

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 066**

51 Int. Cl.:

C12N 9/66 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2008 E 13181046 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2666854**

54 Título: **Proteínas elásticas recombinantes y procedimientos de fabricación y uso de las mismas**

30 Prioridad:

04.12.2007 US 992319 P
03.12.2008 US 327809

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.07.2017

73 Titular/es:

PROTEON THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
4420 Madison Avenue, Suite 180
Kansas City, MO 64111, US

72 Inventor/es:

FRANANO, F. NICHOLAS;
BLAND, KIMBERLY;
WONG, MARCO D. y
DING, BEE C.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 627 066 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).

Proteínas elastasas recombinantes y procedimientos de fabricación y uso de las mismas**DESCRIPCIÓN****5 1. CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a procedimientos recombinantes de fabricación y formulación de proteínas elastasas para su uso en el tratamiento y la prevención de enfermedades de conductos biológicos. La presente invención se refiere además a novedosas proteínas elastasas recombinantes y composiciones farmacéuticas que contienen tales proteínas. Todavía además, la presente invención se refiere al uso de composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas elastasas recombinantes para el tratamiento y la prevención de enfermedades de conductos biológicos.

15 2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La elastina es una proteína que puede reenrollarse espontáneamente después de estirarse. La elastina reticulada es el principal componente estructural de las fibras elásticas, que confiere elasticidad al tejido. Una proteinasa puede llamarse una elastasa si posee la capacidad para solubilizar elastina reticulada madura (Bieth, JG "Elastases: catalytic and biological properties" en las págs. 217-320 (Mecham Edition, Regulation of Matrix Accumulation, Nueva York, Academic Press, 1986). Varias solicitudes de patente publicadas (documentos WO 2001/21574; WO 2004/073504; y WO 2006/036804) indican que la elastasa, sola y en combinación con otros agentes, es beneficiosa en el tratamiento de enfermedades de conductos biológicos, que incluyen conductos biológicos que están experimentando, o susceptibles a experimentar, obstrucción y vasoespasma. Para terapia con elastasa de sujetos humanos se desea el uso de una elastasa humana para reducