciones adecuadas para administración transdérmica. Pueden proporcionarse en cualquier forma adecuada tal como parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Tales parches contienen el compuesto activo en disolución acuosa opcionalmente tamponada de, por ejemplo, concentración 0,1 a 0,2 M con respecto al compuesto activo. Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica también pueden administrarse por iontoforesis (véase, por ejemplo, Pharmaceutical Research 3(6), 318 (1986)) y normalmente toman la forma de una disolución acuosa opcionalmente tamponada del compuesto activo.

Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por formulaciones de liberación controlada y/o dispositivos de administración (véanse, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 3.536.809; 3.598.123; 3.630.200; 3.845.770; 3.847.770; 3.916.899; 4.008.719; 4.687.610; 4.769.027; 5.059.595; 5.073.543; 5.120.548; 5.354.566; 5.591.767; 5.639.476; 5.674.533 y 5.733.566).

En ciertos ejemplos también pueden emplearse liposomas y/o nanopartículas con administración de proteasas seleccionadas. Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que están dispersados en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilaminares (también llamadas vesículas multilaminares (MLV)). Las MLV generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 µm. La sonicación de MLV produce la formación de pequeñas vesículas unilaminares (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 angstrom que contienen una disolución acuosa en el núcleo.

Los fosfolípidos pueden formar una variedad de estructuras distintas de liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la relación molar de lípido con respecto a agua. A bajas relaciones se forman los liposomas. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden mostrar baja permeabilidad a sustancias iónicas y polares, pero a temperaturas elevadas experimentan una transición de fases que altera sustancialmente su permeabilidad. La transición de fases implica un cambio de una estructura ordenada estrechamente empaquetada conocida como el estado de gel a una estructura menos ordenada empaquetada de forma suelta conocida como el estado fluido. Esto se produce a una temperatura de transición de fases característica y produce un aumento en la permeabilidad a iones, azúcares y fármacos.

Los liposomas interactúan con células mediante diferentes mecanismos: endocitosis por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial tal como macrófagos y neutrófilos; adsorción a la superficie celular, tanto por fuerzas hidrófobas o electrostáticas débiles no específicas como por interacciones específicas con componentes de la superficie celular; fusión con la membrana de células plasmáticas por inserción de la bicapa lipídica del liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea de contenidos liposomales en el citoplasma; y por transferencia de lípidos liposomales a membranas celulares o subcelulares, o viceversa, sin ninguna asociación de los contenidos de los liposomas. El variar la formulación de liposomas puede alterar qué mecanismo está operativo, aunque al mismo tiempo puede operar más de uno. Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de una forma estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (de tamaño alrededor de 0,1 µm) deberían diseñarse usando polímeros que pudieran degradarse *in vivo*. Las nanopartículas de poli(cianoacrilato de alquilo) biodegradables que cumplen estos requisitos se contemplan para su uso en este documento, y tales partículas pueden prepararse fácilmente.

Pueden emplearse procedimientos de administración para disminuir la exposición de proteasas seleccionadas a procedimientos degradativos tales como degradación proteolítica e intervención inmunológica mediante respuestas antigénicas e inmunogénicas. Ejemplos de tales procedimientos incluyen administración local en el sitio de tratamiento. Se ha informado de la pegilación de agentes terapéuticos para aumentar la resistencia a la proteólisis,

aumentar la semivida en plasma y disminuir la antigenicidad e inmunogenicidad. Ejemplos de metodologías de pegilación se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Lu y Felix, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 43: 127-138, 1994; Lu y Felix, *Peptide Res.*, 6: 142-6, 1993; Felix y col., *Int. J. Peptide Res.*, 46: 253-64, 1995; Benhar y col., *J. Biol. Chem.*, 269: 13398-404, 1994; Brumeanu y col., *J. Immunol.*, 154: 3088-95, 1995; véase también Caliceti y col. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77 y Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S). La pegilación también puede usarse en la administración de moléculas de ácidos nucleicos *in vivo*. Por ejemplo, la pegilación de adenovirus puede aumentar la estabilidad y la transferencia génica (véase, por ejemplo, Cheng y col. (2003) *Pharm. Res.* 20(9): 1444-51).

Pueden mantenerse niveles en sangre deseables por una infusión continua del agente activo como se establece por niveles en plasma. Debe observarse que el médico adjunto sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia para reducir la dosificación debido a toxicidad, o disfunciones de la médula ósea, hígado o riñón. En cambio, el médico adjunto también sabría cómo y cuándo ajustar el tratamiento a mayores niveles si la respuesta clínica no fuera adecuada (excluyendo efectos secundarios tóxicos).

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse, por ejemplo, por las vías de administración oral, pulmonar, parental (inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), inhalación (mediante una formulación de polvo fino), transdérmica, nasal, vaginal, rectal o sublingual, y pueden formularse en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración (véanse, por ejemplo, las solicitudes PCT internacionales WO 93/25221 y WO 94/17784; y la solicitud de patente europea 613.683).

Una proteasa seleccionada se incluye en el vehículo farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios no deseables en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente probando los compuestos en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos tales como los ensayos descritos en este documento.

La concentración de una proteasa seleccionada en la composición depende de las tasas de absorción, inactivación y secreción del complejo, las características fisicoquímicas del complejo, el programa de dosificación y la cantidad administrada, además de otros factores conocidos para aquellos expertos en la materia. La cantidad de una proteasa seleccionada que va a administrarse para el tratamiento de una enfermedad o afección, por ejemplo, tratamiento de cáncer o angiogénesis, puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse ensayos *in vitro* y modelos animales para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosificación precisa, que puede determinarse empíricamente, puede depender de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad.

Una proteasa seleccionada puede administrarse de una vez, o puede dividirse en varias dosis más pequeñas para administrarse a intervalos de tiempo. Las proteasas seleccionadas pueden administrarse en una o más dosis durante el transcurso de un tiempo de tratamiento, por ejemplo, durante varias horas, días, semanas o meses. En algunos casos es útil la administración continua. Se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento es una función de la enfermedad que está tratándose y puede determinarse empíricamente usando protocolos de prueba conocidos o por extrapolación de datos de prueba *in vivo* o *in vitro*. Debe observarse que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección que va a aliviarse. Debe entenderse adicionalmente que para cualquier sujeto particular, las pautas de dosificación específicas deberían ajustarse con el tiempo según las necesidades individuales y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración expuestos en este documento son sólo a modo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance o uso de composiciones y combinaciones que las contienen. Las composiciones pueden administrarse cada hora, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o una sola vez. El modo de administración de la composición que contiene los polipéptidos, además de las composiciones que contienen los ácidos nucleicos para terapia génica, incluye, pero no se limita a, administración intralesional, intraperitoneal, intramuscular y intravenosa. También se incluyen administración por infusión, intratecal, subcutánea, mediada por liposomas, mediada por liberación prolongada. También se incluyen administración nasal, ocular, oral, tópica, local y ótica. Las dosificaciones pueden determinarse empíricamente y dependen de la indicación, modo de administración y el sujeto. Dosificaciones a modo de ejemplo incluyen 0,1, 1, 10, 100, 200 y más mg/día/kg de peso del sujeto.

2. Expresión *in vivo* de proteasas seleccionadas y terapia génica

Las proteasas seleccionadas pueden administrarse a células y tejidos por expresión de moléculas de ácidos nucleicos. Las proteasas seleccionadas pueden administrarse como moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteasa seleccionada, que incluye técnicas *ex vivo* y expresión directa *in vivo*.

a. Administración de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos pueden administrarse a células y tejidos mediante cualquier procedimiento conocido para aquellos expertos en la materia.

i. Vectores – Episómicos e integrantes

Los procedimientos para administrar proteasas seleccionadas por expresión de moléculas de ácidos nucleicos codificantes incluyen administración de vectores recombinantes. El vector puede diseñarse para permanecer episómico, tal como por inclusión de un origen de replicación, o puede diseñarse para integrarse en un cromosoma en la célula. Los vectores recombinantes pueden incluir vectores víricos y vectores no víricos. Vectores víricos no limitantes incluyen, por ejemplo, vector adenovírico, vectores del virus del herpes, vectores retrovíricos, y cualquier otro vector vírico conocido para un experto en la materia. Vectores no víricos no limitantes incluyen cromosomas artificiales o liposomas u otro vector no vírico. Las proteasas seleccionadas también puede usarse en terapia de expresión génica *ex vivo* usando vectores víricos y no víricos. Por ejemplo, las células pueden manipularse por ingeniería para expresar una proteasa seleccionada tal como integrando un ácido nucleico que codifica proteasa seleccionada en una localización genómica, tanto operativamente ligado a secuencias reguladoras como de forma que se coloque operativamente ligado a secuencias reguladoras en una localización genómica. Entonces, tales células pueden administrarse localmente o sistémicamente a un sujeto, tal como un paciente en necesidad de tratamiento.

Una proteasa seleccionada puede expresarse por un virus, que se administra a un sujeto en necesidad de tratamiento. Vectores víricos adecuados para terapia génica incluyen adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, lentivirus y otros anteriormente observados. Por ejemplo, la tecnología de expresión en adenovirus es muy conocida en la técnica y los procedimientos de producción y administración de adenovirus también son muy conocidos. Están disponibles serotipos de adenovirus, por ejemplo, de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC, Rockville, MD). Los adenovirus pueden usarse *ex vivo*, por ejemplo, se aíslan células de un paciente en necesidad de tratamiento, y se transducen con un vector de adenovirus que expresa proteasa seleccionada. Después de un periodo de cultivo adecuado, las células transducidas se administran a un sujeto, localmente y/o sistémicamente. Alternativamente, las partículas de adenovirus que expresan proteasa seleccionada se aíslan y se formulan en un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad o afección de un sujeto. Normalmente, las partículas de adenovirus se administran a una dosis que oscila de 1 partícula a 10¹⁴ partículas por kilogramo de peso de sujeto, generalmente entre 10⁶ ó 10⁸ partículas a 10¹² partículas por kilogramo de peso de sujeto. En algunas situaciones se desea proporcionar una fuente de ácido nucleico con un agente que elige como diana células, tal como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie celular o una célula diana, o un ligando para un receptor sobre una célula diana.

ii. Cromosomas artificiales y otros procedimientos de administración de vectores no víricos

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden introducirse en cromosomas artificiales y otros vectores no víricos. Los cromosomas artificiales (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.077.697 y la solicitud PCT internacional n° WO 02/097059) pueden manipularse por ingeniería para codificar y expresar la isoforma.

iii. Liposomas y otras formas encapsuladas y administración de células que contienen ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos pueden encapsularse en un vehículo tal como un liposoma o introducirse en células tales como una célula bacteriana, particularmente una bacteria atenuada, o introducirse en un vector vírico. Por ejemplo, si se emplean liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de la membrana de la superficie celular asociada a endocitosis pueden usarse para elegir como diana y/o para facilitar la captación, por ejemplo, de proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas trópicos para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en la ciclación y proteínas que eligen como diana localización intracelular y potencian la semivida intracelular.

b. Administración *in vitro* y *ex vivo*

Para procedimientos *ex vivo* e *in vivo*, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la proteasa seleccionada se introducen en células que son de un donante adecuado o el sujeto que va a tratarse. Las células en las que un ácido nucleico puede introducirse para los fines de terapia incluyen, por ejemplo, cualquier tipo de célula disponible deseado apropiado para la enfermedad o afección que va a tratarse que incluye, pero no se limita a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; glóbulos sanguíneos tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, tales como citoblastos obtenidos de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal y otras fuentes de los mismos.

Para tratamiento *ex vivo*, las células de un donante compatible con el sujeto que va a tratarse, o células del sujeto que va a tratarse, se extraen, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al sujeto. El tratamiento incluye la administración directa tal como o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.892.538 y 5.283.187). Técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamífero *in vitro* incluyen el

uso de liposomas y lípidos catiónicos (por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol), procedimientos de electroporación, microinyección, fusión de células, DEAE-dextrano y precipitación con fosfato de calcio. Los procedimientos de administración de ADN pueden usarse para expresar proteasas seleccionadas *in vivo*. Tales procedimientos incluyen administración de liposomas de ácidos nucleicos y administración de ADN desnudo, que incluye

La expresión *in vivo* de una proteasa seleccionada puede ligarse para la expresión de moléculas adicionales. Por ejemplo, la expresión de una proteasa seleccionada puede ligarse a expresión de un producto citotóxico tal como en un virus manipulado por ingeniería o expresarse en un virus citotóxico. Tales virus pueden elegirse como diana para un tipo de célula particular que es una diana para un efecto terapéutico. La proteasa seleccionada expresada puede usarse para potenciar la citotoxicidad del virus.

La expresión *in vivo* de una proteasa seleccionada puede incluir ligar operativamente una molécula de ácido nucleico que codifica proteasa seleccionada a secuencias del regulador específicas tales como un promotor específico de célula o específico de tejido. Las proteasas seleccionadas también pueden expresarse a partir de vectores que infectan y/o se replican específicamente en tipos de células diana y/o tejidos. Los promotores inducibles pueden usarse para regular selectivamente la expresión de proteasas seleccionadas.

c. Administración sistémica, local y tópica

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

La administración también puede ser directa tal como por administración de un vector o células que normalmente eligen como diana una célula o tejido. Por ejemplo, pueden elegirse células tumorales y células proliferantes como células diana para la expresión *in vivo* de proteasas seleccionadas. Las células usadas para la expresión *in vivo* de una isoforma también incluyen células autólogas al paciente. Tales células pueden extraerse de un paciente, introducirse los ácidos nucleicos para la expresión de una proteasa seleccionada y luego administrarse a un paciente tal como mediante inyección o injerto.

2. Terapias de combinación

Cualquiera de los polipéptidos de proteasas seleccionados, y moléculas de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de proteasas seleccionados descritos en este documento, pueden administrarse en combinación con, antes de, intermitentemente con o posterior a otros agentes terapéuticos o procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, otros agentes biológicos, compuestos de moléculas pequeñas y cirugía. Para cualquier enfermedad o afección, que incluye todas aquellas ejemplificadas anteriormente, para la que están disponibles otros agentes y tratamientos, los polipéptidos de proteasas seleccionados para tales enfermedades y afecciones pueden usarse en combinación con los mismos. Por ejemplo, los polipéptidos de proteasas seleccionados descritos en este documento para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, por ejemplo, cáncer, pueden administrarse en combinación con, antes de, intermitentemente con o posterior a otros agentes terapéuticos anticancerígenos, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, radionúclidos, radioterapia, citocinas, factores de crecimiento, agentes fotosensibilizantes, toxinas, antimetabolitos, moduladores de la señalización, antibióticos anticancerígenos, anticuerpos anticancerígenos, inhibidores de la angiogénesis, o una combinación de los mismos. En un ejemplo específico, los polipéptidos de proteasas seleccionados descritos en este documento para el tratamiento de enfermedades trombóticas pueden administrarse en combinación con, antes de, intermitentemente con o posterior a otros agentes anticoagulantes que incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de plaquetas, vasodilatadores, activadores fibrinolíticos u otros anticoagulantes. Anticoagulantes a modo de ejemplo incluyen heparina, cumarina, hirudina, aspirina, naproxeno, ácido meclofenámico, ibuprofeno, indometacina, fenilbutazona, ticlopidina, estreptocinasa, urocinasa y activador tisular del plasminógeno.

3. Artículos de fabricación y kits

Los compuestos farmacéuticos de polipéptidos de proteasas seleccionados para ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de proteasas seleccionados, o un derivado o una porción biológicamente activa de los mismos, pueden envasarse como artículos de fabricación que contienen material de envasado, una composición farmacéutica que es eficaz para tratar la enfermedad o trastorno y una etiqueta que indica que el polipéptido de proteasa seleccionado o molécula de ácido nucleico va a usarse para tratar la enfermedad o trastorno.

Los materiales de fabricación descritos en este documento contienen materiales de envasado. Los materiales de envasado para su uso en el envasado de productos farmacéuticos son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.252. Ejemplos de materiales

de envasado farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, envases alveolados, frascos, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringuillas, botellas, y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y modo de administración y tratamiento previsto. Se contempla una amplia matriz de formulaciones de los compuestos y composiciones descritos en este documento como una variedad de tratamientos para cualquier enfermedad o trastorno mediado por diana.

Los polipéptidos de proteasas seleccionados y las moléculas de ácidos nucleicos también pueden proporcionarse como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en este documento y un artículo para administración. Por ejemplo, una proteasa seleccionada puede suministrarse con un dispositivo para administración tal como una jeringuilla, un inhalador, un vaso de dosificación, un cuentagotas o un aplicador. El kit puede incluir opcionalmente instrucciones para la administración que incluyen dosificaciones, pautas de dosificación e instrucciones para los modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en este documento y un artículo para el diagnóstico. Por ejemplo, tales kits pueden incluir un artículo para medir la concentración, cantidad o actividad de la proteasa seleccionada en un sujeto.

J. PROCEDIMIENTOS A MODO DE EJEMPLO DE TRATAMIENTO CON POLIPÉPTIDOS DE PROTEASAS SELECCIONADOS

Los polipéptidos de proteasas seleccionados descritos en este documento que escinden dianas particulares y moléculas de ácidos nucleicos que codifican las proteasas seleccionadas descritas en este documento puede usarse para el tratamiento de cualquier enfermedad o afección asociada a una proteína que contiene la secuencia diana o para la que se emplea una proteasa que escinde la secuencia diana. Por ejemplo, los polipéptidos de uPA seleccionados manipulados por ingeniería para escindir sustratos diana de tPA tales como plasminógeno pueden usarse para el tratamiento de cualquier enfermedad o afección asociada al sustrato diana de tPA o para el que se emplean los polipéptidos de tPA. Enfermedades a modo de ejemplo asociadas a un sustrato diana de tPA incluyen enfermedades trombolíticas en las que tratamiento con una proteasa seleccionada proporcionada en este documento puede promover la escisión de plasminógeno a su forma de proteasa activa plasmina, e inducir la disolución de un coágulo de sangre.

Los polipéptidos de proteasas seleccionados tienen actividad terapéutica solos o en combinación con otros agentes. La polipéptidos de proteasas seleccionados descritos en este documento se diseñan para presentar propiedades mejoradas con respecto a las proteínas de unión competentes. Tales propiedades pueden, por ejemplo, mejorar la eficacia terapéutica de los polipéptidos. Esta sección proporciona usos a modo de ejemplo de y procedimientos de administración. Estas terapias descritas son a modo de ejemplo y no limitan las aplicaciones de polipéptidos de proteasas seleccionados.

Los polipéptidos de proteasas seleccionados descritos en este documento pueden usarse en diversos procedimientos terapéuticos, además de procedimientos de diagnóstico, que están asociados a una proteína que contiene la secuencia diana. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, procedimientos de tratamiento de afecciones fisiológicas y médicas descritas y enumeradas más adelante. Los polipéptidos de proteasas seleccionados descritos en este documento pueden presentar mejora de actividades *in vivo* y efectos terapéuticos en comparación con proteínas de unión competentes o una proteasa que escinde la diana particular, que incluye menor dosificación para lograr el mismo efecto, un efecto terapéutico más sostenido y otras mejoras en la administración y el tratamiento. Ejemplos de mejoras terapéuticas usando los polipéptidos de proteasas seleccionados incluyen, pero no se limitan a, mejor penetración en el tejido diana (por ejemplo, penetración en tumores), mayor eficacia, menores dosificaciones, menos administraciones y/o menos frecuentes, disminución de efectos secundarios y efectos terapéuticos elevados. Notablemente, debido a que las proteasas seleccionadas pueden escindir e inactivar altos números de sustrato diana, las proteasas seleccionadas ofrecen amplificación terapéutica sustancial.

En particular, los polipéptidos de proteasas seleccionados están previstos para su uso en procedimientos terapéuticos en los que una proteasa que escinde la diana particular se ha usado para el tratamiento. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, procedimientos de tratamiento de enfermedades y trastornos tales como, pero no se limitan a, trastornos de la coagulación de la sangre que incluyen trastornos trombolíticos y coagulación intravascular diseminada, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurológicos, enfermedades proliferativas tales como cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, infección vírica, infección bacteriana, enfermedades respiratorias, trastornos gastrointestinales y enfermedades metabólicas.

El tratamiento de enfermedades y afecciones con polipéptidos de proteasas seleccionados puede efectuarse por cualquier vía de administración adecuada usando formulaciones adecuadas como se describen en este documento que incluyen, pero no se limitan a, inyección intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, administración subcutánea, epidural, nasal oral, rectal, tópica, por inhalación, bucal (por ejemplo, sublingual) y transdérmica. Si fuera necesario, un protocolo de dosificación y de duración y de tratamiento particular puede determinarse empíricamente o extrapolarse. Por ejemplo, una dosis a modo de ejemplo de polipéptidos de proteasa natural que escinden secuencias similares puede usarse como punto de partida para determinar dosificaciones apropiadas. Por ejemplo, una dosificación de un polipéptido de tPA recombinante puede usarse como pauta para determinar

dosificaciones de polipéptidos de uPA seleccionados que escinden dianas de tPA.

Los niveles y las pautas de dosificación pueden determinarse basándose en dosificaciones y pautas conocidas y, si fuera necesario, pueden extrapolarse basándose en los cambios en propiedades de los polipéptidos de proteasas seleccionados y/o pueden determinarse empíricamente basándose en una variedad de factores. Al hacer tales determinaciones pueden usarse factores tales como el nivel de actividad y la semivida de los polipéptidos de proteasas seleccionados en comparación con otras proteasas similares. Las dosificaciones y pautas particulares pueden determinarse empíricamente. Otros factores tales incluyen peso corporal del individuo, salud general, edad, la actividad del compuesto específico empleado, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de secreción, combinación de fármacos, la gravedad y la evolución de la enfermedad, y la disposición del paciente a la enfermedad y el juicio del médico práctico. El principio activo, el polipéptido de proteasa seleccionado, normalmente se combina con un vehículo farmacéuticamente eficaz. La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación unitaria o una forma de dosificación múltiple puede variar dependiendo del huésped tratado y del modo de administración particular.

El efecto de los polipéptidos de proteasas seleccionados sobre el tratamiento de una enfermedad o mejora de los síntomas de una enfermedad puede monitorizarse usando cualquier prueba de diagnóstico conocida en la técnica para la enfermedad particular que va a tratarse. Tras la mejora de la afección de un paciente puede administrarse una dosis de mantenimiento de un compuesto o composiciones, si fuera necesario, y puede modificarse la dosificación, la forma de dosificación, o frecuencia de administración, o una combinación de las mismas. En algunos casos, un sujeto puede requerir tratamiento intermitente a largo plazo basado en cualquier reaparición de los síntomas de enfermedad o basado en las dosificaciones programadas. En otros casos pueden requerirse administraciones adicionales en respuesta a acontecimientos agudos tales como hemorragia, traumatismo o procedimientos quirúrgicos.

En algunos ejemplos se emplean variantes de las proteínas de proteasa seleccionadas que funcionan tanto de agonistas de proteasas (es decir, miméticos) como de antagonistas de proteasas. Las variantes del polipéptido de proteasa seleccionado pueden generarse por mutagénesis (por ejemplo, mutación puntual discreta o truncación de la proteína de proteasa). Un agonista del polipéptido de proteasa seleccionado puede retener sustancialmente las mismas, o un subconjunto de, actividades biológicas de la forma que se produce naturalmente del polipéptido de proteasa seleccionado. Un antagonista del polipéptido de proteasa seleccionado puede inhibir una o más de las actividades de la forma que se produce naturalmente del polipéptido de proteasa seleccionado, por ejemplo, escindiendo la misma proteína diana que el polipéptido de proteasa seleccionado. Por tanto, pueden provocarse efectos biológicos específicos mediante tratamiento con una variante de función limitada. En un ejemplo, el tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subconjunto de las actividades biológicas de la forma que se produce naturalmente del polipéptido de proteasa seleccionado tiene menos efectos secundarios en un sujeto que un tratamiento con la forma que se produce naturalmente del polipéptido de proteasa seleccionado.

Lo siguiente son algunas enfermedades o afecciones a modo de ejemplo para las que las proteasas seleccionadas pueden usarse como agente de tratamiento solo o en combinación con otros agentes. Las dianas a modo de ejemplo para la selección de proteasas son para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de posibles dianas para su uso en los procedimientos descritos en este documento.

Procedimientos a modo de ejemplo de tratamiento para polipéptidos de MT-SP1 seleccionados que escinden dianas de proteínas del complemento

Los polipéptidos de proteasas proporcionados en este documento según las presentes reivindicaciones pueden usarse para el tratamiento de afecciones en las que participe la activación de la ruta del complemento, particularmente afecciones inflamatorias que incluyen afecciones inflamatorias agudas tales como choque séptico, y afecciones inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide (AR). Las afecciones agudas e inflamatorias pueden manifestarse como una enfermedad inmunomediada tal como, por ejemplo, enfermedad autoinmunitaria o lesión de tejido producida por inflamación mediada por inmunocomplejo. Una afección inflamatoria mediada por complemento también puede manifestarse como una enfermedad neurodegenerativa o cardiovascular que tiene componentes inflamatorios. Esta sección proporciona a modo de ejemplo usos de y procedimientos de administración de proteasas. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, los procedimientos de tratamiento de afecciones fisiológicas y médicas descritas y enumeradas más adelante. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, procedimientos de tratamiento de septicemia, artritis reumatoide (AR), glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP), lupus eritematoso, esclerosis múltiple (EM), miastenia grave (MG), asma, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome disneico, lesión inflamatoria aguda de tejido mediada por inmunocomplejo (IC), insuficiencia multiorgánica, enfermedad de Alzheimer (EA), lesiones por isquemia-reperfusión producidas por acontecimientos o tratamientos tales como infarto de miocardio (IM), accidente cerebrovascular, derivación cardiopulmonar (DCP) o injerto de derivación de la arteria coronaria, angioplastia o hemodiálisis, o síndrome de Guillan-Barre.

El tratamiento de enfermedades y afecciones con proteasas puede efectuarse por cualquier vía de administración adecuada usando formulaciones adecuadas como se describe en este documento que incluyen, pero no se limitan a, inyección subcutánea, administración oral y transdérmica. Si fuera necesario, un protocolo de dosificación y de

duración y de tratamiento particular puede determinarse empíricamente o extrapolarse. Por ejemplo, dosis a modo de ejemplo de polipéptidos de proteasas recombinantes y nativas pueden usarse como punto de partida para determinar dosificaciones apropiadas. Las proteasas modificadas que tienen más especificidad y/o selectividad en comparación con una proteasa natural o estructural pueden ser eficaces en cantidades y o frecuencias de dosificación reducidas. Los niveles de dosificación pueden determinarse basándose en una variedad de factores tales como peso corporal del individuo, salud general, edad, la actividad del compuesto específico empleado, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de secreción, combinación de fármacos, la gravedad y la evolución de la enfermedad, y la disposición del paciente a la enfermedad y el juicio del médico práctico. La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación unitaria varían dependiendo del huésped tratado y del modo de administración particular.

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

a. Enfermedades inflamatorias inmunomediadas

Las proteasas y proteasas modificadas seleccionadas en el procedimiento descrito en este documento que incluyen, pero no se limitan a, proteasas MT-SP1 variantes proporcionadas en este documento, pueden usarse para tratar enfermedades inflamatorias. Las enfermedades inflamatorias que pueden tratarse con proteasas incluyen enfermedades inflamatorias agudas y crónicas. Enfermedades inflamatorias a modo de ejemplo incluyen enfermedades del sistema nervioso central (SNC), enfermedades autoinmunitarias, afecciones por hiperreceptividad de las vías respiratorias tales como en asma, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino y lesión inflamatoria aguda de tejido mediada por inmunocomplejo (IC).

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) puede servir de modelo para esclerosis múltiple (EM) (Piddlesden y col., (1994) J Immunol 152:5477). La EAE puede inducirse en varias especies genéticamente susceptibles por inmunización con mielina y componentes de mielina tales como proteína básica de la mielina, proteína de proteolípido y glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG). Por ejemplo, la EAE inducida por MOG resume características esenciales de la EM humana que incluyen la evolución crónica de la enfermedad clínica recurrente de la tríada patohistológica de inflamación, gliosis reactiva y formación de placas desmielinizadas confluentes grandes. Las proteasas y proteasas modificadas pueden evaluarse en modelos animales de EAE. Las proteasas se administran tal como por inyección intraperitoneal diaria y la evolución y la progresión de los síntomas se monitoriza en comparación con animales de control. Los niveles de componentes inflamatorios del complemento que pueden exacerbar la enfermedad también pueden medirse ensayando la actividad del complemento en suero en un ensayo hemolítico y ensayando la deposición de componentes del complemento tales como, por ejemplo, C1, C3 y C9.

La activación del complemento modula la inflamación en enfermedades tales como artritis reumatoide (AR) (Wang y col., (1995) PNAS 92:8955). Las proteasas y proteasas modificadas, que incluyen polipéptidos de MT-SP1 variantes proporcionados en este documento, pueden usarse para tratar AR. Por ejemplo, las proteasas pueden inyectarse localmente o sistémicamente. Las proteasas pueden dosificarse diariamente o semanalmente. Las proteasas PEGiladas pueden usarse para reducir la inmunogenicidad. En un ejemplo, la artritis inducida por colágeno de tipo II (AIC) puede inducirse en ratones como un modelo de enfermedad inflamatoria de las articulaciones autoinmune que es histológicamente similar a AR caracterizada por sinovitis inflamatorias, formación de paño sinovial y erosión de cartílago y hueso. Para inducir AIC, el colágeno bovino de tipo II (B-CII) en presencia de adyuvante completo de Freund puede inyectarse intradérmicamente en la base de la cola. Después de 21 días, los ratones pueden volver a inmunizarse usando el mismo protocolo. Para examinar los efectos de una proteasa o proteasa modificada, que incluye polipéptidos de MT-SP1, 3 semanas tras la exposición inicial a B-CII, una proteasa o control puede administrarse intraperitonealmente dos veces a la semana durante 3 semanas. Los ratones pueden sacrificarse 7 semanas tras la inmunización inicial para el análisis histológico. Para evaluar el efecto terapéutico de una proteasa sobre la enfermedad establecida, una proteasa puede administrarse diariamente durante un total de 10 días tras la aparición de artritis clínica en una o más extremidades. El grado de hinchazón en las articulaciones inicialmente afectadas puede monitorizarse midiendo el espesor de la pata usando compases calibradores. En ambos modelos, el suero puede extraerse de los ratones para ensayos hemolíticos y la medición de marcadores de activación del complemento tales como, por ejemplo, C5a y C5b-9. En otro ejemplo están disponibles modelos de primate para tratamientos de AR. La respuesta de articulaciones doloridas e hinchadas puede monitorizarse en sujetos tratados con polipéptidos de proteasas y controles para evaluar el tratamiento con proteasa.

Las proteasas o proteasas modificadas que incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de MT-SP1 variantes proporcionados en este documento pueden usarse para tratar lesión inflamatoria aguda de tejido mediada por inmunocomplejo (IC). La lesión mediada por IC se produce por una respuesta inflamatoria local contra la deposición de IC en un tejido. La respuesta inflamatoria subsiguiente se caracteriza por edema, neutrofilia, hemorragia y finalmente necrosis del tejido. La lesión de tejido mediada por IC puede estudiarse en una reacción de Arthus (RPA) *in vivo*. Brevemente, en la reacción de RPA, un exceso de anticuerpo (tal como, por ejemplo, IgG de conejo dirigida

contra albúmina de huevo de gallina) se inyecta en la piel de animales tales como, por ejemplo, ratas o cobayas, a las que previamente se les ha infundido intravenosamente el antígeno correspondiente (es decir, albúmina de huevo de gallina) (Szalai y col., (2000) J Immunol 164:463). Inmediatamente antes de la iniciación de una reacción de RPA, una proteasa, o un control en bolo, puede administrarse al mismo tiempo que el antígeno correspondiente por una inyección intravenosa por la vena femoral derecha. Alternativamente, una proteasa puede administrarse durante la hora inicial de la reacción de RPA, empezando inmediatamente después de la inyección del antígeno y justo antes de la inyección dérmica del anticuerpo. Los efectos de una proteasa sobre la generación de lesión de tejido medida por IC dependiente del complemento pueden evaluarse en diversos momentos después de la iniciación de RPA recogiendo sangre para determinar la actividad hemolítica en suero, y recogiendo el área infectada de la piel para la cuantificación del tamaño de la lesión.

Las proteasas terapéuticas, tales como aquellas descritas en este documento que incluyen polipéptidos de MT-SP1 variantes proporcionados en este documento, pueden usarse para tratar septicemia y septicemia grave que puede producir choque mortal. Un modelo de choque mortal mediado por complemento puede usarse para probar los efectos de una proteasa como agente terapéutico. En un ejemplo tal, ratas pueden cebarse con una cantidad traza de lipopolisacárido (LPS), seguido de la administración de un anticuerpo monoclonal contra un inhibidor de la membrana del complemento (anti-Crry) (Mizuno M y col., (2002) Int Arch Allergy Immunol 127:55). Una proteasa o control puede administrarse en cualquier momento durante la evolución del inicio del choque mortal tal como antes del cebado con LPS, después del cebado con LPS o después de la administración de anti-Crry, y puede evaluarse el rescate de ratas del choque mortal.

b. Enfermedad neurodegenerativa

La activación del complemento agrava la progresión de enfermedad de Alzheimer (EA) y contribuye a la pérdida de neuritas en cerebros con EA. Las proteasas y proteasas modificadas descritas en este documento que incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de MT-SP1 variantes proporcionados en este documento, pueden usarse para tratar EA. Los modelos de ratón que imitan algunas de las características neuropatológicas y de comportamiento de EA pueden usarse para evaluar los efectos terapéuticos de proteasas. Ejemplos de modelos de ratón transgénico incluyen introducir la proteína del precursor amiloide humano (APP) o la proteína presenilina 1 (PS1) con mutaciones que producen enfermedad en ratones bajo el control de un promotor agresivo. Estos ratones desarrollan características de EA que incluyen aumento en las placas beta-amiloides y neuritas distróficas. Los ratones transgénicos dobles para proteínas mutantes APP y PS1 desarrollan mayores números de placas beta-amiloides fibrilares y muestran glía activada y factores de complemento asociados a la placa. Las proteasas pueden administrarse tal como por inyecciones intraperitoneales o intravenosas diarias, y la evolución y la progresión de los síntomas se monitoriza en comparación con animales de control.

c. Enfermedad cardiovascular

Las proteasas y proteasas modificadas descritas en este documento que incluyen, pero no se limitan a, proteasas MT-SP1 variantes proporcionadas en este documento, pueden usarse para tratar enfermedad cardiovascular. Las proteasas pueden usarse en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares que incluyen lesión por isquemia-reperusión resultante de accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, derivación cardiopulmonar, injerto de derivación de la arteria coronaria, angioplastia o hemodiálisis. Las proteasas también pueden usarse en el tratamiento de la respuesta inflamatoria asociada a derivación cardiopulmonar que puede contribuir a lesión de tejido. Generalmente, una proteasa puede administrarse antes de, concomitantemente con o posterior a un tratamiento o acontecimiento que induce una lesión por isquemia-reperusión mediada por complemento. En un ejemplo, una proteasa puede administrarse a un sujeto antes del tratamiento de un sujeto por un acontecimiento inductor de lesión isquémica mediado por complemento tal como, por ejemplo, injerto de derivación de la arteria coronaria de angioplastia.

Los efectos de una proteasa sobre el tratamiento de lesión por isquemia-reperusión pueden evaluarse en modelos animales de la lesión. En un modelo tal, la isquemia miocárdica se induce en conejos a los que se les hizo una incisión en su pericardio anterior para colocar una sutura de seda 3-0 alrededor de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) de 5-8 mm desde su origen y apretando la ligadura de manera que el vaso se ocluyera completamente (Buerke y col., (2001) J Immunol 167:5375). Una proteasa tal como, por ejemplo, un polipéptido de MT-SP1 variante proporcionado en este documento, o un vehículo de control tal como solución salina, puede administrarse intravenosamente en dosis crecientes como un bolo 55 minutos después de la oclusión coronaria (es decir, 5 minutos antes de la reperusión). Cinco minutos después (es decir, después de un total de 60 minutos de isquemia), la ligadura de LAD puede deshacerse y el miocardio isquémico puede volver a perfundirse durante 3 horas. Al final del periodo de reperusión se aprieta la ligadura alrededor de la LAD. Los efectos de una proteasa sobre la lesión por isquemia pueden analizarse evaluando los efectos sobre necrosis miocárdica, niveles de creatina cinasa en plasma y marcadores de activación neutrófila tales como, por ejemplo, actividad de mieloperoxidasa y liberación de radicales superóxido.

En otro modelo de lesión miocárdica mediada por complemento sostenida tras la perfusión de corazones de ratón aislados con tampón de Krebs-Henseleit que contiene 6% de plasma humano, el tratamiento con proteasas o

proteasas modificadas puede usarse para limitar la lesión de tejido al corazón. En un ejemplo tal, el tampón usado para perfundir los corazones puede complementarse con dosis variables de proteasas tales como, pero no se limitan a, proteasas variantes que incluyen los polipéptidos de MT-SP1 proporcionados en este documento. Los corazones perfundidos pueden ensayarse para la deposición de C3 y C5b-9 humana, tensión de perfusión de la arteria coronaria, tensión diastólica final y frecuencia cardíaca.

Las proteasas y proteasas modificadas tales como, por ejemplo, los polipéptidos de MT-SP1 variantes proporcionados en este documento, pueden usarse como agentes terapéuticos antes de o tras la derivación cardiopulmonar (DCP) o injerto de derivación de la arteria coronaria para inhibir la respuesta inmunitaria inflamatoria que frecuentemente sigue a la derivación y que puede contribuir a lesión de tejido. Una recirculación *in vitro* de sangre completa en un circuito de derivación extracorpóreo puede usarse para estimular cambios de plaquetas y leucocitos y la activación del complemento inducido por DCP (Rinder y col. (1995) *J. Clin. Invest.* 96:1564). En un modelo tal, la adición de una proteasa o proteasa modificada o tampón de control, en dosis variables, puede añadirse a una bolsa de transferencia que ya contiene sangre de un donante sano y heparina porcina, justo antes de la adición de la sangre al circuito extracorpóreo. Las muestras de sangre pueden extraerse a 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos después de la recirculación y ensayarse para estudios de complemento tales como, por ejemplo, ensayos hemolíticos y/o ensayos de activación del complemento para medir C5a, C3a y/o sC5b-9. Como control puede usarse una muestra de sangre de pretratamiento extraída antes de su adición al circuito extracorpóreo. Puede realizarse la citometría de flujo de muestras de sangre para determinar los niveles de moléculas de adhesión en poblaciones de leucocitos en circulación (es decir, neutrófilos) en la sangre tal como, por ejemplo, niveles de CD11b y de P-selectina.

K. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos están incluidos sólo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Inhibidores de PAI-1 mutante

A. Expresión y purificación de inhibidores de PAI-1 mutante

El plásmido recombinante pPAIST7HS que lleva el ADNc de PAI-1 humano (que codifica PAI-1 maduro que contiene una Met en el extremo N como se expone en SEC ID N°: 396) se usó como molde para introducir modificaciones en la secuencia de aminoácidos del bucle del centro reactivo de PAI-1. El plásmido pPAISTHS es un derivado del plásmido pPAIST7 que carece del sitio *HindIII* en el par de nucleótidos 1 y del sitio *Sall* en el par de nucleótidos 2106. El plásmido pPAIST7 se generó como se ha descrito (Franke y col. (1990) *Biochimic et Biophysica Acta* 1037: 16-23). Brevemente, el clon de ADNc de PAI-1 pPAI-11RB se escindió con las endonucleasas de restricción *ApaLI* y *PfIMI*, y el fragmento de 1127 pb de PAI-1 que contenía 2 pb del codón para el residuo 1 de PAI-1 y la secuencia codificante completa para los residuos 2-376 de la proteína de 379 residuos se purificó por electroforesis en gel. Se construyeron ligadores sintéticos para la reconstrucción de ambos extremos de la secuencia codificante de ADNc de PAI-1 y para introducir un codón de iniciación de síntesis de proteínas ATG inmediatamente antes del triplete que codifica el primer residuo de PAI-1 maduro generando un PAI-1 maduro que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 396. Además, para facilitar la inserción de la región codificante del ADNc en el plásmido pBR322, los ligadores se diseñaron para generar sitios de endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII* en los extremos 5' y 3', respectivamente, del fragmento de ADNc de PAI-1. Los ligadores sintéticos son del siguiente modo: extremo N, 5'-AATTCTATGG-3' (SEC ID N°: 392) y 5'-TGCACCATAG-3' (SEC ID N°: 393); extremo C, 5'-ATGGAACCTGAA-3' (SEC ID N°: 394) y 5'-AGCTTCAGGGTTCATCAC-3' (SEC ID N°: 395). Los ligadores se trataron con cinasa de polinucleótido antes de uso. Los ligadores sintéticos (10 pb en el extremo 5' y 13 pb en el extremo 3') se ligaron luego con el fragmento de ADN *ApaLI-PfIMI* de 1127 pb, se digirieron con *EcoRI* y *HindIII* y el fragmento de *EcoRI-HindIII* de 1146 pb se aisló por electroforesis en gel y se clonó en pBR322 escindido con *EcoRI* y *HindIII* (SEC ID N°: 377).

Para iniciar la construcción del plásmido de expresión pPAIST-7, el subclon del vector pBR322 se escindió con *EcoRI* y el plásmido lineal se desfosforiló usando fosfatasa alcalina bacteriana. Usando un fragmento de ADN de *EcoRI* de 360 pb de pC5A-48 que contiene el promotor *trp* y el sitio de unión a ribosoma, el pPAIST-7 se generó tras la ligación convencional.

Para generar el vector de expresión procariota pPAIST7HS (Shubeita y col. (1990) *J Biol. Chem.*, 265: 18379-18385), pPAIST7 se digirió parcialmente con *HindIII* para linealizar el plásmido, se hizo romo con el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli* y se ligó para eliminar el sitio *HindIII* en la dirección 5'. La delección de las secuencias en pPAIST7 en la dirección 3' de las secuencias codificantes de PAI-1 entre los sitios *HindIII* y *Sall* y la eliminación del sitio *Sall* se llevó a cabo por digestión parcial secuencial con *Sall*, digestión completa con *HindIII*, creación de extremos romos con el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli* y ligación.

La reacción de mutagénesis se llevó a cabo usando el kit de mutagénesis Multi site (Stratagene) siguiendo las condiciones especificadas por el proveedor. Se hizo la mutagénesis de aminoácidos en PAI-1 natural en las posiciones P4-P1' en el bucle del centro reactivo correspondiente a los aminoácidos VSARM (SEC ID N°: 378). Se hizo un PAI-1 mutante (PAI-1/RRAR) que contenía el reemplazo de la secuencia de aminoácidos natural VSARM con las secuencias RRARM (SEC ID N°: 379) en el bucle del centro reactivo de PAI-1 de las posiciones P4 a P1'. La secuencia del cebador mutagénico de RRARM fue: 5'-CCACAGCTGTCATAAGGAGGGCCAGAATGGCCCCGAGGAGATC-3' (SEC ID N°: 380). Se hizo un segundo PAI-1 mutante (PAI-1/69) que contenía el reemplazo de la secuencia de aminoácidos natural VSARM con la secuencia PFGRS (SEC ID N°: 389) en el bucle del centro reactivo de PAI-1 de las posiciones P4 a P1'. La secuencia para el cebador mutagénico de PFGRS era: 5'CCACAGCTGTCATACCCCTTCGGCAGAAGCGCCCCGAGGAGATC-3' (SEC ID N°: 390). Tras la mutagénesis, el ADN aislado de los transformantes se secuenció completamente para confirmar la presencia de mutaciones deseadas y la ausencia de cualquier mutación adicional.

Los mutantes PAI-1/RRAR y PAI-1/69 se expresaron como proteínas de fusión utilizando residuos de polihistidina del extremo N presentes en el vector pPAIST7HS. La expresión y purificación de PAI-1 mutantes (es decir, PAI-1/RRAR y PAI-1/69) se basaron en procedimientos como se describen en Ke y col. (J Biol. Chem., 272: 16603-16609 (1997)). La expresión de variantes naturales y mutadas de PAI-1 se llevó a cabo transformando 0,1 µg de ADN del vector pPAIST7HS que codifica PAI-1 mutante en la cepa de *E. coli* BL21 [DE3]pLys^s (Novagen), que sintetiza ARN polimerasa T7 en presencia de isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido. Los cultivos bacterianos se cultivaron a 37°C con agitación vigorosa a una absorbancia A₅₉₅ de 1,1-1,3, y se añadió isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido a una concentración final de 1 mM para inducir la síntesis de ARN polimerasa T7 y la producción de proteínas de PAI-1. Los cultivos se cultivaron durante 1-2 h adicionales a 37°C y luego se desplazaron a 30°C durante 2-6 h. Las células se sedimentaron por centrifugación a 8000 × g durante 20 min a 4°C y se resuspendieron en 40 ml de tampón de inicio frío (acetato sódico 20 mM, NaCl 200 mM y 0,01% de Tween 20, pH 5,6). La suspensión de células se interrumpió en una celda de presión French (Aminco), y el residuo celular se eliminó por ultracentrifugación durante 25 min a 32.000 × g.

La purificación de PAI-1 mutante activo soluble se realizó inyectando el lisado de *E. coli* que contenía la forma soluble de PAI-1/RRAR o PAI-1/69 sobre una columna XK-26 (Pharmacia Biotech Inc) empaquetada con CM-50 Sephadex (Pharmacia, véase, por ejemplo, Sancho y col. (1994) Eur. J. Biochem. 224, 125-134). La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón de inicio (acetato sódico 20 mM, NaCl 200 mM y 0,01% de Tween 20, pH 5,6), y las proteínas de PAI-1 se eluyeron usando un gradiente lineal 0,2-1,8 M de NaCl en el mismo tampón. Las fracciones pico se recogieron, se reunieron y se concentraron usando un concentrador Centriplus 30 (Amicon). Las fracciones concentradas se usaron para la medición de la actividad.

B. Mediciones de la actividad de PAI-1

1. Valoración de sitios activos contra tripsina patrón

La concentración activa de PAI-1/RRAR y PAI-1/69 se determinó por valoración de sitios activos contra tripsina patrón como se describe por Olson y col. (J. Biol. Chem., 270: 30007 (1995)). Brevemente, se hicieron adiciones secuenciales de inhibidor concentrado (0,5 - 6,0 µM) a disoluciones de β-tripsina 1 µM (Sigma) y sonda de p-aminobenzamidina 10 µM (Sigma). La unión se monitorizó a partir del descenso en la fluorescencia que acompaña al desplazamiento de la sonda unida del sitio activo de la enzima a medida que se une el inhibidor. Después de la adición de cada inhibidor concentrado se dejó un tiempo de equilibrio de 1-2 minutos antes de la evaluación de los cambios de fluorescencia a las longitudes de onda de excitación y de emisión de 325 nm y 345 nm, respectivamente, para maximizar la diferencia entre la fluorescencia de la sonda unida y libre. Las valoraciones de control de sólo la sonda con el inhibidor en ausencia de la enzima tripsina se realizaron para corregir la fluorescencia de referencia. Las valoraciones de inhibidor-enzima se ajustaron por análisis de regresión lineal.

2. Valoración de preparaciones de t-PA normalizadas

También se valoraron PAI-1 mutantes contra preparaciones de t-PA normalizadas para evaluar la actividad. La actividad inhibidora de PAI-1 natural o PAI-1 mutante se midió por un ensayo cromogénico directo usando tPA (American Diagnostics, Inc, 100 U/µg) y el sustrato de tPA cromogénico H-D-Ile-Pro-Arg-para-nitroanilina (S-2288, Chromogenix). PAI-1 seriadamente diluido (0,1 - 4,0 µg) se incubó con t-PA en una placa de microtitulación durante un tiempo fijo (normalmente, 20-60 minutos) a temperatura ambiente y la actividad residual de tPA se midió mediante la adición del sustrato cromogénico S-2288 a una concentración final de 0,5 mM. La actividad residual de t-PA tras la incubación con concentraciones crecientes de inhibidor se evaluó midiendo la absorbancia a 405 nm.

EJEMPLO 2**Construcción de bibliotecas de exposición sobre fago de variantes de u-PA****5 A. Clonación de u-PA natural en fagémido**

Para demostrar la exposición funcional del dominio de proteasa u-PA sobre fago se realizó PCR de alta fidelidad usando los cebadores 496 y 497, ADN polimerasa Pfu y el plásmido pCMV4 (SEC ID N°: 373) que contiene ADNc del gen de u-PA de longitud completa (SEC ID N°: 474) como molde. Los cebadores usados en la amplificación por PCR fueron los siguientes: 496, 5'-ACGTGGCCCGAGCGGCCTTTTCAGTGTGGCCAAAAG-3' (SEC ID N°: 374); 497, 5'-TCCTGGCCCGCCTGGCCGAGCAGGCCATTCTC-3' (SEC ID N°: 375). Ambos cebadores llevan sitios de restricción (subrayados) para la enzima *Sfi*I en el extremo 5'. Después de la purificación y la digestión con *Sfi*I, el producto de PCR se ligó al vector de fagémido digerido con *Sfi*I, pComb3H (SEC ID N°: 376) (Andris-Widhopf y col. (2000) J Immunol Methods, 28: 159-81). El fagémido se usó para la exposición monovalente de u-PA natural o mutante (véase más adelante). Esta construcción contiene secuencias que codifican la región del extremo C del gen gIIIp del fago fd. La presencia de dos sitios de restricción *Sfi*I en el vector con dos secuencias de reconocimiento diferentes se explotó para diseñar los cebadores anteriormente mencionados. Los productos de PCR amplificados usando los cebadores 496 y 497 permitieron la clonación direccional del ADNc del dominio de proteasa u-PA (SEC ID N°: 475) en el fagémido (véase más adelante para las condiciones de ligación). En la construcción final, los productos de PCR que contienen secuencias del dominio de proteasa u-PA se clonaron en el centro de secuencias de *OmpA* y *gIIIp* para exponer u-PA natural o mutante como una fusión de *gIIIp* del extremo N.

B. Construcción de u-PA mutante y bibliotecas de exposición sobre fago de u-PA mutante

Para construir bibliotecas de exposición sobre fago de u-PA, la amplificación por PCR propensa a error se llevó a cabo usando el plásmido pCMV4/u-PA que contiene ADNc del gen de uPA como molde, como se expone anteriormente, durante 25 ciclos en mezclas de reacción de 100 µl usando reactivos suministrados con el kit de mutagénesis PCR Diversify (Clontech). Se siguieron condiciones de PCR apropiadas para ajustar tres reacciones de PCR diferentes para amplificar sólo el dominio de proteasa del gen de uPA (SEC ID N°: 475) usando los cebadores 496 y 497 de antes variando las cantidades de manganeso (Mn^{2+}) o dGTP como se describe por el fabricante para lograr el 0,2, 0,5 o el 0,9% de incorporación de la tasa de mutación en el ADNc. Los productos de PCR amplificados (805 pb, SEC ID N°: 475) se purificaron usando un kit de purificación de PCR (Qiagen) seguido de digestión con la enzima *Sfi*I. Los productos de PCR digeridos con *Sfi*I de cada reacción de mutagénesis se usaron para generar tres bibliotecas diferentes.

Para la construcción de bibliotecas, el vector pComb3H (SEC ID N°: 376) se digirió con la enzima *Sfi*I y el fragmento de ADN más grande de esta reacción se purificó en gel usando un kit "Gel slice" (Qiagen). Se llevaron a cabo tres reacciones de ligación separadas para construir tres bibliotecas con productos de PCR que contenían 0,2, 0,5 y 0,9% de tasas de mutación. Al menos 1 µg del vector purificado en gel se mezcló con productos de PCR digeridos con *Sfi*I (relación 1:2) y las mezclas de ligación se incubaron durante la noche a 18°C. A continuación, las mezclas de ligación se purificaron usando el kit Qiagen mini elute (Qiagen) y el ADN se eluyó finalmente en 60 µl de agua purificada Milli Q. El ADN purificado se sometió a electroporación en 400 µl de células competentes para electroporación XL-1 Blue de *E. coli* (Stratagene) usando un pulsador de genes (Bio Rad). Entonces, las células se transfirieron a 10 ml de medio SOC (Invitrogen) y se incubaron a 37°C en un agitador durante 1 h seguido de siembra en placas de agar de LB grandes (245 mm x 245 mm) complementado con carbenicilina (75 µg/ml). Después de la incubación durante la noche de las placas a 30°C, los transformantes se rascaron usando una rasqueta de células y los cultivos resultantes se cultivaron en 2x medio YT complementado con carbenicilina (75 µg/ml) a 37°C agitando durante 2 horas. Los cultivos se infectaron con fago colaborador (VCS M13) a una MOI (multiplicidad de infección) de 5 para la amplificación de las bibliotecas. Después de 1 hora de crecimiento a 37°C agitando, los cultivos se complementaron con kanamicina a concentraciones finales de 3 µg/ml y se cultivaron durante la noche a 30°C con agitación. Las células se recogieron y las partículas de fago presentes en el sobrenadante se precipitaron usando una disolución de PEG-NaCl. Simultáneamente, para calcular la diversidad de cada biblioteca, una alícuota de las células electroporadas se sembró en placas de agar de LB complementado con carbenicilina (100 µg/ml) y después de la incubación durante la noche a 37°C las colonias se contaron. Se usaron los mismos procedimientos para generar generaciones sucesivas de bibliotecas de exposición sobre fago de u-PA para mejorar adicionalmente las variantes de u-PA identificadas contra el inhibidor PAI-1/RRAR. El ADN de variantes de u-PA identificadas de las bibliotecas previas se usó como molde para la construcción de bibliotecas de la siguiente generación.

Las eficiencias catalíticas de las bibliotecas de fago natural o de u-PA generadas usando mutagénesis al azar se analizaron usando el ensayo indirecto de activación del plasminógeno. Brevemente, 5 µl de fago de u-PA (normalmente $\sim 5 \times 10^{12}$ ufc), Lys-plasminógeno 0,2 µM (American Diagnostic) y Spectrozyme PL 0,62 mM (American Diagnostica) estaban presentes en un volumen total de 100 µl. Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación, y la densidad óptica a 405 nm se leyó cada 30 segundos durante 1 h en un Thermomax de Molecular Devices. Las reacciones se realizaron a 37°C. La inhibición de u-PA o el fago de la variante de u-PA también se evaluó. Brevemente, 5 µl de fagos de u-PA (normalmente $\sim 5 \times 10^{12}$ ufc) se mezclaron con PAI-1 natural (0,1 µM) o

inhibidor PAI-1/RRAR mutante (1,0 μ M) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente seguido de la adición de Spectrozyme PL 0,62 mM, Lys-plasminógeno 0,2 μ M (American Diagnostics, Inc.). Los ensayos se leyeron como se ha mencionado antes.

5 Ejemplo 3

Selección de u-PA variante de bibliotecas de fago de u-PA contra inhibidor mutante

A. Selección de complejos de fago de u-PA/ PAI-1 mutante

El inhibidor PAI-1/RRAR mutante o PAI-1/69 se usaron como “sustrato cebo” en el experimento de inmunoadsorción para aislar fago/s de u-PA alterado/s con reactividad mejorada hacia la secuencia del sustrato mutante de bibliotecas de exposición sobre fago de u-PA combinatorias grandes descritas en el Ejemplo 2 anterior. En resumen, 5 μ l ($\sim 2 \times 10^{12}$ a $\sim 1 \times 10^{13}$) de fago de u-PA, que contiene una representación igual de fago de u-PA de las tres bibliotecas de fago de u-PA (0,2, 0,5 y 0,9% de frecuencia de mutagénesis), se mezclaron con 5 μ l de sustrato cebo (PAI-1/RRAR o PAI-1/69 0,1 a 1,0 μ M) y 10 μ l de 10x tampón indirecto a pH 7,4 (Tris 0,5 M, NaCl 1,0 M, EDTA 10 mM, 0,1% de Tween 80) en un volumen total de 100 μ l (es decir, la reacción contuvo 80 μ l de H₂O). La reacción se incubó durante tiempos variables a temperatura ambiente (normalmente 1 hora, sin embargo, el tiempo de incubación se ajustó para controlar la rigurosidad de la disolución).

Los complejos de fago de u-PA-inhibidor PAI-1 se capturaron usando Sepharose activada con CuSO₄. La pre-activación de Sepharose quelante (200 μ l; Pharmacia) se llevó a cabo mediante tratamiento con CuSO₄ (100 mM). Sepharose activada con CuSO₄ se bloqueó con 0,5% de BSA en tampón PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron 100 μ l de perlas Sepharose bloqueadas con BSA a 100 μ l de la reacción de mezcla de inmunoadsorción anterior en presencia de 800 μ l de tampón de unión (NaCl 0,5 M, Tris 20 mM, imidazol 20 mM, pH 7,4) para capturar los complejos de inhibidor PAI-1-fago de u-PA marcados con His. La incubación continuó durante otra 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de inmunoadsorción se centrifugó durante 1 min a 2000 rpm y las perlas Sepharose que contenían los complejos de fago de u-PA-inhibidor PAI-1 unidos se lavaron con 1 ml de tampón de unión para eliminar los fagos sin unir. La etapa de lavado se repitió 5-10 veces y las perlas que contenían complejos unidos se transfirieron a tubos nuevos después de cada lavado para evitar cualquier posible “remanente” de fagos no específicos.

Los complejos de fago de u-PA-PAI-1/RRAR unidos se eluyeron en 100 μ l de tampón de elución (EDTA 0,5 M). Una alícuota de 95 μ l de los fagos eluidos se usó para infectar 1 ml de células XL-1 Blue de *E. coli* (DO 0,6) para calcular la salida de las bibliotecas (que indica el número de fago obtenido después de la selección). Las bacterias infectadas se sembraron en placas grandes (245 mm x 245 mm) que contenían carbenicilina (75 μ g/ml) para generar una biblioteca para la siguiente ronda de selección. Finalmente, la biblioteca de salida restante (es decir, el fago seleccionado) se usó para preparar clones de fago individuales para el cribado y/o generar una nueva biblioteca para la siguiente ronda de selección. Las concentraciones de sustrato cebo usadas en la selección y los tiempos de incubación de la biblioteca con el sustrato cebo se ajustaron según el nivel de rigurosidad deseado. Por ejemplo, las condiciones se elegirían de forma que < 1%, 2%, 5%, 10%, o más del 10%, de la actividad de u-PA de la biblioteca fuera inhibida por el “PAI-1 cebo” que contiene la secuencia del sustrato cebo. Normalmente, la primera ronda de selección se llevó a cabo usando mayores concentraciones (por ejemplo, 0,5 μ M) de PAI-1 cebo y para rondas sucesivas de selección se redujeron la concentración de serpina cebo y el tiempo de incubación con bibliotecas. Además, pueden usarse múltiples rigurosidades en paralelo en cada ronda de selección. Basándose en la calidad de la salida (por ejemplo, relación señal con respecto a ruido de la salida de fago en las selecciones de serpina cebo +/- emparejadas (véase la descripción más adelante)) y la calidad de los “éxitos” resultantes basándose en análisis funcionales, la salida de fago de una o más de estas selecciones puede llevarse a la(s) siguiente(s) ronda(s) de selección.

En paralelo, los experimentos de control se realizaron usando las condiciones anteriormente mencionadas para la selección de fago de la biblioteca de u-PA sin cebo y el fago de este experimento de control se comparó con la salida de las selecciones de biblioteca en presencia de sustrato de serpina de cebo. Las ufc de la salida de la biblioteca seleccionada en presencia de cebo estuvieron normalmente en el intervalo de 10^4 a 10^5 , superior a la salida obtenida de la selección de control. Si se observó una mayor referencia con la selección de control, la inmunoadsorción se repitió usando condiciones más rigurosas tales como reduciendo los tiempos de incubación, aumentando las concentraciones de reactivos (biblioteca, cebo o perlas) y aumentando el número y el tiempo de lavado del fago seleccionado unido a Sepharose quelante (hasta un factor de 10 o más).

B. Cribado de fagos de u-PA con reactividad y eficiencia catalítica elevadas hacia nuevas secuencias de sustrato

Una alícuota de fagos de u-PA eluidos (5 μ l) se mezcló con células XL-1 Blue de *E. coli* (100 μ l) para la infección y se incubaron a 37°C durante 1 h. Entonces, las células de *E. coli* infectadas se sembraron en placas de agar de LB complementado con carbenicilina (100 μ g/ml). Después de la incubación durante la noche a 37°C, las colonias individuales se recogieron para preparaciones de fagos. Las células se cultivaron en 2 ml de 2x YT complementado

con carbenicilina (100 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml) y la preparación de fagos se realizó como se ha descrito (Sambrook, J y col. (1989) Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold spring Harbor laboratory). El fago identificado se probó en los siguientes ensayos para evaluar la actividad. Las preparaciones de fagos individuales se usaron en el ensayo indirecto de activación del plasminógeno para identificar fagos activos, y las preparaciones de fagos activos se usaron para los ensayos de inhibición.

1. Ensayo indirecto de activación del plasminógeno

Las preparaciones de fagos individuales se usaron en el ensayo indirecto de activación del plasminógeno para identificar fagos de u-PA activos. Brevemente, 5 µl de fago de u-PA (normalmente $\sim 5 \times 10^{12}$ ufc), Lys-plasminógeno 0,2 µM (American Diagnostic) y Spectrozyme PL 0,62 mM (American Diagnostica) estaban presentes en un volumen total de 100 µl. Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación, y la densidad óptica a 405 nm se leyó cada 30 segundos durante 1 h en un Thermomax de Molecular Devices. Las reacciones se realizaron a 37°C.

2. Inhibición de fago de u-PA por PAI-1/RRAR mutante

El fago que se identificó como activo en el ensayo indirecto de actividad de plasminógeno se probó adicionalmente para la inhibición por PAI-1/RRAR mutante. Brevemente, para los ensayos de inhibición, 5 µl de fagos de u-PA activos (normalmente $\sim 5 \times 10^{12}$ ufc) se añadieron a pocillos duplicados de una placa de microtitulación seguido de la adición de una concentración fija de PAI-1 mutante (por ejemplo, 1,0 µM) a un pocillo y solución salina tamponada con fosfato (PBS) al pocillo duplicado. Después de mezclar, la reacción se dejó continuar durante un tiempo fijo (por ejemplo, 30 min) a temperatura ambiente, seguido de adición de Spectrozyme PL 0,62 mM, Lys-plasminógeno 0,2 µM (American Diagnostics, Inc.). Para los experimentos de control, el fago de u-PA natural se evaluó bajo las mismas condiciones. Las placas se leyeron a 405 nm en un espectrofotómetro durante 2 h. Los fagos de u-PA seleccionados que presentaron sensibilidad mejorada por PAI-1/RRAR o PAI-1/69 en comparación con fago de u-PA natural se seleccionaron para análisis adicionales y se sometieron a secuenciación de ADN.

3. Cribado del sustrato de péptido

Además, para identificar variantes de fago de u-PA con eficiencia catalítica mejorada, los clones de fago individuales se cribaron contra un sustrato Ac-RRAR-AMC. Para el ensayo, un volumen fijo de los sobrenadantes de fagos (por ejemplo, 35 µl) se mezcló con el sustrato Ac-RRAR-AMC 75 µM en 1x tampón de ensayo indirecto (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, 0,01% de Tween 80) en un volumen total de 100 µl. El ensayo se llevó a cabo en placas de ensayo negras de 96 pocillos o de 384 pocillos (Corning) y se leyeron a 380-450 nm durante 2 h en un lector de espectrofotómetro (Molecular Devices).

Para confirmar su mejora, los fagos de u-PA positivos identificados después de los cribados de inhibidor y sustrato de péptido se volvieron a cribar usando los ensayos expuestos anteriormente.

C. Identificación de mutantes de u-PA seleccionados y optimización de mutantes identificados

Los clones de fagos positivos se mezclaron con células XL-1 Blue de *E. coli* para la infección como se ha mencionado antes y los cultivos se cultivaron durante la noche con agitación a 37°C. El ADN de plásmido se purificó del cultivo durante la noche usando un kit de preparación de plásmidos (Qiagen). El ADN se envió para la secuenciación a medida usando los siguientes cebadores: 535- 5'-CAGCTATCGCGATTGCAG-3' (SEC ID N°: 381); 5542-5'-GTGCGCAGCCATCCCGG-3' (SEC ID N°: 382). Los residuos de aminoácidos alterados en los genes de u-PA mutante se identificaron después de analizar los datos de secuenciación.

La siguiente Tabla 10 expone variantes de u-PA identificadas a partir de la selección de u-PA variante de bibliotecas de fago de u-PA contra un inhibidor mutante PAI-1/RRAR. Las mutaciones expuestas en la siguiente Tabla 10 están con la numeración de la quimotripsina. Los números entre paréntesis indican el número de veces que se identificaron los mutantes en el procedimiento de selección de fagos. Basándose en los resultados de los ensayos de actividad, las mejores variantes de fagos de u-PA se marcan subrayadas. Las secuencias de aminoácidos de una preproteína de u-PA maduro (SEC ID N°: 433) que contiene las mutaciones diseñadas se exponen en cualquiera de SEC ID N°: 434-445.

Tabla 10

Bibliotecas de fago de u-PA frente a PAI-1/RRAR	Nombre del mutante	Sitio/s de mutación (número de quimotripsina)	Aminoácido/s modificado/s	SEC ID N°:
Selección I	AR73 (2) <u>AR81</u>	30 73,89	Phe - Ileu Leu - Ala, Ileu - Val	434 435

Bibliotecas de fago de u-PA frente a PAI-1/RRAR	Nombre del mutante	Sitio/s de mutación (número de quimotripsina)	Aminoácido/s modificado/s	SEC ID N°:
Selección II y III	AR1	73	Leu-Pro	436
	AR3	217	Arg-Cys	437
	<u>AR4</u> (3)	155	Leu-Pro	438
	AR7	75, 89, 138	Ser-Pro, Ileu-Val, Ileu-Thr	439
	AR32	137	Glu-Gly	440
	<u>AR36</u>	72, 155	Arg-Gly, Leu-Pro	441
	AR37	133	Gly-Asp	442
	AR66	160	Val-Ala	443
	AR24	38	Val-Asp	444
	AR85	132, 160	Phe-Leu, Val-Ala	445

Los residuos de aminoácidos alterados en el gen de u-PA mutante que presenta elevada sensibilidad contra el inhibidor PAI-1/69 tras la selección contra el inhibidor PAI-1/69 se identificaron después de analizar los datos de secuenciación expuestos anteriormente. Los mutantes identificados de la biblioteca de exposición sobre fago de proteasas de primera generación (I) se exponen a continuación en la Tabla 11. Se crearon bibliotecas de exposición sobre fago de proteasas de posteriores generaciones usando el procedimiento expuesto anteriormente en el Ejemplo 2B usando el kit de mutagénesis PCR Diversify y los cebadores 496 y 497. Para la biblioteca de exposición sobre fago de generación II, el mutante de u-PA u-PA/Ic que contiene una mutación correspondiente a F30V basándose en la numeración de la quimotripsina se usó como molde para la reacción de mutagénesis. Los mutantes identificados a partir de la biblioteca de exposición sobre fago de proteasas de segunda generación (II) se exponen en la siguiente Tabla 11. Para la generación de la biblioteca de exposición sobre fago III, el mutante de u-PA u-PA-IIb o el mutante de u-PA-IIb que contiene mutaciones correspondientes a F30V/ Y61(A)H o F30V/ K82E, respectivamente, basándose en la numeración de la quimotripsina, se usaron como moldes para la reacción de mutagénesis. Los mutantes identificados a partir de la biblioteca de exposición sobre fago de proteasa de tercera generación (III) se exponen en la siguiente Tabla 11. Para la generación de la biblioteca de exposición sobre fago IV, el mutante de u-PA u-PA/IIIa que contiene mutaciones correspondientes a F30V/K82E/V159A, basándose en la numeración de la quimotripsina, se usó como molde para la reacción de mutagénesis. Los mutantes identificados a partir de la biblioteca de exposición sobre fago de proteasas de cuarta generación (IV) se exponen en la siguiente Tabla 11. Los números entre paréntesis indican el número de veces que el fago de u-PA seleccionó el que tenía la misma mutación. El subrayado indica las nuevas mutaciones adquiridas por el mutante. Las secuencias de aminoácidos de un preproteína de u-PA maduro (SEC ID N°: 433) que contiene las mutaciones diseñadas se exponen en cualquiera de SEC ID N°: 460-472.

Tabla 11

Bibliotecas de fago	Nombre del mutante	Sitios de mutación	Aminoácidos modificados	SEC ID N°:
I	u-PA/Ia u-PA/Ib u-PA/Ic (2) u-PA/Id	21 24 30 30	Phe-Val Ile-Leu Phe-Val Phe-Leu	460 461 462 463
II	u-PA/IIa u-PA/IIb u-PA/IIc	30, <u>61 (A)</u> 30, <u>82</u> 30, <u>156</u>	Tyr-His Lys-Glu Lys-Thr	464 465 466
III	u-PA/IIIa (8) u-PA/IIIb u-PA/IIIc u-PA/IIId (2)	30, 82, <u>159</u> 30, 82, <u>39</u> , <u>159</u> 30, 82, 158, <u>159</u> 30, 61A, <u>92</u>	Val-Ala Thr-Ala, Val-Ala Thr-Ala, Val-Ala Lys-Glu	467 468 469 470

Bibliotecas de fago	Nombre del mutante	Sitios de mutación	Aminoácidos modificados	SEC ID N°:
IV	u-PA/IVa u-PA/IVb	30, 82, 159, <u>80</u> , <u>89</u> , 187 30, 82, 159, <u>80</u> , <u>84</u> , <u>89</u> , <u>187</u>	Glu-Gly, Ile-Val, Lys-Glu Glu-Gly, Glu-Lys, Ile-Val, Lys-Glu	471 472

1. Optimización y recombinación de los residuos de aminoácidos 30 y 155 en bibliotecas de exposición sobre fago dirigidas contra el inhibidor PAI-1/RRAR

Para enriquecer la sensibilidad de variantes de u-PA contra el inhibidor PAI-1/RRAR, el aminoácido 30 y el aminoácido 155 basándose en la numeración de la quimotripsina (identificada como puntos calientes en las primeras selecciones como se exponen en la Tabla 10 anterior) se eligieron como diana para la aleatorización y recombinación usando los siguientes cebadores, respectivamente:

TC30- 5'GCCCTGGNNSGCGCCATC- 3' (SEC ID N°: 383)
TC155- 5'GGAGCAGNNSAAAATGACTG- 3' (SEC ID N°: 384)

La mutagénesis se realizó usando el kit de mutagénesis dirigida a sitio Quick Change multi (Stratagene) siguiendo las condiciones descritas por el fabricante. En resumen, después de la fosforilación de los cebadores usando la cinasa de polinucleótido T4 (New England Biolabs) siguiendo las condiciones descritas por el fabricante, se realizaron tres reacciones diferentes para la aleatorización de los residuos 30 y 155: 1) 30 individualmente; 2) 155 individualmente; y 30 más 155 juntos. La construcción de ADN, pComb3H/variante de u-PA (pARF 81), que lleva mutaciones en los residuos L73A y I89V con respecto a las secuencias del dominio de proteasa u-PA natural correspondiente, se usó como molde en la reacción de mutagénesis usando los cebadores TC30 (SEC ID N°: 383) y TC155 (SEC ID N°: 384) individualmente para la aleatorización de las posiciones 30 y 155, respectivamente. En otra reacción, estos dos cebadores se usaron para aleatorizar las posiciones 30 y 155 juntas en el ADN de variante de pARF 81. La reacción de mutagénesis se llevó a cabo usando el kit de mutagénesis Multi site (Stratagene) siguiendo las condiciones especificadas por el proveedor. Después de la mutagénesis, los productos de reacción se transformaron en células XL-1 Blue de *E. coli* para la construcción de bibliotecas (véase el Ejemplo 2 anterior). Las bibliotecas de fago de u-PA amplificadas se usaron para la selección de variantes mejoradas de u-PA como se expone en el **Ejemplo 3A y 3B anteriores**.

La siguiente Tabla 12 expone variantes de u-PA identificadas de la selección contra un inhibidor mutante PAI-1/RRAR de u-PA variante de bibliotecas de fago de u-PA dirigidas en las que todas las variantes tenían mutaciones de referencia en los residuos de aminoácidos L73A y I89V basándose en la numeración de la quimotripsina. Las mutaciones expuestas en la siguiente Tabla 12 están con la numeración de la quimotripsina. Los números entre paréntesis indican el número de veces que se identificaron los mutantes en el procedimiento de selección de fagos. Basándose en los resultados de los ensayos de actividad, las mejores variantes de fagos de u-PA se marcan subrayadas. Las secuencias de aminoácidos de una preproteína de u-PA maduro (SEC ID N°: 433) que contiene las mutaciones diseñadas se exponen en cualquiera de SEC ID N°: 446-459.

Tabla 12

Bibliotecas de u-PA dirigidas frente a PAI-1/RRAR	Nombre del mutante	30 (Phe)	155 (Leu)	SEC ID N°
Selección I y II	<u>ARF2</u>	Thr	-	446
	ARF6	Leu	-	447
	ARF11	Val	-	448
	ARF17	Gly	-	449
	ARF16	Leu	-	450
	<u>ARF33</u>	-	Val	451
	ARF35	Met	-	452
	<u>ARF36</u>	-	Met	453
	ARF37	Met	-	454
	ARF43	Leu	-	455
	ARF47	Val	-	456
	<u>ARF48</u>	Leu	Met	457
	ARF103	Leu	-	458
	<u>ARF115</u>	Gly	Met	459

EJEMPLO 4**Expresión de las enzimas u-PA modificadas por transfección transitoria de células COS.**

- 5 Para la expresión de las enzimas u-PA variantes en un sistema de expresión de mamífero, los clones positivos identificados de los resultados de la exposición sobre fago se usaron como molde (pComb3H que lleva las secuencias del dominio de proteasa u-PA mutante) para la amplificación por PCR de ADNc que codifica el gen de la variante de u-PA seleccionada. La PCR de extensión por solapamiento (Ho, S y col. (1989) Gene 77, 51-59) se llevó a cabo usando los siguientes cebadores.
- 10 717- 5'-TTTCAGTGTGGCCAAAAG-3' (SEC ID N°: 385);
 718, 5'-CAGAGTCTTTTGGCCACA-3' (SEC ID N°: 386);
 850, 5'-GGGGTACCGCCACCATGAGAGCCCTGCTGGCGCGC-3' (SEC ID N°: 387);
 851, 5'-GCTCTAGATCATCAGAGGGCCAGGCCATTCTCT-3' (SEC ID N°: 388). Los cebadores 850 y 851 llevan las secuencias para las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI* (subrayadas), respectivamente.

- 15 La PCR se realizó en dos etapas para realizar la amplificación de longitud completa del gen de u-PA del ADNc mutado como se describe más adelante. En la primera etapa, la PCR se llevó a cabo en una reacción de 100 µl para amplificar un producto de 500 pb (correspondiente a EGF y los dominios en rosquilla de u-PA) usando ADN polimerasa Pfu, los cebadores 850, 718 y pCMV4 que contiene el gen de u-PA de longitud completa (SEC ID N°: 474) como molde. Similarmente, otra PCR se llevó a cabo para amplificar el dominio de proteasa u-PA mutante (800 pb, es decir, que se corresponde con las secuencias de mutante con respecto a la secuencia natural expuesta en SEC ID N°: 475) usando los cebadores 851 y 717 con el u-PA-pComb3H mutante apropiado como molde. Estos dos productos de PCR se purificaron en gel y se usaron en la siguiente ronda de amplificación por PCR. En la segunda etapa, los productos de PCR purificados en gel (5 µl cada uno) se usaron como moldes en 100 µl de mezcla de reacción con los cebadores 850 y 851. Los cebadores 717 y 718 tienen secuencias complementarias solapantes que permitieron la amplificación del ADNc de u-PA de longitud completa (1,3 kb) en la segunda etapa de PCR. El producto de PCR se purificó usando un kit de purificación de PCR (Qiagen) y luego se digirió con las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI*. Después de la purificación usando columnas QIAquick (Qiagen), el gen de u-PA de longitud completa se ligó con el vector de expresión en mamífero pCMV4 (SEC ID N°: 373) que se había digerido previamente con *KpnI* y *XbaI*. La mezcla de ligación se sometió a electroporación en células XL-1 Blue de *E. coli* y se sembró en placas de LB complementado con carbenicilina (100 µg/ml). Después de la incubación durante la noche de las placas a 37°C, las colonias individuales se recogieron y se cultivaron en 2 ml de medio LB para la purificación de plásmidos. Los plásmidos se usaron para secuenciar el gen de u-PA entero usando los siguientes cebadores de secuenciación. UPAF1-5'ATGAGAGCCCTGCTGGCGCGCC-3' (SEC ID N°: 476) y UPAF2-5'GGAAAAGAGAAATTCTACCG-3' (SEC ID N°: 477).

- Los clones de u-PA mutante con las mutaciones correctas, sin ninguna mutación adicional, se prepararon en cantidades grandes usando el kit de preparación Midi Plasmid (Qiagen) y se usaron para electroporación en células COS-1 usando un pulsador de genes Bio-Rad. Se colocaron 20 µg de ADNc, 100 µg de ADN de vehículo y aproximadamente 10⁷ células COS-1 en una cubeta de 0,4 cm y la electroporación se realizó a 320 V, 960 microfaradios, y $\Omega = \infty$ (Tachias y col. (1995) J Biol. Chem., 270: 18319-18322). Tras la electroporación, las células transfectadas se incubaron durante la noche a 37°C en medio DMEM (Irvine Scientific) que contenía 10% de suero bovino fetal y butirato de sodio 5 mM. Entonces, las células se lavaron con medio de libre de suero y se incubaron en DMEM durante 48 h a 37°C. Después de la incubación con medio libre de suero, el medio acondicionado se recogió y se usó para la caracterización adicional.

EJEMPLO 5**Caracterización de u-PA mutantes purificados**

- 50 **A. Medición de la concentración de enzima**
- La forma monocatenaria de las enzimas u-PA mutantes en medios acondicionados se convirtió en la enzima bicatenaria correspondiente mediante tratamiento con plasmina-Sepharose (Calbiochem). La concentración de u-PA activo en estos medios se midió por valoración de sitios activos con una preparación de inhibidor PAI-1 convencional que se había valorado previamente contra un patrón primario de tripsina como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Las concentraciones de enzima totales se midieron por enzimoimmunoanálisis de adsorción siguiendo los protocolos del manual de laboratorio, Harlow y col. (1998) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory. La relación de estas concentraciones da la fracción de variante de u-PA que es activa en cada medio.

- 60 **B. Ensayo cromogénico directo de u-PA**

- Los ensayos directos de actividad de u-PA utilizaron el sustrato sal de monoacetato de carbobenzoxi-L- γ -glutamil (α -t-butoxi)-glicil-arginina-p-nitroanilida (Cbo-L-(γ)-Glu(α -t- β uO)-Gly-Arg-pNA AcOH; Spectrozyme® uPA, American Diagnostica) (Madison y col. (1995) J Biol. Chem., 270:7558-7562). La actividad enzimática se determinó midiendo el aumento en la absorbancia del (pNA) libre generado por unidad de tiempo a una absorbancia de 405 nm. Los

ensayos cinéticos se realizaron con el tiempo usando concentraciones de enzima entre 6 y 8 nM. La concentración de uPA Spectrazyme® se varió de 25 a 150 µM en ensayos de u-PA bicatenario, y de 25 a 200 µM en ensayos del dominio de proteasa u-PA. Las reacciones se realizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos y las velocidades de reacción se evaluaron por medición de la absorbancia a 405 nm cada 30 segundos durante hasta 2 horas usando un lector de placas Spectromax M2 o M5 (Molecular Devices). Las constantes cinéticas k_{cat} , K_m y k_{cat}/K_m (constante de especificidad) se calcularon representando la inversa de la concentración del sustrato frente a la inversa de la velocidad de absorbancia a DO_{405} , y ajustándolas a la ecuación de Lineweaver-Burk ($1/\text{velocidad} = (K_m/V_{m\acute{a}x})(1/[S]) + 1/V_{m\acute{a}x}$; en la que $V_{m\acute{a}x} = [E] \cdot k_{cat}$).

La siguiente Tabla 13 expone los resultados de análisis cinéticos de mutantes de u-PA identificados que presentan elevada sensibilidad contra el inhibidor PAI-1/69 en un ensayo directo de actividad enzimática de u-PA. Los resultados muestran que cada uno de los u-PA mutantes identificados tiene una actividad enzimática disminuida con respecto al u-PA natural como se determina a partir de la medición de la constante de especificidad para la escisión (k_{cat}/K_m) del sustrato de u-PA Spectrozyme®. En la tabla, las variantes probadas son aquellas identificadas en la Tabla 11 anterior tras la selección de generaciones sucesivas (I a IV) de bibliotecas de exposición sobre fago de u-PA.

TABLA 13:

Mutantes de u-PA	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)	u-PA mutante/natural
u-PA/Ic (30)	0,745	22,3	$2,9 \times 10^5$	0,30
u-PA/IIb (30, 82)	0,299	11	$3,6 \times 10^5$	0,38
u-PA/IIIa (30, 82, 159)	0,239	11,6	$4,8 \times 10^5$	0,50
u-PA/IIIb (30, 39, 82, 159)	0,212	9,6	$4,5 \times 10^5$	0,47
u-PA/IVa (30, 80, 82, 89, 159, 187)	0,177	10	$5,6 \times 10^5$	0,58
u-PA/IVb (30, 80, 82, 84, 89, 159, 187)	0,321	11	$3,4 \times 10^5$	0,35
u-PA natural	0,174	16,6	$9,5 \times 10^5$	1,0

C. Análisis cinético de variantes de u-PA usando sustrato fluorogénico

Los ensayos directos para medir la actividad de las variantes de u-PA contra la secuencia del sustrato diana RRAR se realizaron utilizando un sustrato Ac-RRAR-AMC. El uso del sustrato de péptido fluorogénico 7-amino-4-metilcumarina (AMC) es un procedimiento rutinario para la determinación de la especificidad de la proteasa (Zimmerman y col. (1977) Anal Biochem, 78:47-51; Harris y col. (2000) PNAS, 97:7754-7759). La escisión específica del enlace de anilida libera el grupo saliente AMC fluorogénico, proporcionando un medio eficiente para determinar las velocidades de escisión para sustratos individuales. Los sustratos se diluyeron seriadamente de 0,05 a 12,0 mM y se incubaron en presencia de proteasa (9 - 25 nM) en una placa de ensayo de media área negra de 96 pocillos Costar. La fluorescencia del grupo saliente AMC libre se midió en un espectrofotómetro de fluorescencia (Molecular Devices Gemini XPS) a una longitud de onda de excitación (380 nm) y longitud de onda de emisión (450 nm) con referencia a un patrón de AMC. La tasa de aumento en la fluorescencia se midió durante 30 minutos con lecturas tomadas a intervalos de 30 segundos. Las constantes cinéticas k_{cat} , K_m y k_{cat}/K_m (constante de especificidad) se calcularon representando la inversa de la concentración del sustrato frente a la inversa de la velocidad de escisión del sustrato, y ajustándolas a la ecuación de Lineweaver-Burk ($1/\text{velocidad} = (K_m/V_{m\acute{a}x})(1/[S]) + 1/V_{m\acute{a}x}$; en la que $V_{m\acute{a}x} = [E] \cdot k_{cat}$).

La siguiente Tabla 14 expone los resultados del análisis cinético de las variantes de u-PA ARF2 y ARF36 contra el sustrato Ac-RRAR-AMC. Los resultados muestran que la constante de especificidad para el sustrato RRAR por las variantes de proteasa u-PA seleccionadas son aproximadamente o más de 10 veces superiores en comparación con u-PA natural.

TABLA 14:

Mutantes	K_m (µM)	K_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)	Mejora de K_{cat}/K_m de u-PA mutante/natural
u-PA/ARF2	546	434	11,7
u-PA/ARF36	614	357	9,6
u-PA natural	381	37	1,0

D. Análisis cinético de la activación del plasminógeno usando un ensayo cromogénico indirecto

Se realizó un ensayo cromogénico indirecto para determinar las actividades de u-PA natural y mutante producido como preparaciones de proteína purificada (Madison y col. (1989) Nature, 339: 721-724; Madison y col. (1990) J Biol. Chem., 265: 21423-21426). En este ensayo, la p-nitroanilina libre es liberada del sustrato cromogénico Spectrozyme PL (sal de diacetato H-D-norleucilhexahidrotirosil-lisina-p-nitroanilida, American Diagnostics, Inc.) por la acción de la plasmina generada por la acción de u-PA sobre el plasminógeno. La liberación de p-nitroanilina libre se midió espectrofotométricamente a DO_{405} nm.

Para el ensayo, 100 μ l de mezclas de reacción que contenían 0,25-1 ng de las enzimas uPA que iban a probarse, Spectrozyme PL 0,62 mM, Lys-plasminógeno 0,2 μ M (American Diagnostics, Inc.), se combinaron en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 0,1 M, EDTA 1,0 mM y 0,01% (v/v) de Tween 80. La reacción se incubó a 37°C en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Inc.) y la densidad óptica a 405 nm (DO405) se leyó cada 30 s durante 1 h en un Thermomax de Molecular Devices. Las constantes cinéticas k_{cat} , K_m y k_{cat}/K_m (constante de especificidad) se calcularon como se describe antes (Madison, E. L (1989) Nature 339, 721-724).

La siguiente Tabla 15 expone los resultados de análisis cinéticos de mutantes de u-PA identificados que presentan elevada sensibilidad contra el inhibidor PAI-1/69 en un ensayo indirecto de actividad enzimática de u-PA. Los resultados muestran que cada uno de los u-PA mutantes identificados tiene una actividad enzimática disminuida con respecto al u-PA natural como se determina a partir de la medición indirecta de la constante de especificidad para la escisión (k_{cat}/K_m) de la escisión del sustrato Spectrozyme® PL. En la tabla, las variantes probadas son aquellas identificadas en la Tabla 11 anterior tras la selección de generaciones sucesivas (I a IV) de bibliotecas de exposición sobre fago de u-PA.

TABLA 15:

Mutantes de u-PA	K_m (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)	u-PA mutante/natural
u-PA/Ic	9,01	24,7	$2,7 \times 10^6$	0,24
u-PA/IIb	8,6	22,6	$2,6 \times 10^6$	0,23
u-PA/IIIa	6,31	37,6	$5,9 \times 10^6$	0,53
u-PA/IIIb	9,3	29,8	$3,2 \times 10^6$	0,29
u-PA/IVa	7,03	38,7	$5,5 \times 10^6$	0,50
u-PA/IVb	7,5	45,3	$6,0 \times 10^6$	0,54
u-PA natural	6,03	70,1	$1,1 \times 10^7$	1,0

E. Análisis cinético de la inhibición de enzimas u-PA mutantes por PAI-1 natural y PAI-1 mutante

Las constantes de velocidad de segundo orden (k_i) para la inhibición de u-PA mutante y natural (control positivo) se determinaron usando condiciones de pseudo-primer orden ($k_i < 2 \times 10^6$) o segundo orden ($k_i > 2 \times 10^6$). Para cada enzima, las concentraciones de enzima e inhibidor (PAI-1 mutante) se eligieron para dar varios puntos de datos para las que la actividad residual enzimática varió entre el 20 y el 80% de la actividad inicial. Las mediciones cinéticas de la tasa de interacción de u-PA natural y mutante con PAI-1 natural y mutante se realizaron a 24°C en tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) que contenía EDTA 0,1 mM y 0,1% (v/v) de Tween 20. El ensayo cromogénico indirecto como se describe en la Parte D anterior se usó para determinar la actividad enzimática residual en función del tiempo.

Las constantes de velocidad para la inhibición de u-PA natural o mutante por PAI-1 fueron bajo condiciones de pseudo-primer orden para un exceso de PAI-1 con respecto a u-PA como se describe previamente (véase, por ejemplo, Holmes y col. (1987) Biochemistry, 26: 5133-5140; Beatty y col. (1980) J. Biol. Chem., 255:3931-3934; Madison y col. (1990) PNAS, 87: 3530-3533; Madison y col. (1993) Methods Enzymol., 223:249-271). Brevemente, u-PA natural o mutante purificado (3-50 fmol) se incubó a temperatura ambiente durante 0 a 120 minutos con PAI-1 natural o mutante (35-1330 fmol). Tras la incubación, las mezclas se diluyeron y la actividad residual enzimática se determinó en un ensayo cromogénico convencional expuesto en D anteriormente. Los datos se analizaron representando $\ln$ (actividad residual / actividad inicial) frente al tiempo y determinando la pendiente de la línea recta resultante. Entonces, las constantes de velocidad de pseudo-primer orden se derivaron dividiendo la pendiente entre la concentración del inhibidor en la reacción.

Para las reacciones de segundo orden, concentraciones equimolares de u-PA natural o mutante y PAI-1 natural o mutante se mezclaron directamente en los pocillos de la placa de microtitulación y se preincubaron a temperatura ambiente durante periodos de tiempo variables de 0 a 30 min. Tras la preincubación, las mezclas se inactivaron con un exceso de anticuerpos anti-PAI neutralizantes y la actividad enzimática residual se midió en el ensayo cromogénico indirecto. Los ensayos cromogénicos indirectos se compararon con reacciones de control que no contenían PAI-1 o a las que se añadió PAI-1 después de la preincubación y adición de anticuerpo anti-PAI-1, plasminógeno y Spectrozyme PL a la mezcla de reacción. Los datos se analizaron representando $\ln$ (actividad residual / actividad inicial) frente al tiempo y determinando la pendiente de la línea recta resultante. Entonces, las constantes de velocidad de segundo orden se derivaron dividiendo la pendiente entre la concentración del inhibidor en la reacción.

La siguiente Tabla 16 expone las constantes de velocidad de segundo orden para la inhibición de variantes de u-PA por el inhibidor PAI-1/RRAR. Los resultados muestran que las variantes ARF2 y ARF36 tienen aproximadamente una mejora de 20 veces en la especificidad por el sustrato de inhibidor PAI-1/RRAR como se evalúa por el aumento de la constante de velocidad k_i para la inhibición en comparación con u-PA natural.

TABLA 16:

Variantes de u-PA	Constante de velocidad de 2º orden ($M^{-1}s^{-1}$)	Mejora de u-PA mutante/natural
u-PA/ARF2	$1,6 \times 10^5$	18,3
u-PA/ARF36	$1,7 \times 10^5$	20,2
u-PA natural	$8,7 \times 10^3$	1,0

Las siguientes Tablas 17 y 18 son los resultados de constantes de velocidad de segundo orden de inhibición para el inhibidor PAI-1/69 natural (Tabla 17) o mutante (Tabla 18) por u-PA natural o variantes de u-PA seleccionadas contra el inhibidor PAI-1/69. Los u-PA variantes expuestos en cada una de las Tablas 17 y 18 son aquellos identificados de una (I) a cuatro (IV) rondas sucesivas de una selección de biblioteca en fago de u-PA como se representa en la Tabla 11 anterior. Los resultados en la Tabla 17 muestran que algunos de los u-PA mutantes (es decir, u-PA/IIIa, u-PA/IIIb y u-PA/IVa) tienen una constante de velocidad de segundo orden ligeramente elevada para la inhibición con respecto a u-PA natural y los mutantes u-PA/Ic, u-PA/IIb y u-PA/IVb tienen una constante de velocidad de segundo orden disminuida para la inhibición con respecto a u-PA natural. Los resultados en la Tabla 18 muestran que la constante de velocidad de segundo orden para la inhibición es espectacularmente elevada para cada una de las variantes de u-PA seleccionadas para la inhibición por el inhibidor PAI-1/69 mutante. Los resultados muestran que cada una de las variantes seleccionadas tiene una mejora superior a 13 veces en la especificidad por el sustrato de inhibidor PAI-1/69, presentando cada una de las variantes u-PA/IIIb, u-PA/IVa y u-PA/IVb mejoras próximas a o superiores a 40 veces en la especificidad.

TABLA 17:

Mutantes de u-PA	Constante de velocidad de 2º orden ($M^{-1}s^{-1}$)	Factor de sensibilidad (u-PA mutante/natural)
u-PA/Ic	$2,4 \times 10^5$	0,3
u-PA/IIb	$2,9 \times 10^5$	0,3
u-PA/IIIa	$9,7 \times 10^5$	1,2
u-PA/IIIb	$1,3 \times 10^7$	1,6
u-PA/IVa	$2,7 \times 10^7$	1,6
u-PA/IVb	$6,8 \times 10^5$	0,8
u-PA natural	$7,5 \times 10^5$	1,0

TABLA 18:

Mutantes de u-PA	Constante de velocidad de 2º orden ($M^{-1}s^{-1}$)	Factor de sensibilidad elevado (u-PA mutante/natural)
u-PA/Ic	$1,0 \times 10^5$	13,7
u-PA/IIb	$1,1 \times 10^5$	15,3
u-PA/IIIa	$1,8 \times 10^5$	24,5
u-PA/IIIb	$2,8 \times 10^5$	37,5
u-PA/IVa	$2,7 \times 10^5$	35,9
u-PA/IVb	$3,2 \times 10^5$	42,6
u-PA natural	$7,5 \times 10^3$	1,0

EJEMPLO 6**Selección de MT-SP1 variante de bibliotecas de fago de MT-SP1 contra el inhibidor de AT3 mutante**

Un inhibidor de antitrombina III (AT3) mutante (SEC ID N°: 5) que contiene una secuencia de hexapéptidos en los residuos del bucle del sitio reactivo (RSL) P4-P3-P2-P1-P1'-P2' de una AT3 natural correspondiente a los residuos de aminoácidos IAGRSL (SEC ID N°: 478) se mutó para contener una sustitución en estos residuos dando SLGRKI (SEC ID N°: 479), correspondiente a los residuos de aminoácidos de una secuencia de escisión del complemento C2. El mutante AT3^{SLGR-KI} se usó como "sustrato cebo" en el experimento de selección de proteasas para aislar fago con reactividad mejorada hacia la secuencia de sustrato mutante de una biblioteca de exposición sobre fago de MT-SP1 combinatoria grande. En resumen, para el análisis de selección de la primera generación, 5 µl de una biblioteca de fago 1:100 de SM1 ($\sim 3 \times 10^{13}$)-MT-SP1 que es una biblioteca de baja frecuencia mutagénica (es decir, 0,2-0,5% de frecuencia de mutagénesis) que tiene actividad enzimática se combinó en representación igual con 5 µl de biblioteca de fago de 1:100 de SM2 ($\sim 3 \times 10^{12}$)-MT-SP1 que contenía una frecuencia de mutagénesis mayor (es decir, 0,9%). Las bibliotecas de fago se mezclaron con 5 µl de heparina (5 ng/µl; de la disolución madre de mucosa intestinal porcina), 5 µl de sustrato AT3^{SLGR-KI} cebo (que oscila en concentraciones de 0 (es decir, 5 µl de H₂O), 0,018 µM, 0,18 µM, 1,8 µM o 18 µM) en presencia de 5 µl (18 µM) de AT3 natural purificada de plasma y 5 µl 10x tampón de actividad MTSP (Tris-HCl 0,5 M, pH 8, NaCl 0,3 M, 0,1% de Tween 30) en un volumen total de 50 µl (es decir, la reacción contuvo 20 µl de H₂O). La reacción se incubó durante 4,5 horas a 37°C.

Los complejos de fago de MTSP-1-inhibidor de AT3 se capturaron usando Sepharose activada con CuSO₄. Se preactivaron 200 µl de Sepharose quelante (Pharmacia) con CuSO₄ (100 mM). Sepharose activada con CuSO₄ (100

µl) se bloqueó con 2 ml de 0,5% de BSA en tampón PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las perlas se recogieron de la disolución de bloqueo sedimentando a 6500 rpm durante 60 s seguido de resuspensión en 450 µl de tampón de unión (NaCl 0,5 M, Tris 100 mM a pH 8, imidazol 10 mM, 0,1% de Tween 20). Se añadieron 50 µl de la reacción de mezcla de inmunoadsorción anterior a las perlas Sepharose activadas con CuSO₄ para capturar los complejos de inhibidor de AT3-fago de MTSP-1 marcados con His. La incubación continuó durante otra 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de inmunoadsorción se centrifugó durante 1 min a 2000 rpm y las perlas Sepharose que contenían los complejos de fago de AT3-inhibidor de MTSP-1 unidos se lavaron con 500 µl de tampón de unión para eliminar los fagos sin unir. La etapa de lavado se repitió 5 veces y las perlas que contenían complejos unidos se transfirieron a tubos nuevos después de cada lavado para evitar cualquier posible "remanente" de fagos no específicos.

Los complejos de fago de MT-SP1- AT3^{SLGR-KI} unidos se eluyeron en 100 µl de tampón de elución (EDTA 0,5 M, pH 8,0). Una alícuota de 50 µl de los fagos eluidos se usó para infectar 3 ml de células activamente en crecimiento TG1 de *E. coli* (A600= 0,5; 0,5 DO = ~ 1,5 x 10⁸ colonias/ml) durante 20 minutos a 37°C. Las bacterias infectadas se sembraron en placas grandes (245 mm x 245 mm) que contenían carbenicilina (75 µg/ml) y se incubaron a 30°C durante la noche. A la siguiente mañana, las placas se recogieron. Las colonias sobre cada placa se contaron y se compararon con la placa de referencia que no contenía inhibidor AT3^{SLGR-KI}. Los resultados de los recuentos de colonias se exponen en la Tabla 19.

TABLA 19: Resultados de la selección de la primera generación		
Concentración de AT3^{SLGR-KI} en reacción		Colonias de la selección de la primera generación
AT3 ^{SLGR-KI} 18 µM		Césped
AT3 ^{SLGR-KI} 1,8 µM		6088
AT3 ^{SLGR-KI} 0,18 µM		1712
AT3 ^{SLGR-KI} 0,018 µM		3700
AT3 ^{SLGR-KI} 0 µM		840

Las colonias de las placas que contenían AT3^{SLGR-KI} se rasparon en 25 ml de 2YT complementado con carbenicilina (~ 100 µg/ml) después de colocarse las placas en el cuarto frío durante 2 horas para endurecer el agar. Se añadieron 20 ml del medio 2YT que contenía bacterias a 500 ml de la carbenicilina que contenía 2YT y se determinó que A₆₀₀ era 0,13. Las bacterias se cultivaron a una DO = ~0,5 y luego se añadieron ~ 1 x 10¹⁰ a 2,6 x 10¹³ ufc/ml de fago colaborador (VS M13) (en ~150 µl-200 µl) para la amplificación de las bibliotecas. Después de 1 hora de crecimiento a 37°C agitando, los cultivos se complementaron con kanamicina a concentraciones finales de 3 µg/ml y se cultivaron durante la noche a 30°C con agitación. Las células se recogieron y las partículas de fago presentes en el sobrenadante se precipitaron usando una disolución de PEG-NaCl. Para el análisis de la selección de fago de MT-SP1 de segunda generación, las condiciones fueron similares a las de la primera generación, excepto que la reacción contra el sustrato cebo AT3^{SLGR-KI} fue sólo 27 minutos en lugar de 4,5 horas para potenciar la rigurosidad de la selección.

Tras la elución de los complejos de fago de MT-SP1-AT3^{SLGR-KI} unidos como se ha descrito anteriormente se usó una alícuota de 50 µl de los fagos eluidos para infectar 3 ml de células activamente en crecimiento TG1 de *E. coli* (A600= 0,5; 0,5 DO = ~1,5 x 10⁸ colonias/ml) durante 20 minutos a 37°C. Las bacterias infectadas se sembraron en placas grandes (245 mm x 245 mm) que contenían carbenicilina (75 µg/ml) y se incubaron a 30°C durante la noche. A la siguiente mañana, las placas se recogieron. Las colonias sobre cada placa se contaron y se compararon con la placa de referencia que no contenía inhibidor de AT3^{SLGR-KI}. Los resultados de los recuentos de colonias se exponen en la Tabla 20.

TABLA 20: Resultados de la selección de la segunda generación		
Concentración de AT3^{SLGR-KI} en reacción	Colonias de la selección de la segunda ronda; (referencia)	Relación de enriquecimiento en comparación con la referencia
AT3 ^{SLGR-KI} 18 µM	2476 (165)	15:1
AT3 ^{SLGR-KI} 1,8 µM	1750 (90)	19:1
AT3 ^{SLGR-KI} 0,18 µM	2012 (110)	18:1
AT3 ^{SLGR-KI} 0,018 µM	1824 (89)	21:1

Las colonias se recogieron para la posterior caracterización. Las células se cultivaron en 2 ml de 2x YT complementado con carbenicilina (100 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml) y la preparación de fagos se realizó como se ha descrito (Sambrook, J y col. (1989) Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory). El fago seleccionado se probó para la actividad enzimática contra un sustrato Ac-SLGR-ACC. Además, el fago seleccionado se seleccionó para resistencia a inactivación por AT3 natural o plasma.

EJEMPLO 7**Expresión y purificación de inhibidores de AT3 mutantes****5 A. Generación de AT3 variante**

Las proteínas de AT3 mutantes para su uso como “sustratos cebo” de captura de proteasas se crearon introduciendo modificaciones en la secuencia de aminoácidos del bucle del centro reactivo (RCL) de AT3 usando la región codificante del gen de antitrombina III (AT3) humana (SEC ID N°: 612, comprado de Origene Technologies, n° de catálogo TC110831) como molde. El ADNc de AT3 se amplificó por PCR usando el cebador directo que tiene la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEC ID N°: 626: GTCAGTACTGACTGACGTGGA TCCCACGGGAGCCCTGTGGACATC (que contiene una secuencia de relleno (mostrada en negrita anteriormente), un sitio BamH1 (mostrado en cursiva) y una parte que se hibrida con el gen de AT3 (mostrado en texto sencillo)), y un cebador inverso que tiene la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEC ID N°: 628: GTAGCCAACCCTTGTGTTAAGGGAGGCGGAAGCCATCACCACCATCACCA CTAAGAATTC. Tras la amplificación, el ADNc se subclonó en el vector de transferencia de baculovirus pAcGP67b (BD Biosciences SEC ID N°: 494) usando sitios de restricción Bam y EcoRI. Durante esta etapa de subclonación se añadió tanto una marca 6xHis en el extremo C (SEC ID N°: 496) como una marca FLAG en el extremo C (DYKDDDDK; SEC ID N°: 495) de manera que los mutantes de AT3 pudieran aislarse posteriormente por purificación por afinidad. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la proteína de fusión de AT3 clonada, que contiene AT3 fusionada con la marca 6xHis usando un ligador de cuatro aminoácidos GGGS (SEC ID N°:620), se expone en SEC ID N°:613 y 614, respectivamente.

Para preparar los sustratos cebo de AT3 mutante para aislar proteasas diana con diversas especificidades, las reacciones de mutagénesis se llevaron a cabo usando el kit de mutagénesis dirigida a sitio Quikchange® (Stratagene) siguiendo las condiciones especificadas por el proveedor para introducir residuos de aminoácidos de secuencias de escisión diana en lugar de la secuencia del bucle del centro reactivo (RCL) de AT3 natural, IAGRSL (SEC ID N°: 478) (residuos de aminoácidos 422-427 de la secuencia de polipéptidos de AT3 precursor expuesta en SEC ID N°: 5; y los residuos de aminoácidos 390-395 de la secuencia de polipéptidos de AT3 maduro expuesta en SEC ID N°: 493).

Un mutante tal, AT3 (AT3/ RRVR-KE) (SEC ID N°: 497), se preparó reemplazando residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos IAGRSL natural con los residuos de aminoácidos RRVRKE (SEC ID N°: 498) de una secuencia de escisión de VEGFR2 elegida como diana. Se preparó otro mutante, AT3 (AT3/ SLGR-KI) (SEC ID N°: 499), reemplazando la secuencia de aminoácidos IAGRSL natural con los residuos de aminoácidos SLGRKI (SEC ID N°: 479) de una secuencia de escisión de proteína del complemento C2 elegida como diana.

Para la PCR en Quikchange®, el cebador de RCL de AT3 natural tuvo la siguiente secuencia de ácidos nucleicos que se expone en SEC ID N°: 630:

GCTGCAAGTACCGCTGTTGTGATTGCTGGCCGTTGCTAAACCCCAACAG GGTGACTTTC. El cebador de la secuencia diana del complemento C2 tuvo la siguiente secuencia de ácidos nucleicos que se expone en SEC ID N°: 632:

GCTGCAAGTACCGCTGTTGTGTCGTTAGGCCGTAAAATTAACCCCAACAGGGTGA CTTTC. El cebador de la secuencia diana de VEGFR2 tuvo la siguiente secuencia de ácidos nucleicos que se expone en SEC ID N°: 634:

**GCTGCAAGTACCGCTGTTGTGCGCCGTGTGCGCAAAGAAAACCCCAACAG
GGTGACTTTC.**

Los vectores que contienen los ADNc de AT3 natural y los vectores que contienen el ADNc de AT3 mutante se transformaron cada uno y se amplificaron en células supercompetentes XL-1 Blue (Stratagene). El ADN de plásmido se purificó de las células usando el kit Qiagen Plasmid Maxi (Qiagen) siguiendo las condiciones especificadas por el proveedor.

B. Expresión de mutantes de AT3

Se usaron células de insecto Sf9 para expresar y purificar proteínas de AT3 naturales y mutantes tanto marcadas con His como marcadas con FLAG usando los vectores de transferencia pAcGP67b que contienen la AT3 descrita anteriormente. Las células Sf9 se adaptaron para el crecimiento en medio libre de suero SF900 II (Invitrogen) y se cultivaron al 85-90% de confluencia en placas de 35 mm. Las células se transfecaron usando el sistema de expresión en baculovirus FlashBac® (Oxford Expression Technologies) siguiendo las condiciones y el protocolo especificado por el proveedor. 500 ng del vector de transferencia de AT3 y 500 ng del vector de recombinación FlashBac® se preincubaron durante 20 min con 5 µl de reactivo de transfección Cellfectin® (Invitrogen) en 1 ml de

medio libre de suero SF900 II sin antibióticos, luego se aplicaron gota a gota a células. Cinco (5) horas después de la transfección, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 2 ml de medio libre de suero SF900 II con antibióticos (antibiótico/disolución antimicótica; Cellgro) y se incubaron a 28°C durante 4 días. El virus se expandió en células Sf9 a un título máximo de 1×10^6 pfu/ml como se ha determinado por ensayo en placa. Entonces, la AT3 recombinante se expresó usando la línea de células de insecto High Five® (BTI-TN5B 1-4) (Invitrogen) y medio libre de suero Excell™ 405 (JRH Biosciences). Las células se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) entre 0,1 y 1 y se cultivaron en 300 ml de volúmenes de cultivo en matraces Erlenmeyer de 1 l durante 4-5 días agitando a 125 rpm en una plataforma de agitación orbital.

10 C. Purificación basada en afinidad de proteínas de AT3 naturales y mutantes

Para la purificación basada en afinidad de proteínas de AT3 marcadas con His, los sobrenadantes de los cultivos del Ejemplo 7B se purificaron por centrifugación y filtración usando un filtro de 0,45 µm y se dializaron en un tampón que contenía fosfato de sodio 50 mM a pH 7,5, NaCl 300 mM. La proteína se purificó por cromatografía en columna usando el aparato de cromatografía BioLogic Duoflow™ (Bio-Rad) y 10 ml de resina de afinidad de metal cobalto TALON® (Clontech). La proteína marcada con His unida a la resina se eluyó con un gradiente lineal de fosfato de sodio 50 mM a pH 7,5, NaCl 300 mM y fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5, NaCl 300 mM, imidazol 150 mM. Las fracciones que contenían la proteína se combinaron y se dializaron en tampón de almacenamiento de AT3 (fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5, NaCl 300 mM, 5% de glicerol). Para demostrar que la preparación de AT3 purificada contenía la proteína activa se realizó un ensayo de inhibición de MT-SP1 (valoración del sitio activo), como se describe en este documento en el Ejemplo 14 más adelante, con el fin de medir la capacidad de la AT3 dializada para inhibir la capacidad de MT-SP1 para escindir un sustrato. La mezcla de reacción de este ensayo de inhibición de MT-SP1 se evaluó cinéticamente para la escisión de sustrato Ac-RQAR-ACC 0,4 mM (acetil-Arg-Gln-Ala-Arg-ACC) (síntesis por el cliente) en un SpectraMax® M5 (lector de microplacas SpectraMax® M5, Molecular Devices) (Molecular Devices, Inc). "ACC" en el nombre de este sustrato se refiere al grupo saliente 7-amino-4-carbamoilmetilumarina. El grupo saliente ACC se detectó a longitudes de onda de excitación (Ex) = 380, emisión (Em) = 450 y corte (c/o) = 435. El rendimiento total de la proteína de AT3 marcada con His purificada fue aproximadamente 1-3 mg/l.

Para la purificación basada en afinidad de proteínas de AT3 marcadas con FLAG, los sobrenadantes de los cultivos se purificaron por centrifugación y filtración como se ha descrito anteriormente. El sobrenadante purificado se dializó en solución salina tamponada con Tris (TBS) a pH 7,4 y se añadió a un matraz Erlenmeyer de 1 l nuevo en un volumen total de 300 ml. Se añadieron 2 ml de gel de afinidad anti-FLAG M2 pre-equilibrado (Sigma) y el volumen total se incubó en una plataforma de agitación orbital a 125 rpm durante 3 horas a 4°C. La proteína de AT3 marcada con FLAG unida a resina se recogió por gravead usando una columna de cromatografía de 20 ml con fritas (Bio-Rad). La resina se lavó una primera vez con 5 ml de TBS, una vez con 5 ml de TBST (TBS con 0,1% de Tween-20) y una segunda vez con 5 ml de TBS. Entonces, la proteína de AT3 se eluyó añadiendo 10 ml de TBS que contenían 0,2 mg/ml de péptido FLAG (Sigma). El eluato se concentró y se dializó en tampón de almacenamiento de AT3 (fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5, NaCl 300 mM, 5% de glicerol) y la actividad se ensayó como antes usando un ensayo de inhibición de matriptasa (MT-SP1) (valoración del sitio activo) como se ha descrito anteriormente y en el Ejemplo 14A más adelante. El rendimiento total de la proteína de AT3 marcada con FLAG purificada fue aproximadamente 0,5-1 mg/l.

Estas proteínas de AT3 marcadas con FLAG y His purificadas se usaron como captura de proteasas para la identificación de proteasas que reconocen secuencias de sitio diana particulares, por ejemplo, en los procedimientos descritos en los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 8

50 Construcción de bibliotecas de exposición sobre fago de variantes de proteasa

A. Clonación del dominio de la proteasa MT-SP1 natural y C122S (cadena B) en el vector de exposición sobre fagémido pMal-C2

El ADNc (SEC ID N°: 504) que codifica un dominio de la proteasa MT-SP1 madura (cadena B de MT-SP1) (SEC ID N°: 505), que contiene los aminoácidos 615-854 de la proteína de MT-SP1 de longitud completa expuesta en SEC ID N°: 253, se clonó usando los sitios de restricción NdeI y HindIII en un vector pMal-C2 (SEC ID N°: 615) (New England Biolabs), que contiene una secuencia conductora STII (TGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTTGCATCTATGTTCTTTTTCTATTG CTACAAACGCGTATGCA (SEC ID N°: 636) para facilitar la secreción, y los ácidos nucleicos que codifican un dominio del extremo C del fago filamentoso M13 GenIII (SEC ID N°: 616). El ADNc del dominio de la proteasa MT-SP1 se insertó entre la secuencia conductora y el dominio de GenIII de manera que la construcción final contuvo la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEC ID N°: 510, que codifica una proteína de fusión de MT-SP1-extremo N de GenIII. La secuencia de aminoácidos codificada (SEC ID N°: 506) de esta proteína de fusión se expone más adelante, con la secuencia conductora de STII (SEC ID N°: 511) en texto sencillo, el dominio de MT-SP1 maduro en negrita y el dominio de GenIII del extremo C (SEC ID N°: 512) en cursiva. * indica la presencia de un codón de terminación en la secuencia

de ácidos nucleicos que codifica la proteína.

SEC ID N°: 506:

mkkniafllasmfvfsiatnayavvggtaddegewpwqvsllhalgqghicgaslispnwlvsaahcyi
ddrgfrysdptqwtatflghdqsqrsapgvqerrlkrishpffndftfdyiallelekpaeysmvr
piclpdashvfpagkaiwvtgwghtqygggtgalilqkgeirvinqtccenllpqqitprmmcvglsg
gvdsccgdsggplssveadgrifqagvswgdgcaqrnkpgvytrlpfrdwikentgvsrgsggs
egggsegggseggsgsgsgdfdyekmanankgamtenadenalqsdakgkldsvatdygaaidgf
igdvsnglangngatgdfagsnsqmaqvgdgdnsplmnnfrqylpslpqsvcrpfvfsagkpyefsidcdk
inlfrgvsfallyvatfmyvstfanilrnkes*

- 5 Además de la proteína de fusión de la cadena B de MT-SP1 natural se generó una proteína de fusión de variante de la cadena B de MT-SP1 (CB469) - Genelll usando el procedimiento descrito anteriormente. La secuencia de aminoácidos de la variante CB469, expuesta en SEC ID N°: 507, se generó sustituyendo la cisteína por una serina en la posición 122 (basándose en la numeración de la quimotripsina) de la secuencia del dominio de la proteasa MT-SP1 natural, que se muestra en la secuencia anteriormente en cursiva y se expone en SEC ID N°: 505. Esta
- 10 secuencia de CB469 se clonó en el vector pMal-C2 como se ha descrito anteriormente. Con el fin de lograr una exposición mejorada, el vector de fagémido que contiene los ácidos nucleicos que codifican esta proteína de fusión de MT-SP1 variante se usó para generar bibliotecas de exposición sobre fago de mutante de MT-SP1 como se describe en el Ejemplo 8B más adelante.

15 **B. Mutagénesis de dominios de proteasas para la generación de bibliotecas de exposición sobre fago de mutantes**

- La generación de bibliotecas de exposición sobre fago que contienen dominios de proteasas mutados se hizo usando protocolos de mutagénesis por PCR propensa a error convencionales que se conocen en la técnica
- 20 (Matsumura y col., Methods Mol Biol. 2002; 182:259-67; Cirino y col., Methods Mol Biol. 2003;231:3-9) como se ejemplifica más adelante.

1. Mutagénesis de proteínas de fusión de MT-SP1 de la cadena B

- 25 Para la construcción de proteínas de fusión que contienen MT-SP1 mutante, el ADNc de CB469 de MT-SP1 se amplificó a partir del vector pMal-C2 por PRC propensa a error usando el kit de mutagénesis al azar por PCR Diversify® (BD Biosciences, Clontech) y las siguientes condiciones sugeridas por el proveedor para obtener cinco (5) mutaciones por kilobase. El cebador directo de MT-SP1 usado en esta PCR, que tiene la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEC ID N°:508):

- 30 GCGCAGATATCGTACCGCATATGAAAAAGAATATCGCATTTCTT, se diseñó para hibridarse dentro de la secuencia conductora STII (con los residuos mostrados en cursiva) y contuvo una secuencia del restricción N (mostrada en negrita). El cebador inverso de MT-SP1, que tiene la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEC ID N°: 509: GTGCATGCTGACTGACTGAGCTCCCGCTTACCCAGTGTTCTC, se diseñó para hibridarse
- 35 dentro de la porción 3' de la secuencia que codifica el dominio de la proteasa MT-SP1 (con los residuos mostrados en cursiva) y contuvo una secuencia del sitio de restricción Sac1 (mostrada en negrita).

2. Purificación de productos de mutagénesis

- 40 La Taq polimerasa se une fuertemente a ADN y, por tanto, no se elimina completamente por el kit de purificación por PCR Qiagen; y su presencia puede interferir con los digestos de restricción en la dirección 3' de productos de PCR (Crowe y col., Nucleic Acids Res. 1991 January 11; 19(1): 184; Wybranietz y col., Biotechniques (1998) 24, 578-580). Por tanto, para eliminar la Taq polimerasa de los productos de PCR naturales y mutantes amplificados del Ejemplo 8B(1), antes de su purificación, a la reacción se añadió lo siguiente: EDTA 5 mM, 0,5% de SDS, 50 ng/μl de
- 45 proteinasa K. Para eliminar la Taq polimerasa, la mezcla se incubó a 65°C durante 15 minutos.

- Para garantizar que no había molde natural restante (que posiblemente podría interferir con los procedimientos de selección descritos más adelante), el producto de PCR se purificó para eliminar el ADN mensajero. Para separar el vector del producto de PCR, las muestras se cargaron sobre un 1% de gel de agarosa en presencia de 10x tampón
- 50 de carga en gel Orange G (New England Biolabs) que no co-migra con el producto de PCR o escalera. El producto

de PCR se escindió del gel usando un escalpelo. El producto escindido se purificó usando tanto los protocolos del kit de extracción en gel QIAquick® (Qiagen) como del kit de extracción en gel Zymoclean™ (Zymoclean CA, n° de cat. D4001) siguiendo las condiciones especificadas por el proveedor.

5 Para el kit de extracción en gel Qiagen, el fragmento de gel escindido se solubilizó en tampón QG y lentamente se pasó a través de una columna Qiagen QG, cada una de las cuales tiene una capacidad de unión de aproximadamente 5-10 µg, y no contiene más de 2 ml. Se usó un número suficiente de columnas para acomodar el volumen completo de material de partida. Las columnas se centrifugaron en tubos colectores a 14.000 rpm para eliminar cualquier tampón residual QG. Se añadieron 0,7 ml de tampón PE a cada columna y las muestras se
10 incubaron durante 2-5 minutos. Entonces, las columnas se centrifugaron dos veces, durante 1 minuto adicional cada una, a 13.000 rpm para eliminar todo el tampón PE residual. Las muestras se transfirieron a un tubo de microcentrífuga nuevo de 1,5 ml, seguido de adición de 50 µl de H₂O e incubación durante dos minutos. El ADN eluido se eluyó por centrifugación a 7000 rpm. El rendimiento típico fue entre el 30% y el 60% de la cantidad de partida de muestra.

15 Para el kit de extracción en gel Zymoclean™ se usaron tanto una como más de las columnas del kit de extracción en gel Zymoclean™ (cada una de las cuales tiene una capacidad de unión máxima de 5 µg), o una o más columnas del kit Zymoclean™ DNA Clean & Concentrator™ (cada una de las cuales tiene una capacidad de 25 µg), dependiendo de la cantidad de material de partida. Usando este kit, el fragmento de ADN escindido se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, seguido de adición de tres (3) volúmenes de tampón ADB™ a cada volumen de agarosa
20 escindida del gel. Las muestras se incubaron a 37-55°C durante 5-10 minutos hasta que la rebanada de gel se había disuelto completamente. La disolución de agarosa disuelta se transfirió a una columna Zymo-Spin I™ en un tubo de recogida y se centrifugó a al menos 10.000 rpm durante 30-60 segundos. Se desechó el flujo continuo de la columna. Se añadieron 200 µl de tampón de lavado a la columna y se centrifugó a al menos 10.000 rpm durante 30
25 segundos. El flujo continuo se desechó y se repitió la etapa de lavado. Se añadieron 50 µl de agua directamente a la matriz de la columna. El volumen de elución mínimo fue 10 µl para la columna de extracción en gel Zymoclean™ y 35 ml para la columna DNA Clean & Concentrator™. La columna se colocó en un tubo de 1,5 ml y se centrifugó a al menos 10.000 rpm durante 30-60 segundos para eluir el ADN.

30 Después de la elución usando uno de estos dos procedimientos, las muestras se reunieron y la concentración de ADN se evaluó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm en una cubeta de UV de 70 µl usando un espectrofluorómetro. La concentración de ADN se calculó según la siguiente ecuación: $1A_{260} = 50 \text{ ng/}\mu\text{l de ADNb}$.

C. Construcción de bibliotecas de fago de mutantes de proteasa usando el vector de fagémido pMal-C2

35 Para la construcción de bibliotecas de exposición sobre fago que expresan dominios de proteasa mutante, los productos de PCR digeridos, tal como aquellos obtenidos a partir de la mutagénesis y purificación por PCR de proteasas descritos en el Ejemplo 8A y B anteriormente, se ligaron en el vector de fagémido pMal-C2 descrito anteriormente. Para este procedimiento, el vector se digirió usando Nde1 y Sac1, y el producto se purificó en gel y
40 se combinó en una reacción de ligación (descrita más adelante) con los productos de PCR digeridos con restricción purificados. El peso molecular (MW) del fagémido pSTII-g3 pMal-C2 digerido con Nde1/Sac1 purificado en gel es 5835 pares de bases (pb); el MW del producto de PCR de MT-SP1 digerido con Nde1/Sac1 es 806 pb. Normalmente, para una reacción de ligación de 2 ml, 7,58 µg de vector de corte fueron aproximadamente 1 nM de vector y 3,14 µg de producto de MT-SP1 fueron aproximadamente 3 nM de producto de inserto.

45 Para la ligación de los productos de MT-SP1, 40 µl (3 nM, 3,14 µg) del producto digerido purificado se mezclaron con: 40 µl (1 nM, 7,58 µg) de vector digerido purificado; 1510 µl de H₂O; 400 µl de 5x tampón de ADN ligasa T4 (Gibco); y 10 µl (10 unidades) de ADN ligasa T4 (New England Biolabs). La reacción de ligación se llevó a cabo durante la noche a 16°C o a temperatura ambiente durante 4 horas en un volumen de 2 ml. Después de la ligación,
50 la ADN ligasa se inactivó por calor incubando la mezcla de reacción de ligación a 65°C durante 15 minutos, seguido de adición de 4 ml de tampón de unión de ADN ZymoResearch. Entonces, esta muestra se añadió, 800 µl de una vez, a una columna ZymoResearch de 25 µg. La columna se lavó dos veces con 600 µl de tampón de lavado ZymoResearch y se eluyó con 50 µl de agua, que se había calentado previamente a 42°C. La recuperación de ADN en porcentaje se evaluó midiendo la absorbancia de la muestra de elución diluida (3 µl de elución en 70 µl de H₂O) a
55 260 nm usando un espectrofluorómetro. Por ejemplo, para la ligación de 3 ml anterior, si la A₂₆₀ se correspondió con 0,12 = 140 ng/µl, entonces se determinó que el rendimiento total era aproximadamente 7 µg (que es aproximadamente el 70% de recuperación de ADN de la ligación).

60 El producto de ligación se sometió a electroporación en células XL-1 Blue que pueden acomodar aproximadamente 500 ng/µl por electroporación. Se añadieron 7,5 µl de una ligación 140 ng/µl por 200 µl de células XL-1 Blue (Stratagene). Las células se añadieron a una cubeta de 0,2 cm de hueco y se sometieron a electroporación en un pulsador de genes (Bio-Rad, CA) usando las siguientes condiciones: voltaje (V) = 2500, capacitancia = 25 (uF), resistencia = 200 ohm. Inmediatamente tras la electroporación, 1 ml de medio SOC (Invitrogen) se añadió a la cubeta. Entonces, las células se transfirieron a 25 ml de medio SOC y se incubaron a 37°C durante 20 minutos. Tras
65 esta incubación se prepararon cinco (5) alícuotas pequeñas (100 microlitros) de diluciones 100 veces seriadas de las células y se sembraron en placas pequeñas de agar de carbenicilina 2YT y se incubaron durante la noche a 37°C

para contar el número de colonias (representativo del número de clones de la biblioteca generada por electroporación). En un procedimiento, el volumen de cultivo restante se centrifugó para sedimentar las células, seguido de resuspensión en 12 ml de tampón SOC y siembra en placas grandes de agar (245 mm x 245 mm) complementado con carbenicilina (75 ug/ml) y se cultivaron durante la noche a 30°C. Alternativamente, para preparar la disolución madre de fago a partir de la biblioteca, las células se añadieron directamente a 500 ml de medio 2YT complementado con carbenicilina (75 ug/ml) con fago colaborador M13K07 a 1×10^{10} UFC/ml y se cultivaron durante la noche a 37°C.

EJEMPLO 9

Selección de dominios de proteasas variantes a partir de bibliotecas de fago de dominio de proteasa usando captura de proteasas AT3 mutante

A. Selección de complejos de fago de MT-SP1/AT3 mutante y ensayo de lectura basado en ELISA

En este ejemplo, un inhibidor de AT3 mutante que contiene la secuencia de escisión diana del complemento C2 SLGRKI, como se describe en el Ejemplo 7 anterior, se usó como “sustrato cebo” en un experimento de inmunoadsorción diseñado tanto para aislar como para proporcionar una lectura para la presencia de fagos que llevaban MT-SP1 mutante con reactividad mejorada hacia la secuencia de escisión diana. Los fagos se aislaron de bibliotecas combinatorias de exposición sobre fago de MT-SP1 grandes producidas como se describe en los Ejemplos 8A, 8B y 8C anteriores usando el siguiente procedimiento.

1. Interacción con y escisión de variantes de AT3 por fagos que llevan MT-SP1 mutante

Los mutantes de MT-SP1 unidos a fago de las bibliotecas de fago se seleccionaron primero usando AT3 mutante que tiene el sitio de escisión diana del siguiente modo. Cada reacción de escisión se llevó a cabo en pocillos duplicados de una placa de poliestireno de 96 pocillos (Nunc Maxysorp) durante 60 minutos a 37°C incubando los siguientes componentes de reacción en un volumen de 70 μ l: 35 μ l de fago de la biblioteca de MT-SP1 a $3,14 \times 10^{12}$ UFC/ml; 7 μ l de 10x tampón de actividad de MT-SP1 (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4, NaCl 1 M, 1% de Tween20); 7 μ l de 10 μ M de heparina de bajo peso molecular (BD Biosciences); 14 μ l de H₂O; y 7 μ l de AT3-SLGRKI mutante marcado con His. Las reacciones de escisión individuales se llevaron a cabo con las siguientes concentraciones de AT3-SLGRKI diferentes: 100 nM, 33 nM, 11 nM, 3,3 nM, 1,1 nM y 0,33 M. Cada reacción se terminó con la adición de 2 μ l de 100 mg/ml del inhibidor de proteasas fluoruro de 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo (Pefabloc, Roche Diagnostics). Entonces se añadieron 40 μ l de 0,55% de BSA, 0,275% de disolución de Tween 20 y se mezclaron minuciosamente pipeteando arriba y abajo.

2. Captura de complejos de fago de MT-SP1-AT3 usando anticuerpos anti-His

Mientras tanto, los pocillos en otra placa de poliestireno de 96 pocillos (Nunc Maxysorp) se recubrieron durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente con 100 μ l de 5 ng/ μ l de estreptavidina (Pierce) en tampón carbonato 0,2 M (pH 9, Pierce). Entonces, los pocillos se lavaron tres veces con 250 μ l de PBST, se bloquearon con 200 μ l de 0,2% de BSA en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 μ l de 5 ng/ μ l de anticuerpo anti-6HIS biotinilado para capturar mutantes de AT3 marcadas con His y se lavaron minuciosamente con PBST. Entonces, cada muestra de fago de MT-SP1 mutante de la reacción de escisión de AT3 en el Ejemplo 9A(1) se añadió por duplicado a la placa de 96 pocillos recubierta y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces, las placas se lavaron 14 veces con 250 μ l de PBST.

3. Lectura basada en ELISA para la selección de complejos de fago de MT-SP1-AT3

Después de lavar, la primera de las dos filas en la placa de microtitulación se usó para llevar a cabo un ensayo basado en ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción) para obtener una lectura para la captura de fago. A cada pocillo en esta fila se añadieron 100 μ l de una dilución 1:5000 de un anticuerpo anti-fago M13 conjugado con HRP (GE Healthcare) y se dejó que se unieran durante una hora. Entonces, los pocillos en esta fila se lavaron 8 veces usando un lavador de placas Skanwasher (Molecular Devices), seguido de la adición de 100 μ l de disolución de sustrato de TMB/peróxido (Pierce) e incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Esta reacción se inactivó con 100 μ l de H₂SO₄ 2 M y se ensayó en un lector de placas SpectraMax® (Molecular Devices) para la absorbancia a 450 nM. Esta lectura se usó como un sustituto de la presencia de complejos de fago-AT3. En este ensayo se observó un aumento en la absorbancia dependiente de la concentración (basado en concentraciones crecientes del cebo AT3-SLGRKI usado en la reacción de escisión en el Ejemplo 9A(1)). Además, cuando el procedimiento se realizó usando rondas sucesivas de inmunoadsorción como se describe en este documento, se observó una elevada absorbancia después de cada ronda, que indica que este procedimiento de inmunoadsorción podría enriquecer sucesivamente el conjunto de fagos para la afinidad por el sitio de escisión diana. Estos datos sugieren que este procedimiento puede usarse para seleccionar, de una biblioteca de fago, proteínas de fusión de dominio de proteasas mutantes que tienen afinidad por una secuencia diana particular. El ensayo de ELISA proporcionó un procedimiento para obtener una lectura para esta selección y enriquecimiento usando la misma placa de 96 pocillos que se usó para la captura basada en afinidad y posterior elución descrita en el Ejemplo 9A(4) más adelante.

4. Elución de fago de MT-SP1 seleccionado

La segundo de las dos filas duplicadas de la placa de microtitulación del Ejemplo 9A(2) se usó entonces para eluir específicamente fagos unidos para su uso en purificación y cribado posteriores. A cada pocillo en esta fila se añadieron 100 µl de HCl 100 mM y se incubaron durante 5 minutos para eluir el fago específicamente unido. El eluato de fago resultante se añadió a un pocillo separado que contenía 33 µl de Tris 1 M a pH 8 para la neutralización ácida antes de la infección. Entonces, los 133 µl de mezcla de fagos neutralizados se añadieron a 1 ml de células XL-1 Blue que se cultivaban a DO600 de 0,5, que luego se incubaron durante 20 minutos a 37°C y se sembraron en placas de agar 2xYT (245 mm x 245 mm) complementado con carbenicilina. Estas células se usaron en los procedimientos de cribado, secuenciación y purificación posteriores como se describe en los ejemplos más adelante.

Este procedimiento de selección y de ensayo basado en ELISA también se usó para seleccionar y evaluar mutantes de uPA de bibliotecas de uPA, tales como aquellos descritos en los Ejemplos 2 y 3 anteriores.

B. Purificación de fagos que llevan dominios de proteasa seleccionados

Este ejemplo describe un procedimiento para el aislamiento del sobrenadante de fagos que ha sido seleccionado usando inhibidores de cebo. Se determinaron los títulos (ufc/ml) de fagos seleccionados, tales como aquellos recuperados en el Ejemplo 9A anterior. Las disoluciones madres de fagos se diluyeron con PBS y se usaron para infectar células XL-1 Blue de *E. coli* que se cultivaban a una DO600 de 0,5 o aproximadamente $2,1 \times 10^8$ células/ml. El intervalo de infectividad deseado fue 1000 - 2000 colonias por placa. Las células infectadas se sembraron en agar 2YT complementado con 100 µg/ml de carbenicilina en placas BioAssay de poliestireno cuadradas de 245 mm x 245 mm (Corning) y se dejó que se cultivaran durante 16-20 horas o hasta que el tamaño de la colonia tuviera aproximadamente 2 mm de diámetro. Usando un recolector de colonias automatizado, las colonias individuales se recogieron y se dispersaron en pocillos en una placa de polipropileno de 96 pocillos, conteniendo cada pocillo 150-170 µl de medio 2YT complementado con 100 µg/ml de carbenicilina y 12 µg/ml de tetraciclina. Los pocillos de control se inocularon con células infectadas tanto con fago molde (fago que tiene un dominio de proteasa que se ha usado como molde para la mutagénesis) como con fago que contenía proteínas de fusión que contienen variantes de proteasa inactiva. Las placas inoculadas se taparon con una membrana permeable al aire, se colocaron en una estufa de incubación HiGro (GeneMachines) y se agitaron a 400 rpm a 37°C durante 14-20 horas.

Después de la incubación, para obtener células en fase logarítmica, se usaron 100 µl de cada pocillo para inocular un pocillo en una placa de 96 pocillos profunda que contenía 1 ml de medio 2YT complementado con 100 µg/ml de carbenicilina y 12 µg/ml de tetraciclina. Entonces, la placa de pocillos profunda se tapó con una membrana permeable al aire y se colocó en la estufa de incubación HiGro® con agitación a 400 rpm a 37°C con aireación con oxígeno hasta que la densidad celular alcanzó una DO600 de entre 0,4 y 0,6. Un periodo de incubación típico fue entre 4 y 5 horas. Después de la incubación se añadieron 100 µl de una disolución madre de fago colaborador a cada pocillo y la placa se tapó y se agitó de nuevo a 400 rpm durante 5-10 minutos a 37°C. Después de los 5-10 minutos de agitación, la placa se incubó a 37°C en un estado estático sin agitación durante 30-45 minutos. Entonces, la agitación se reanudó a 400 rpm durante 15-30 minutos a 37°C. Tras la agitación se añadieron 100 µl de disolución de kanamicina (400 µg/ml) a cada pocillo para dar una concentración final de 33,3 µg/ml en cada pocillo. La placa se volvió a tapar y se agitó a 400 rpm a 37°C durante 12 - 16 horas. Para sedimentar las células, la placa se centrifugó entonces a 3500 - 4500 rpm durante 20 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, los sobrenadantes, que contenían en fago aislado, se usaron tanto inmediatamente para el cribado como se describe en los ejemplos más adelante como primero se guardaron a 4°C.

C. Precipitación con polietilenglicol (PEG) de sobrenadantes de fagos de dominios de proteasa

Este ejemplo describe un procedimiento para eliminar la actividad de proteasa de referencia posiblemente contaminante (a la que son sensibles algunos ensayos de caracterización descritos en este documento más adelante) en sobrenadantes de fagos seleccionados purificados usando precipitación con polietilenglicol. En este procedimiento, después de rescatar los sobrenadantes de fagos que llevan MT-SP1 (tales como aquellos seleccionados y eluidos en el Ejemplo 9A) durante la noche (12-16 horas) con muestras de fago colaborador, se centrifugaron durante 20 minutos a 4°C a 3500-4500 rpm y de cada pocillo se sacaron 1000 µl de sobrenadante y se transfirieron a un pocillo en otra placa de pocillos profunda de 96 pocillos.

Para la precipitación, 250 µl de una disolución que contiene 20% de PEG (en volumen) en NaCl 2,5 M se añadieron a cada pocillo. La placa se tapó y se mezcló por inversión vigorosa, y luego se colocó en un baño de agua con hielo y se dejó estática durante 1-2 horas. Entonces, la placa se centrifugó durante 60 minutos a 4500 rpm o durante 90 minutos a 3500 rpm. La disolución de sobrenadante de cada pocillo se decantó y la placa se secó dando palmaditas y se dejó que drenara durante 20-30 minutos. El precipitado resultante se resuspendió usando PBS a un volumen final equivalente al 20% del volumen de sobrenadante de fagos original (200 µl) para dar un concentrado 5 veces. Este material se usó tanto inmediatamente en los ensayos descritos más adelante como se guardó a 4°C hasta que estuviera listo para ser probado.

EJEMPLO 10**Cribado de fagos que llevan dominios de proteasa que tienen elevada reactividad y eficiencia catalítica hacia secuencias de sustrato diana**

Las preparaciones de fagos individuales, tales como aquellas descritas en el Ejemplo 9B y 9C, se usaron en diversos ensayos para determinar su especificidad y/o actividad.

A. Análisis de fagos que expresan variantes de dominios de proteasa monitorizando la inhibición de la hidrólisis de péptidos fluorogénicos por proteínas cebo

Como un enfoque para evaluar los clones de fagos que llevan proteasa mutante puede realizarse un ensayo de inhibición bioquímica que compara la capacidad de un inhibidor (serpina cebo) para inhibir la actividad del dominio de proteasa variante seleccionada con su capacidad para inhibir la actividad del dominio de proteasa molde (es decir, la proteasa "parental") que se usó originariamente en la construcción de las bibliotecas de fagémido. Con este enfoque, la capacidad de los fagos que llevan proteasas mutantes, tales como aquellos recuperados en el Ejemplo 9 anterior, para escindir un sustrato fluorogénico que contiene una secuencia de sustrato diana se evalúa en presencia y en ausencia de una concentración dada de inhibidor cebo, y en comparación con la capacidad del dominio de proteasa molde para escindir la misma secuencia en presencia del mismo cebo. El uso de sustratos de péptidos fluorogénicos es un procedimiento rutinario para la determinación de la especificidad de la proteasa (Zimmerman y col. (1977) Anal Biochem, 78:47-51; Harris y col. (2000) PNAS, 97:7754-7759).

Para el análisis de la inhibición de mutantes de la cadena B de MT-SP1 en comparación con la inhibición del molde de la cadena B de MT-SP1 B (usado para mutación en el Ejemplo 8B(1)), la AT3 variante (con una secuencia diana deseada) puede usarse como inhibidor y Ac-RQAR-ACC puede usarse como sustrato. En este sustrato, la escisión específica del enlace de anilida libera el grupo saliente ACC fluorescente, proporcionando un medio eficiente para determinar las velocidades de escisión para sustratos individuales.

En un ejemplo de un ensayo tal, la capacidad de los fagos que llevan la proteasa uPA, tales como aquellos recuperados en el Ejemplo 3 anterior, para escindir el sustrato fluorogénico Ac-AGR-AMC (SEC ID N°: 617) se evaluó en presencia y en ausencia de una concentración dada de PAI cebo. Como se ha descrito anteriormente, el uso de un sustrato de péptido fluorogénico 7-amino-4-metilcumarina (AMC) tal es un procedimiento rutinario para la determinación de la especificidad de la proteasa. En este ejemplo, 35 µl de sobrenadante de fagos (tal como el obtenido como se describe en el Ejemplo 3(A)) se transfirieron a tanto un pocillo de ensayo designado como a un pocillo de control designado en una placa de polipropileno de 384 pocillos (CoStar, n° 3658). A los pocillos de ensayo se añadieron 35 µl de 2x tampón de ensayo indirecto que contiene el mismo PAI cebo usado en la selección. La concentración de cebo fue la misma que se usó en la selección. Se añadieron 35 µl de 2x tampón de ensayo indirecto (sin inhibidor) a los pocillos de control correspondientes. Las placas se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Tras la mezcla del fago con inhibidor o tampón de control, a los pocillos se añadieron 10 µl de un sustrato de péptido fluorogénico AGR-AMC, diluido a una concentración final de ensayo de 60 µM en tampón de ensayo indirecto. La fluorescencia se midió usando un lector de placas SpectraMax® de Molecular Devices con excitación a 380 nm, emisión fijada a 460 nm, usando el modo de lectura cinética durante una hora. Adicionalmente se analizaron clones que muestran inhibición potenciada del sustrato diana con respecto a la proteasa molde.

B. Análisis de actividad de proteasa variante usando sustratos de péptidos fluorogénicos

Para evaluar directamente la actividad y especificidad de mutantes de MT-SP1 se realizó un ensayo usando los sustratos de péptidos fluorogénicos Ac-RQAR-ACC (que tiene la secuencia de escisión autocatalítica nativa reconocida por MT-SP1 natural) y Ac-SLGR-ACC (Acetil-Ser-Leu-Gly-Arg-ACC) que tiene la secuencia de escisión del sitio diana C2). Como se observa anteriormente, ACC en los nombres de estos sustratos representa 7-amino-4-carbamoilmetilcumarina, que es el grupo saliente fluorescente. Por tanto, como se observa anteriormente, el uso de sustratos de péptidos fluorogénicos es un procedimiento rutinario para la determinación de la especificidad de la proteasa (Zimmerman y col. (1977) Anal Biochem, 78:47-51; Harris y col. (2000) PNAS, 97:7754-7759). En este ejemplo, la escisión específica del enlace anilida libera el grupo saliente ACC fluorescente, proporcionando un medio eficiente para determinar las velocidades de escisión para sustratos individuales. En este procedimiento, 35 µl de 2x tampón de ensayo indirecto se añadieron a todos los pocillos de prueba. 35 µl del sobrenadante de fagos (aislado como se describe en el Ejemplo 9B) o fago precipitado con PEG resuspendido (aislado como se describe en el Ejemplo 9C) se añadieron a cada uno de los pocillos designados. Después de la adición del fago, la placa se centrifugó a 2000 rpm durante 1 minuto para eliminar las burbujas de aire. 10 µl de cada uno de los sustratos de péptidos (Ac-SLGR-ACC (concentración de ensayo final = 125 µM)) y Ac-RQAR-ACC (concentración de ensayo final = 60 µM)) se diluyeron con 1x tampón de ensayo indirecto y luego se añadieron individualmente a los pocillos apropiados. La tasa de hidrólisis (ROH), medida como unidades de fluorescencia relativa/segundo (UFR/s); indicativa de la escisión del sustrato, se monitorizó con el tiempo usando un lector de microplacas SpectraMax® M5 (Molecular Devices) usando el modo de lectura cinética.

EJEMPLO 11**Producción, selección, evaluación e identificación de mutantes de MT-SP1****5 A. Ensayo fluorogénico de mutantes de MT-SP1 de cadena B de la biblioteca de fagémido**

Este ejemplo describe un ensayo fluorogénico que se llevó a cabo para analizar la actividad y especificidad de los fagos que llevan el dominio de la proteasa MT-SP1 producidos usando la biblioteca producida como se describe en el Ejemplo 8. La biblioteca de MT-SP1 se preparó como se describe en el Ejemplo 8 anterior, usando la cadena B nativa de MT-SP1 que tiene una serina en lugar de la cisteína en la posición 122 basándose en la numeración de la quimotripsina (SEC ID N°: 507) como molde. La biblioteca se preparó como se ha descrito antes, usando el vector pMal-C2 y condiciones de PRC propensa a error recomendadas por el proveedor para lograr una velocidad de mutagénesis aproximada del 0,5%. El rendimiento de esta reacción de mutagénesis fue 4×10^9 recombinantes.

La selección de fagos basándose en la tasa de interacción con y escisión de la AT3 variante que contiene la secuencia de sustrato diana (en lugar del RCL nativo; como se describe en el Ejemplo 7) se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 9A usando una forma de 96 pocillos de polipropileno. Para esta selección, 1×10^{12} fagos recombinantes se mezclaron con AT3 variante 3,3 nM que llevaba una secuencia de RCL SLGRKI RCL durante 30 minutos. Después de lavar, el fago se eluyó como se describe en el Ejemplo 9A anterior, y se usó para infectar células XL-1 Blue como se describe en el Ejemplo 9B.

Se realizaron rondas sucesivas de selección para enriquecer para la rápida interacción con y escisión de la secuencia de sustrato diana usando procedimientos proporcionados y descritos en este documento. Por ejemplo, los clones seleccionados en la primera ronda se sometieron a una segunda ronda de selecciones como se describe en este documento usando AT3 3,3, 1,1, y 0,33 nM durante una hora como se describe en el Ejemplo 9A(3).

Tras la primera ronda de selección, el sobrenadante de fagos se preparó como en el Ejemplo 9C usando precipitación con PEG de clones seleccionados. Los clones de fago se cribaron usando el procedimiento del Ejemplo 10(B) anterior usando como sustratos fluorogénicos tanto Ac-SLGR-ACC (que contiene secuencia del sitio de escisión diana C2) y Ac-RQAR-ACC (que contiene la secuencia de escisión nativa para el MT-SP1 nativo). Para cada clon, la tasa de fluorescencia (ROF) determinada a partir del ensayo de Ac-SLGR-ACC se comparó con la ROF determinada a partir del ensayo de Ac-RQAR-ACC como medio para comparar la actividad de cada dominio de la proteasa MT-SP1 mutada en la secuencia de sustrato nativa para su actividad en las secuencias de sustrato diana. Las ROF en los ensayos de MT-SP1 mutante también se compararon con la ROF en el ensayo de MT-SP1 (C122S) molde. Los resultados obtenidos con clones individuales se muestran en la siguiente Tabla 21 que enumera números de clones y enumera la tasa de fluorescencia como UFR/s (unidades de fluorescencia relativa por segundo).

Tabla 21: Cribado de fago que lleva el dominio de la proteasa MT-SP1 mutante seleccionado para la tasa de escisión de AT3-SLGRKI

Número de clon de MT-SP1 mutante	Tasa de Ac-SLGR-ACC (UFR/s)	Tasa de Ac-RQAR-ACC (UFR/s)
Molde	1,85	15,6
CPC-0019595	7,1	33
CPC-0023085	0,8	2
CPC-0023230	1,3	4
CPC-0023401	3,9	12
CPC-0023949	0,7	2
CPC-0024129	3,8	15
CPC-0024153	2,5	6
CPC-0024527	4,3	12
CPC-0024715	3,2	12
CPC-0025366	1,3	1
CPC-0025387	6,8	14
CPC-0025533	6,9	23
CPC-0025582	1,7	3
CPC-0025720	2,5	5
CPC-0025866	1,2	4
CPC-0025876	4,0	8

Número de clon de MT-SP1 mutante	Tasa de Ac-SLGR-ACC (UFR/s)	Tasa de Ac-RQAR-ACC (UFR/s)
CPC-0025890	10,6	33
CPC-0025941	1,0	4
CPC-0025974	9,3	41
CPC-0026100	14,8	25
CPC-0026122	6,5	31
CPC-0026125	17,4	84
CPC-0026200	7,0	21
CPC-0026219	8,0	23
CPC-0026232	7,1	15
CPC-0026597	11,0	34
CPC-0026727	0,8	2
CPC-0026761	7,8	25
CPC-0027290	3,9	12
CPC-0027306	11,0	50
CPC-0027309	8,3	50
CPC-0027326	9,1	54
CPC-0027335	12,3	57
CPC-0027369	2,3	11
CPC-0027399	13,4	99
CPC-0027484	2,5	12
CPC-0027516	3,4	17
CPC-0027617	1,4	7
CPC-0027706	0,4	1
CPC-0027718	2,1	7
CPC-0027797	5,5	15
CPC-0027841	2,7	9
CPC-0028017	5,1	16
CPC-0028333	5,6	17
CPC-0028341	5,5	26

B. Identificación de fagos de mutantes de MT-SP1 seleccionados por secuenciación de ADN

Este ejemplo describe un procedimiento usado para la identificación de clones de fagos positivos que se prepararon como se describe en los ejemplos previos y se seleccionaron basándose en los resultados de un ensayo fluorogénico tal como el descrito en el Ejemplo 10B anterior. Para este procedimiento, clones individuales se mezclaron con células XL-1 Blue de *E. coli* para la infección y los cultivos se cultivaron durante la noche con agitación a 37°C. El ADN de plásmido se purificó del cultivo durante la noche usando un kit de preparación de plásmidos (Qiagen), y el ADN se envió para secuenciación para la identificación de los mutantes.

En un ejemplo de este procedimiento, las secuencias de aminoácidos de mutantes de MT-SP1 de cadena beta seleccionados del Ejemplo 11A anterior se identificaron usando las etapas explicadas resumidamente anteriormente. El cebador de secuenciación que se usó para la identificación de estos clones se expone en SEC ID N°: 618: 5'GGTGTTCACGAGCACTTC3'. Los resultados obtenidos analizando los datos de secuenciación se exponen en la siguiente Tabla 22. Esta tabla sólo enumera los mutantes con residuos que se ha encontrado que están mutados en más de una cepa aislada. La Tabla 22 enumera las mutaciones/posiciones de aminoácidos para cada clon en comparación con la secuencia de la cadena B de MT-SP1 natural (SEC ID N°: 505), que se determinó por análisis de datos de secuenciación. La numeración de aminoácidos es según la numeración de la quimotripsina. SEC ID N° también se enumeran para tanto la secuencia de residuos de aminoácidos que codifica el dominio de la proteasa MT-SP1 (cadenas B) que contiene las mutaciones de aminoácidos indicadas como también para la secuencia de residuos de aminoácidos que codifica la proteína MT-SP1 de longitud completa que tiene las mismas mutaciones.

Tabla 22: Mutantes de MT-SP1 seleccionados

Número de clon de MT-SP1 mutante	Mutación de aminoácidos (numeración de la quimotripsina)	SEC ID N° (dominio de proteasa):	SEC ID N° (longitud completa):
CPC-0019595	C122S/I136T/N164D/T166A/F184(A)L/D217V	516	537
CPC-0023085	I41F/C122S	517	538
CPC-0024153	I41F/C122S/A126T/V244G	518	539
CPC-0025366	D23E/I41F/T98P/C122S/T144I	519	540
CPC-0025387	I41F/C122S	520	541
CPC-0025582	I41F/C122S/L171F/V244G	512	542
CPC-0025720	C122S/H143R/Q175R	522	543
CPC-0025876	I41F/C122S/L171F	523	544
CPC-0025974	C122S/R230W	524	545
CPC-0026100	I41F/C122S/I154V/V244G	525	546
CPC-0026232	I41F/L52M/C122S/V129D/Q221(A)L	526	547
CPC-0027399	F99L/C122S	527	548
CPC-0027706	F97Y/C122S/I136V/Q192H/S201I	528	549
CPC-0027797	H71R/C122S/P131S/D217V	529	550
CPC-0028017	C122S/D217V	530	551
CPC-0028333	T65K/F93L/F97Y/C122S/D217V	531	552

EJEMPLO 12**5 Preparación y caracterización de cantidades grandes de la proteasa MT-SP1 unida a fago seleccionada****A. Preparación a gran escala de fago de MT-SP1**

Este ejemplo describe la preparación de grandes cantidades de fagos que llevan los dominios de la proteasa MT-SP1 seleccionada para el análisis y el posterior uso de los dominios de proteasa seleccionada en procedimientos en la dirección 3' tales como traducción *in vitro* en las proteasas MT-SP1 completas. Para este ejemplo, colonias que llevan fagos individuales seleccionadas como en el Ejemplo 11 anterior se cultivaron durante la noche en medio 2YT complementado con carbenicilina, a una concentración final de 50 µg/ml, y tetraciclina, a una concentración final de 12 µg/ml, en matraces Erlenmeyer pequeños estériles de tapón naranja de Corning durante la noche. Para preparar las disoluciones madre de glicerol se añadieron 85 µl de glicerol al 60% a 500 µl de cada cultivo seguido de almacenamiento a -80°C. El volumen restante de cada cultivo se añadió a un matraz con deflectores de cuello ancho de 2 l que contenía 500 ml de medio 2YT complementado con carbenicilina y tetraciclina. Alternativamente, esta etapa se realizó en un matraz de 500 ml en un volumen de 50 ml. El cultivo se cultivó hasta que se alcanzó una DO600 de 0,5.

Se añadió fago colaborador M13KO7 al cultivo para dar $1E^{10}$ UFC/ml y el cultivo se incubó durante 1 hora a 37°C. Se añadió kanamicina a una concentración final de 30 µg/ml. Los cultivos con fago colaborador se rescataron durante la noche por incubación a 37°C. Tras el cultivo durante la noche, las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 minutos. Se añadió un volumen de disolución de PEG/NaCl (20% de PEG 8K/NaCl 1,5 M) por 5 volúmenes de cultivo. Entonces, la muestra se agitó a 4°C durante 20 minutos. Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 20 minutos y los sobrenadantes se eliminaron. Después de una segunda etapa de centrifugación a 10.000 rpm, el sedimento se resuspendió en 5 ml (para el volumen de 500 ml inicial) o 1 ml (para el volumen de 50 ml inicial) de PBS. Las células precipitadas que no se resuspendieron se eliminaron por una breve centrifugación a 14.000 rpm durante 2 minutos. Se añadió glicerol, al 10% en volumen, al sobrenadante que contenía las células resuspendidas. Las células se congelaron a -80°C.

B. Ensayo de fago preparado usando sustratos ACC y QF

Este ejemplo describe un ensayo fluorogénico usado para evaluar la actividad y especificidad de los fagos preparados en el Ejemplo 12A. Clones de fagos que llevan MT-SP1 mutante precipitados con PEG, preparados usando el cultivo de 50 ml de volumen como se describe en el Ejemplo 12A, se normalizaron a $1E^{13}$ partículas/ml. Entonces, el fago se ensayó enzimáticamente usando los sustratos fluorogénicos ACC y QF (fluorescencia extinguida, de "Quenched Fluorescence") del siguiente modo. Se añadieron 5 µl de fago (a $1E^{13}$ partículas/ml) a cada pocillo en una placa de microtitulación de medios pocillos de polipropileno negra Costar (Corning) junto con 5 µl de 10x tampón de ensayo de MT-SP1, 35 µl de H₂O y 5 µl de sustrato en un volumen total de 50 µl. Los sustratos usados en los pocillos individuales fueron: Ac-SLGR-ACC (concentración final 120 µM), Ac-RQAR-ACC (concentración final 60 µM), o los siguientes sustratos de fluorescencia extinguida: SLGR-KI y RQAR-SA (usados ambos a la concentración final 0,625 µM). El sustrato Ac-SLGR-ACC se usó para evaluar la escisión por los clones de MT-SP1 mutante de la secuencia de escisión diana (complemento C2), mientras que el sustrato Ac-RQAR-ACC se usó para evaluar la escisión de la secuencia de escisión diana nativa por MT-SP1. Asimismo, el sustrato SLGR-KI se usó para evaluar la escisión de la secuencia de escisión diana (complemento C2), mientras que el sustrato

5 RQAR-SA se usó para evaluar la escisión de la secuencia de escisión diana nativa por MT-SP1. La relación de estas
dos tasas de escisión fue una medida cuantitativa de la especificidad de las proteasas seleccionadas por la nueva
secuencia de escisión elegida como diana. La comparación de estas relaciones para una proteasa variante
seleccionada y la proteasa estructural original correspondiente (es decir, parental) indicó si la proteasa seleccionada
10 presentó selectividad potenciada hacia la nueva secuencia de escisión elegida como diana. Para la lectura de ACC,
el lector de placas SpectraMax® se ajustó para la excitación a 380 nM y para detectar la emisión a 460 nM, con un
corte de 435 nM. Para la lectura de QF, el lector de placas SpectraMax® se ajustó para la excitación a 490 nM, para
detectar la emisión a 520 nM, con un corte de 515 nM. Los resultados de este ensayo se exponen en la siguiente
Tabla 23. Como antes, SEC ID N° se enumeran para tanto la secuencia de residuos de aminoácidos que codifica los
10 dominios de la proteasa MT-SP1 (cadenas B) que contienen las mutaciones de aminoácidos indicadas como
también para la secuencia de residuos de aminoácidos que codifica la proteína de MT-SP1 de longitud completa que
tiene las mismas mutaciones, como se ha determinado por secuenciación, como se describe en el Ejemplo 11B
anterior. Los números de UFR (unidades de fluorescencia relativa) se corresponden con las tasas de hidrólisis
observadas en una reacción de 60 minutos a 37°C para cada sustrato.

Tabla 23: Ensayo cinético de clones de fago que llevan el dominio de proteasa MT-SP1 seleccionada

Número de clon de MT-SP1 mutante	Mutación de aminoácidos (numeración de la quimotripsina)	SEC ID N° (dominio de proteasa):	SEC ID N° (longitud completa):	Ac-SLGR-ACC (UFR/s)	Ac-RQAR-ACC (UFR/s)	SLGR-KI (UFR/s)	RQAR-SA (UFR/s)
Molde	C122S	507	515	2,4	23,5	0,12	0,11
CPC-0028341	I41T/C122S/P173S/Q209L	531	553	10,9	56,8	0,36	0,48
CPC-0033634	F97L/C122S/F234L	533	554	6,2	37,2	0,21	0,19
CPC-0028971	C122S/Q175R	534	555	3,4	11,0	0,20	0,18
CPC-0027484	N95K/C122S	535	556	2,0	9,5	0,07	0,05
CPC-0028993	Y60(G)S/C122S	536	557	0,5	1,0	0,02	0,01
* UFR/s= unidades de fluorescencia relativa / segundo (tasa de hidrólisis)							

EJEMPLO 13**Expresión de proteínas de mutantes de MT-SP1 seleccionadas usando traducción *in vitro***

- 5 Este ejemplo describe la expresión de dominios de la proteasa MT-SP1 seleccionados y cribados como en los ejemplos descritos antes, que no son parte de una proteína de fusión de genes III.

A. Subclonación de la secuencia de MT-SP1 en un vector IVEX modificado

- 10 Con el fin de expresar dominios de la proteasa MT-SP1 seleccionados en fago, como se describe en los ejemplos anteriores, que no se sintetizan como proteínas de fusión de genes III, la región codificante para el dominio de la proteasa MT-SP1 que contiene la secuencia de activación del extremo N y una marca 6xHis en el extremo C se clonó en el vector de traducción *in vitro* pIVEX.2.3d RTS (Roche; SEC ID N°: 559)) usando los sitios de restricción NdeI y XhoI. La secuencia de aminoácidos del extremo N completa de pIVEX:2.3d.MT-SP1 que precede al sitio de escisión RQAR se expone en SEC ID N°: 558:

- 15 MEKTRHHHHHSGSDCGLRSFTRQAR. Los residuos que codifican las proteínas de la cadena B de MT-SP1, que se seleccionaron usando bibliotecas de fagémido como se ha descrito anteriormente, se ensayaron usando procedimientos de cribado fluorogénicos como se describe en el Ejemplo 10B y 11A, y se secuenciaron como se describe en el Ejemplo 11B, se subclonaron en el vector pIVEX.2.3d.MT-SP1 usando los sitios de restricción internos SphI y BsrGI. Se crearon seleccionadores de fagémido que tienen mutaciones en la secuencia de MT-SP1 que estaban fuera de estos sitios internos para su uso en este procedimiento por mutagénesis por PCR.

B. Expresión de MT-SP1 por traducción *in vitro*

- 25 La expresión de los dominios de la proteasa MT-SP1 usando un kit de traducción *in vitro*, el kit de disulfuro de *E. coli* RTS 100 (Roche Applied Science), se realizó usando condiciones especificadas por el proveedor con las siguientes optimizaciones: los componentes de la disolución de reacción de 50 µl se modificaron para incluir 12 µl de mezcla de aminoácidos, 10 µl de mezcla de reacción, 12 µl de lisado, junto con la adición de 5 µl de tampón Hepes 1 M a pH 8, 2,5 µl de Tween-2012 nM, 2,5 µl de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y 6 µl de la chaperona RTS GroE Supplement (Roche Applied Science). La mezcla de alimentación de 1 ml también se modificó para incluir 168 µl de mezcla de aminoácidos, 24 µl de metionina, 608 µl de mezcla de alimentación, 100 µl de Hepes 1 M a pH 8, 50 µl de Tween-20 12 nM y 50 µl de agua. La reacción de traducción *in vitro* (IVT) se incubó en un agitador de placas a 30°C durante 18 horas.

C. Purificación de MT-SP1 marcada con His

- 35 Tras la reacción de traducción *in vitro* (IVT), la proteína insoluble se purificó por centrifugación y se transfirió a un tubo nuevo. El sobrenadante purificado (con un volumen de aproximadamente 45 µl) se enrasó a un volumen final de 1 ml en fosfato de sodio 50 mM a pH 7,5, NaCl 300 mM. La disolución se aplicó a 300 µl de resina TALON® preequilibrada en una columna de cromatografía con fritas de 2 ml (Clontech) y se dejó que circulara por gravedad. La columna se lavó con 3 ml de una disolución que contenía fosfato de sodio 50 mM a pH 7, NaCl 300 mM e imidazol 7,5 mM; y se eluyó con 600 µl de una disolución que contenía fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5, NaCl 300 mM e imidazol 75 mM. El eluato se dializó en solución salina tamponada con fosfato con 0,1% de Tween-20 (PBST) y se concentró a 20 µl. Normalmente, el rendimiento de proteasa purificada fue aproximadamente el 70%.

EJEMPLO 14**Caracterización de dominios de la proteasa MT-SP1 mutada**

- 50 Este ejemplo describe la caracterización de los dominios de la proteasa MT-SP1 mutante mutada que se produjeron como en el Ejemplo 13 anterior.

A. Valoración de sitios activos de reacciones de IVT

- 55 Para evaluar la actividad de proteasa, la valoración de sitios activos de dominios de la proteasa MT-SP1 mutante traducidos *in vitro* se realizó en sobrenadante purificado con el inhibidor de MT-SP1 M84R Ecotin, como se ha descrito (Takeuchi y col., (1999) PNAS 96,11054-11061). Para este ensayo, la proteína de IVT se diluyó a una concentración final de 1:10,000 en 1x tampón de actividad de MT-SP1 y se incubó con Ecotin 15 nM en diluciones seriadas 1:2,5 durante 1 hora a 30°C. La reacción se evaluó cinéticamente para la escisión del sustrato Ac-RQAR-ACC 0,4 mM en un lector de microplacas SpectraMax® M5 (Molecular Devices, Inc). El grupo saliente ACC se detectó a longitudes de onda de excitación (Ex) = 380, emisión (Em) = 450 y corte (c/o) = 435. Los puntos de ensayo que muestran actividad fraccionaria entre el 20% y el 80% de la actividad sin inhibir se representaron en una gráfica de actividad frente a la concentración de Ecotin, y se dibujó una línea por los puntos. El corte con el eje x de la línea se usó para establecer la concentración activa de la proteasa por IVT. La reacción se representó gráficamente, representando la parte lineal de la curva la concentración activa de la proteasa por IVT. Por tanto, la concentración

de sitios activos (expuesta para varios mutantes en la Tabla 24 más adelante; conc. de sitio activo) se determinó usando la valoración de sitios activos.

B. Ensayo de mutantes de dominios de la proteasa MT-SP1 por IVT con sustratos ACC y QF

5 Varios selectores de fago de MT-SP1 producidos por IVT se evaluaron para elevada especificidad por el sitio de escisión de RCL mutante con respecto al sitio de escisión de MT-SP1 RQAR nativo por ensayos enzimáticos cinéticos de fluorescencia extinguida (QF). Los sobrenadantes de IVT, purificados como se describe en el Ejemplo 13C anterior, se diluyeron 1:10.000 en 1x tampón de actividad de MT-SP1 y se incubaron con 6,25 μ M de tanto el

10 sustrato QF de RQAR-SL nativo como el sustrato de escisión de C2 de RCL mutante; SLGR-KI. La escisión se evaluó usando un lector de placas SpectraMax® M5 (Molecular Devices) con longitudes de onda de Ex = 490, Em = 520 y c/o = 515. La especificidad relativa de la proteasa producida por IVT para la secuencia diana de RCL con respecto a la secuencia nativa se calculó usando la relación de UFR/s (unidades fluorescentes relativas por

15 segundo) para SLGR-KI y RQAR-SL. Los resultados se exponen en la siguiente Tabla 24. En la columna rotulada SEC ID N°: las SEC ID N° que exponen la secuencia de aminoácidos de los dominios de proteasa que contienen las mutaciones de aminoácidos indicadas se enumeran primero; y las SEC ID N° que exponen la secuencia de residuos de aminoácidos que codifica MT-SP1 de longitud completa que contiene las mutaciones de aminoácidos indicadas se muestran entre paréntesis. Los números de UFR indican las unidades de fluorescencia relativa medidas (tasa de hidrólisis) para cada sustrato.

Tabla 24: Ensayo cinético de dominios de proteasa MT-SP1 mutantes

Número de clon de MTSP1 mutante	Mutación de aminoácidos (numeración de la quimotripsina)	SEC ID N°:	Conc. de sitios activos	Ac-SLGR-ACC UFR/s	Ac-RQAR-ACC UFR/s	Ac-SLGR-KI QF UFR/s	Ac-RQAR-SA QF UFR/s
CPC-0025720	C122S/H143R/Q175R	522 (543)	3,9	0,10	0,46	0,05	0,04
CPC-0025876	I41F/C122S/L171F	523 (544)	2,5	0,10	0,39	0,00	0,01
CPC-0027399	F99L/C122S	527 (548)	4,2	0,55	9,84	0,04	0,09
CPC-0027797	H71R/C122S/P 131S/D217V	529 (550)	3,7	0,31	1,62	0,14	0,19
GPC-0028017	C122S/D217V	530 (551)	4,7	1,42	7,29	0,38	0,50
CPC-0028333	T65K/F93L/F97 Y/C122S/D217V	531 (552)	3,6	1,05	5,97	0,37	0,51
Molde	C122S	507 (515)	3,5	0,22	3,58	0,05	0,06

EJEMPLO 15**Expresión de proteínas de mutantes de MT-SP1 seleccionados como proteína purificada****5 A. Transferencia del dominio de la proteasa MT-SP1 en el vector pQE**

Un subconjunto de clones de fago que llevan dominios de la proteasa MT-SP1 ensayados en los ejemplos previos se seleccionó para la transferencia de la secuencia del dominio de la proteasa MT-SP1 en un vector de expresión pQE30 que se modificó previamente para la expresión del dominio de la proteasa MT-SP1 natural. El kit de clonación por PCR InFusion DryDown (Clontech) se usó para transferir clones seleccionados en pQE30-MT-SP1 (SEC ID N°: 624) usando condiciones especificadas por el proveedor y como se describen por Benoit y col. (2006), Protein Expression & Purification 45:66-71. Para este procedimiento, una parte del ADN del clon de fago que codifica el dominio de la proteasa MT-SP1 se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el cebador directo pQE-Insert-F2:

TTCACGAGACAGGCTCGTGTGTTGGGGGCACGGAT (SEC ID N°: 560) y el cebador inverso pQE-Insert-R3:

CAGCTAATTAAGCTTATTATACCCAGTGTTCTCTTT (SEC ID N°: 561),

llevando cada uno colas 5' no hibridantes. El plásmido pQE30-MT-SP1 sin el dominio de la proteasa MT-SP1 se linealizó usando PCR con el cebador directo: pQE-Linear-F2: **ACGAGCCTGTCTCGTGAATGACCGCAGCCC** (SEC ID N°: 562) y el cebador inverso: pQE-Linear-R1:

TAATAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCC (SEC ID N°: 563) seguido de tratamiento de los productos de PCR tanto donantes como aceptores con la enzima DpnI. Para cada secuencia de cebador de linealización expuesta anteriormente, la región de homología de 18 nt de longitud, una cola de cebador de 5' no hibridante, se muestra en negrita. Entonces, tanto el ADN aceptor como el donante se mezclaron juntos, y la reacción InFusion se ejecutó en un volumen de 10 µl usando condiciones especificadas por el proveedor. 2 µl de la mezcla de reacción se transformaron en 50 µl de células competentes TOP10F' de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las colonias se seleccionaron en placas de agar de LB complementado con 100 ppm de carbenicilina. Se aisló ADN de plásmido de los clones seleccionados y se secuenciaron usando el cebador directo MT-SP1-5F: **GGAGAAACCGCAGAGTAC** (SEC ID N°: 564) y el cebador inverso MT-SP1-5R: **GGTCTCGCAGGTGGTCTG** (SEC ID N°: 565) para verificar la correcta transferencia. Estos cebadores se hibridan completamente.

B. Expresión, replegamiento y purificación de dominios de la proteasa MT-SP1 mutada

Los plásmidos que codifican el dominio de proteasa de variantes de MT-SP1 en el vector pQE30 (Qiagen) descritos en el Ejemplo 15B anterior se transformaron en células BL21-Gold(DE3) de *E. coli* (Stratagene). Cultivos de iniciador pequeño que contienen 1 ml de LB complementado con 100 µg/ml de carbenicilina se inocularon a partir de colonias y se incubaron durante entre 8 y 10 horas a 37°C. Se usaron 100 µl de este cultivo para inocular 50 ml de 2x medio YT complementado con 100 µg/ml de carbenicilina y se cultivaron durante la noche. En tubos cónicos de 50 ml (Corning), las células se recogieron por centrifugación, luego se lisaron. Los cuerpos de inclusión (IB) se aislaron con el reactivo BugBuster® (Novagen) usando las condiciones especificadas por el proveedor. Los sedimentos de IB se solubilizaron con 1 ml de una disolución desnaturizante que contenía Tris 100 mM a pH 8, GdmHCL 6 M y DTT 20 mM. Después de eliminar cualquier material insoluble por centrifugación en tubos de microcentrifuga (20.000 x g durante 10 min), el sobrenadante se diluyó en 40 ml de disolución de replegamiento que contenía arginina 1,5 M, Tris 100 mM a pH 8, NaCl 150 mM, glutatión reducido 5 mM y glutatión oxidado 50 µM en tubos cónicos de 50 ml (Corning). Los tubos se colocaron horizontalmente en una plataforma Nutator (Fisher Scientific) a 4°C durante 3-4 días. Entonces, las variantes de MT-SP1 replegadas, todavía no activadas, se dializaron extensivamente a temperatura ambiente contra Tris 25 mM a pH 8, NaCl 25 mM durante 3-4 días. Tras la eliminación de la arginina durante la diálisis pudieron activarse las variantes de dominios de la proteasa MT-SP1.

Entonces, las preparaciones brutas de variantes de dominios de la proteasa MT-SP1 activada se purificaron por cromatografía en una columna HiTrap™ Q HP de 5 ml (GE Healthcare) unida a un sistema AKTA que operaba en modo automatizado, permitiendo el procesamiento de hasta siete variantes por ronda. El tampón de electroforesis fue Bis-Tris 25 mM a pH 6,5 y la MT-SP1 purificada se eluyó dentro de un gradiente de 50 ml a NaCl 350 mM. Las fracciones activas se reunieron, luego se cambió el tampón a PBS + benzamidina 20 mM y se concentró a 0,5-10 mg/ml usando dispositivos Amicon-Ultra 15 (Millipore) con un MWCO de 10 kDa. Finalmente, las alícuotas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.

EJEMPLO 16**Preparación de cebos del inhibidor PAI mutante biotinilado**

5 Este ejemplo describe procedimientos que se usaron para expresar y purificar proteínas del inhibidor PAI mutante, marcado con biotina para la captura sobre superficies recubiertas con estreptavidina, para su uso en la selección de proteasas uPA variantes de bibliotecas de uPA. Estos inhibidores PAI mutantes también son útiles para la selección de algunas proteasas MT-SP1 variantes de bibliotecas de MT-SP1, dependiendo de la variante de MT-SP1 y la secuencia del RCL usada en el PAI.

A. Biotinilación del extremo N de 6xHis-PAI-1

15 Para la biotinilación de 6xHis-PAI-1, o las variantes del bucle del centro reactivo del mismo, PAI-1 natural marcado con His (SEC ID N°: 625) y variantes de PAI-1 marcado con His, como se describen en este documento en el Ejemplo 1, se transformaron en la cepa huésped Rosetta-2 (DE3)pLysS (Novagen). La expresión se llevó a cabo esencialmente como se ha descrito (Blouse, G. E., Perron, M. J., Thompson, J. H., Day, D. E., Link, C. A., y Shore, J. D. (2002) *Biochemistry* 41 (40), 11997-12009), con las siguientes modificaciones. La inducción se llevó a cabo durante tres horas a 30°C en 2x medio YT complementado con 0,2% de glucosa, 100 ug/ml de carbenicilina y 10 ug/ml de cloranfenicol (Cm). Entonces, la fracción activa de 6xHis-PAI-1 se purificó a partir de los lisados celulares como se ha descrito (Blouse, G. E., Perron, M. J., Kvassman, J. O., Yunus, S., Thompson, J. H., Betts, R. L., Lutter, L. C., y Shore, J. D. (2003) *Biochemistry* 42(42), 12260-12272; Kvassman, J.-O., y Shore, J. D. (1995) *Fibrinolysis* 9, 215-221).

25 Las variantes de 6xHis-PAI-1 se biotinilaron preferencialmente en el extremo N usando el reactivo escindible de disulfuro EZ-Link NHS-SS-PEO₄-Biotina (PIERCE, Rockford, IL n° 21442). Las reacciones se llevaron a cabo a pH 6,2, durante 4 horas, a 4°C sobre hielo en un tampón que contenía NaPi 50 mM/NaCl 300 mM/EDTA 1 mM. La reacción se inició mediante la adición de un exceso molar de 5 veces de reactivo de biotinilación disuelto en DMSO. La concentración final de DMSO en la reacción se mantuvo a menos del 1%. La reacción de biotinilación se inactivó mediante la adición de Tris 0,5 M/NaCl 1,0/EDTA 10 mM, pH 7,4, a una concentración de Tris final de 20 mM. El reactivo de biotinilación en exceso se eliminó por diálisis extensiva contra un tampón de almacenamiento que contenía NaPi 50 mM/NaCl 300 mM/EDTA 1 mM, pH 6,2. La concentración de PAI-1 en la disolución resultante se confirmó usando un coeficiente de extinción de 0,93 ml mg⁻¹ cm⁻¹ (véase: Kvassman, J.-O., y Shore, J. D. (1995) *Fibrinolysis* 9, 215-221). El grado de biotinilación se determinó usando el kit EZ-Quant HABA/Avidin (PIERCE, Rockford, IL, n° 28005), siguiendo las condiciones especificadas por el proveedor, y normalmente estuvo entre 1,0 y 35 1,2 moles de biotina por 1 mol de variante de PAI-1.

B. Biotinilación *in vivo* de PAI: Biotinilación de BRS-TEV-OptiPAI-1^{estab} *in vivo*:

40 Este ejemplo describe un procedimiento que se usó para biotinilar *in vivo* PAI. En este ejemplo, una secuencia de reconocimiento apropiada se incorporó en el gen que codifica la molécula cebo de manera que la elección como diana de la biotina del cebo pudiera llevarse a cabo en células en crecimiento, en lugar de llevarse a cabo con cebo purificado *in vitro*. Un gen que codifica la proteína PAI-1 estable (PAI-1^{estab}), que tiene la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 567), que tiene las mutaciones N150H, K154T, Q319L y M354I (Berkenpas, M. B., Lawrence, D. A., y Ginsburg, D. (1995) *EMBO J.* 14(13), 2969-2977), se diseñó para contener las siguientes regiones en el siguiente orden: 1) codón de iniciación, 2) secuencia de reconocimiento de biotina (BRS), 3) secuencia de proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV), 4) secuencia codificante de PAI, 5) codón de terminación; con optimización de codón de *Escherichia coli*. Este gen PAI-1^{estab} sintético se clonó en el vector de expresión comercial pET21-a (Novagen, Madison, WI) (SEC ID N°: 566) usando las enzimas de restricción *Xba*I y *Hind*III produciendo el plásmido pCAT0002 (SEC ID N°: 619), que expresó PAI-1 optimizado (OptiPAI-1; codificado por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 621, en la que el residuo de posiciones de aminoácidos 3-17 y 20-26 se corresponde con los sitios BRS y TEV, respectivamente) usando el sistema de expresión T7. Entonces, el plásmido pCAT0002 se cotransformó en células competentes HL21-Gold (DE3) de *E. coli* (Stratagene, San Diego, CA) que llevaban el plásmido pBirA (descrito en Asai y col., (1999) *J. Biol. Chem.* 274:20079-20078), que expresa por incremento la biotina ligasa de *E. coli*, BirA. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar de 55 Luria-Bertani (LB) complementado con 100 ug/ml de carbenicilina y 10 ug/ml de cloranfenicol (Cm).

La expresión de BRS-TEV-OptiPAI-1^{estab} (SEC ID N°: 621) y las variantes del bucle del centro reactivo del mismo se llevó a cabo esencialmente como se ha descrito (Blouse, G. E., Perron, M. J., Thompson, J. H., Day, D. E., Link, C. A., y Shore, J. D. (2002) *Biochemistry* 41(40), 11997-12009), con las siguientes modificaciones. La inducción se inició mediante la adición de IPTG 0,1 mM y D-biotina 0,1 mM durante tres horas a 30°C en 2x medio YT complementado con 0,2% de glucosa, 100 ug/ml de carbenicilina y 10 ug/ml de cloranfenicol (Cm). La fracción activa de BRS-TEV-OptiPAI-1^{estab} se purificó posteriormente a partir de los lisados celulares como se ha descrito (véase: Blouse, G. E., Perron, M. J., Kvassman, J. O., Yunus, S., Thompson, J. H., Betts, R. L., Lutter, L. C., y Shore, J. D. (2003) *Biochemistry* 42(42), 12260-12272; y Kvassman, J.-O., y Shore, J. D. (1995) *Fibrinolysis* 9, 215-221) o por selección por cromatografía en avidina monomérica (PIERCE, Rockford, IL, n° 20227), siguiendo las condiciones especificadas por el proveedor, con las siguientes modificaciones. El tampón de unión contuvo Tris 50 mM/NaCl 100

mM/EDTA 1 mM /0,01% de Tween-80 y tuvo un pH de 7,4; y se usó un tampón de elución competitivo que contenía este tampón de unión más D-biotina 2 mM. La biotina de la etapa de elución competitiva se eliminó por diálisis extensiva contra un tampón de almacenamiento que contenía NaPi 50 mM/300 mM NaCl/EDTA 1 mM, pH 6,2. La concentración de PAI-1 se confirmó usando un coeficiente de extinción de $0,93 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como se ha descrito (Kvassman, J.-O., y Shore, J. D. (1995) *Fibrinolysis* 9, 215-221).

C. Biotinilación *in vitro* de V1C OptiPAI-1^{estab}

Este ejemplo expone procedimientos para la biotinilación del extremo N de una variante de PAI. Los procedimientos descritos en este ejemplo se llevaron a cabo para incorporar un grupo reactivo apropiado en el gen que codifica la molécula de cebo de PAI, de forma que la elección como diana de la biotina del cebo podría llevarse a cabo después de purificarse la proteína, permitiendo el marcado específico de posición del cebo. En este ejemplo, como el PAI nativo no contiene ningún residuo de cisteína, se añadió un codón de cisteína al ADN que codifica el gen PAI para crear un PAI que contiene Cys que luego podría hacerse reaccionar con los reactivos de biotinilación reactivos con Cys.

La secuencia de BRS-TEV del extremo N de OptiPAI-1, en el plásmido pCAT0002 descrito anteriormente, se deletó con introducción simultánea de la mutación V1C usando el kit de mutagénesis QuikChange-XL (Stratagene, San Diego, CA) según las especificaciones del proveedor produciendo el plásmido pCAT0051 (SEC ID N°: 623) que expresa la proteína V1C OptiPAI-1^{estab} (SEC ID N°: 622). El plásmido pCAT0051 se transformó en células competentes BL21(DE3) pLysS de *E. coli* (Stratagene, San Diego, CA). Los transformantes se seleccionaron en placas de agar de Luria-Bertani (LB) complementado con 100 ug/ml de carbenicilina y 10 ug/ml de cloranfenicol (Cm).

La expresión de la proteína V1C OptiPAI-1^{estab} y las variantes del bucle del centro reactivo de la misma se llevó a cabo esencialmente como se ha descrito (Blouse, G. E., Perron, M. J., Thompson, J. H., Day, D. E., Link, C. A., y Shore, J. D. (2002) *Biochemistry* 41(40), 11997-12009), con las siguientes modificaciones. La inducción se inició mediante la adición de IPTG 0,1 mM durante tres horas a 30°C en 2x medio YT que se complementó con 0,2% de glucosa, 100 ug/ml de carbenicilina y 10 ug/ml de cloranfenicol. La fracción activa V1C OptiPAI-1^{estab} o variante de la misma se purificó a partir de los lisados celulares como se ha descrito (Blouse, G. E., Perron, M. J., Kvassman, J. O., Yunus, S., Thompson, J. H., Betts, R. L., Lutter, L. C., y Shore, J. D. (2003) *Biochemistry* 42(42), 12260-12272; y Kvassman, J.-O., y Shore, J. D. (1995) *Fibrinolysis* 9, 215-221).

Las proteínas V1C OptiPAI-1 y variantes se biotinilaron en el residuo de cisteína del extremo N modificado por ingeniería usando el reactivo de biotinilación reactivo con tiol y reversible EZ-Link Biotin-HPDP (N-(6-(biotinamido)hexil)-3'-(2'-piridiliditio)-propionamida) (PIERCE, Rockford, IL, n°21341). La conjugación de biotina se llevó a cabo según las especificaciones del proveedor, con algunas modificaciones, del siguiente modo. Las disoluciones madre de biotina-HPDP se prepararon a 5 mg/ml en DMF anhidra (9,3 mM). V1C OptiPAI-1^{estab} se desaló rápidamente sobre columnas de filtración en gel G-25, de las que se eluyó en un tampón de conjugación que contenía NaPi 50 mM/NaCl 150 mM/EDTA 1 mM/0,01% de Tween-80, pH 7,4. Las reacciones de biotinilación se iniciaron mediante la adición de un exceso molar de 10 veces de disolución madre de biotina-HPDP. La concentración final de dimetilformamida (DMF) se mantuvo inferior al 2-3%.

Las reacciones se llevaron a cabo durante 4 horas a 25°C y el progreso de la reacción se siguió usando la liberación del grupo saliente piridin-2-ona a 343 nm. El reactivo de biotinilación en exceso se eliminó por diálisis extensiva contra un tampón de almacenamiento que contenía NaPi 50 mM/NaCl 300 mM/EDTA 1 mM, pH 6,2. La concentración de PAI-1 se confirmó usando un coeficiente de extinción de $0,93 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como se ha descrito (Kvassman, J.-O., y Shore, J. D. (1995) *Fibrinolysis* 9, 215-221). El grado de biotinilación fue normalmente 1,0-1,2 moles de biotina por mol de variante de PAI-1 usando el kit EZ-Quant HABA/Avidin y la liberación de piridin-2-ona (PIERCE, Rockford, IL, n° 28005).

EJEMPLO 17

Cribado de variantes de MT-SP1 de sobrenadantes de cultivo de *E. coli* y extractos periplásmicos

Este ejemplo describe dos procedimientos, cada uno usado como una alternativa al cribado de la actividad de variantes de MT-SP1 en fago ensayando tanto la proteína del espacio periplásmico de *E. coli* como la proteína del medio de cultivo celular de *E. coli*.

Para ambos procedimientos se preparó 1 ml de cultivos del siguiente modo. 1 ml de medio 2YT complementado con 100 ug/ml de carbenicilina y 12 ug/ml de tetraciclina se dispensó a cada pocillo de una placa de pocillos profundos de 96 pocillos y se inoculó con 10 µl de células XL-1 Blue que se habían infectado con fago que lleva dominio de la proteasa MT-SP1 durante la noche como se describe en el Ejemplo 14 anterior, de una placa maestra de 96 pocillos. La placa de pocillos profundos se tapó con una membrana permeable al aire y se colocó en un estufa de incubación con agitador HiGro con agitación a 400 rpm a 37°C con aireación de oxígeno hasta que la densidad celular alcanzó DO600 0,4 - 0,6 (normalmente 4-5 horas de agitación). En ese momento se añadió IPTG a una concentración final

de 0,5 mM, y el crecimiento con agitación continuó durante la noche. Al siguiente día, la placa se centrifugó a 3600 rpm durante 20 min para sedimentar las células.

A. Cribado de variantes de MT-SP1 a partir de preparaciones periplásmicas

5 Los procedimientos en este ejemplo se usaron para ensayar las proteínas de fusión de MT-SP1 de longitud completa-gen III, y los productos de escisión enzimáticamente activos de las proteínas de fusión, que se habían transportado en el espacio periplásmico de *E. coli*. Después de la centrifugación a 3600 rpm, el sobrenadante de cultivo se desechó y el sedimento de células se usó para liberar las proteínas periplásmicas usando cualquiera de las siguientes condiciones: Condición 1: los sedimentos de células se resuspendieron en 150 µl de solución salina tamponada con fosfato fría (PBS); la suspensión se transfirió a una placa de PCR de 96 pocillos; seguido de una etapa de congelación-descongelación (20 min a -80°C / 10 min en un baño de agua a temperatura ambiente); o Condición 2: los sedimentos de células se resuspendieron en 150 µl de 3% de reactivo de extracción de proteínas BugBuster (Novagen); la suspensión se transfirió a una placa de PCR de 96 pocillos; y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, las suspensiones de células se centrifugaron durante 20 min a 3600 rpm a 4°C y los sobrenadantes que contenían las proteínas periplásmicas se eliminaron cuidadosamente sin perturbar el sedimento. Además, los extractos periplásmicos se usaron para determinar la actividad enzimática de las variantes de MT-SP1 usando sustratos apropiados como se describe en el Ejemplo 10, Sección B.

B. Cribado de variantes de MT-SP1 a partir de preparaciones de sobrenadante

20 Los procedimientos en este ejemplo se usaron para ensayar las proteínas de fusión de MT-SP1 de longitud completa-gen III, y los fragmentos catalíticamente activos de la proteína de fusión, que habían difundido del periplasma y en los medios de cultivo de células bacterianas. En este ejemplo, después de la centrifugación en el cultivo de 1 ml, 10 µl del sobrenadante de cultivo se extrajeron y se ensayaron usando el ensayo de proteasa descrito en el Ejemplo 10, Sección B, excepto que a la reacción se añadieron 25 µl adicionales de tampón de ensayo.

30 Como las modificaciones serán evidentes para aquellos expertos en esta materia, se pretende que la presente invención sólo se limite por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de la serina proteasa 1 tipo membrana (MT-SP1) modificado o una porción catalíticamente activa del mismo, que comprende un reemplazo de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 60(g),
5 basado en la numeración de quimotripsina, por el que la especificidad por sustrato por una proteína del complemento es elevada en comparación con el polipéptido de MT-SP1 que no contiene el reemplazo de aminoácido.
2. El polipéptido de MT-SP1 modificado o porción catalíticamente activa del mismo de la reivindicación 1, que
10 comprende un reemplazo de aminoácido en un residuo de aminoácido Y60(g).
3. El polipéptido de MT-SP1 modificado o porción catalíticamente activa del mismo de la reivindicación 2, que comprende un reemplazo de aminoácido Y60(g)S.
- 15 4. El polipéptido de MT-SP1 modificado o porción catalíticamente activa del mismo de la reivindicación 3, que comprende un reemplazo de aminoácido seleccionado de entre D23E, 141F, 141T, L52M, T65K, H71 R, F93L, N95K, F97Y, F97L, T98P, F99L, A126T, V129D, P131S, I136T, I136V, H143R, T144I, I154V, N164D, T166A, L171F, P173S, Q175R, F184(a)L, Q192H, S201I Q209L, D217V, Q221(a)L, R230W, F234L y V244G.
- 20 5. El polipéptido de MT-SP1 modificado o porción catalíticamente activa del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el reemplazo de aminoácido es en un polipéptido de MT-SP1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 253, o en una porción catalíticamente activa de una MT-SP1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 505.
- 25 6. El polipéptido de MT-SP1 modificado o fragmento catalíticamente activo del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el reemplazo de aminoácido es en un polipéptido de MT-SP1 que comprende además un reemplazo de aminoácido correspondiente al reemplazo de aminoácido C122S en un polipéptido de MT-SP1 expuesto en SEC ID N°: 253, basado en la numeración de quimotripsina.
- 30 7. El polipéptido de MT-SP1 modificado o fragmento catalíticamente activo del mismo de la reivindicación 6, en el que el reemplazo de aminoácido es en un polipéptido de MT-SP1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 507 o 515.
- 35 8. El polipéptido de MT-SP1 modificado o fragmento catalíticamente activo del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el polipéptido de MT-SP1 modificado tiene el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencias con el polipéptido de MT-SP1 natural expuesto en SEC ID N°: 253, o una porción catalíticamente activa del mismo expuesto en SEC ID N°: 505.
- 40 9. El polipéptido de MT-SP1 modificado o fragmento catalíticamente activo del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el reemplazo de aminoácido aumenta uno o ambos de la especificidad por una proteína del complemento C2 o actividad hacia una proteína del complemento C2.
- 45 10. El polipéptido de MT-SP1 modificado o porción catalíticamente activa del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOS: 536, 557, 588 y 609.
11. Una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de MT-SP1 modificado o fragmento catalíticamente activo del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 50 12. Un kit, que comprende la composición farmacéutica de la reivindicación 11, un dispositivo para la administración de la composición y, opcionalmente, instrucciones para la administración.
13. Una molécula de ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica uno cualquiera del polipéptido de MT-SP1 modificado o fragmento catalíticamente activo del mismo de cualquiera de las
55 reivindicaciones 1-10.
14. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13.
15. Una célula, que comprende el vector de la reivindicación 14.
- 60 16. Una composición farmacéutica de la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada de entre enfermedades autoinmunitarias, septicemia, artritis reumatoide (AR), glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP), esclerosis múltiple (EM), miastenia grave (MG), asma, enfermedad inflamatoria del intestino, lesión de tejido inflamatoria aguda mediada por inmunocomplejos (IC), enfermedad de
65 Alzheimer (EA), lesión por isquemia-reperfusión, rechazo de un órgano trasplantado, degeneración macular y síndrome de Guillain-Barré.

17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, en la que la lesión por isquemia-reperfusión se produce por un acontecimiento o tratamiento seleccionado de entre infarto de miocardio (IM), accidente cerebrovascular, angioplastia, injerto de derivación de la arteria coronaria, derivación cardiopulmonar (DCP) y hemodiálisis.

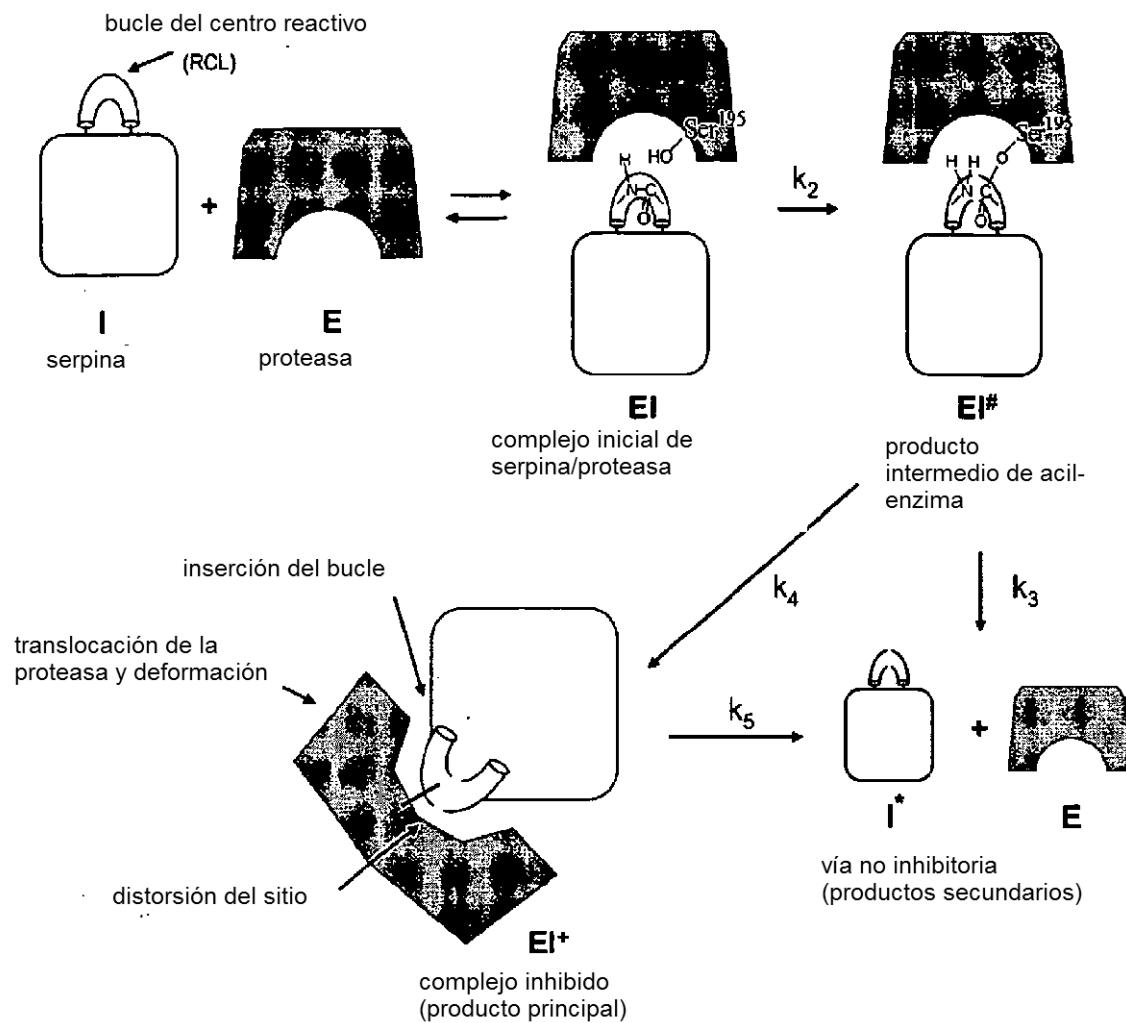


FIGURA 1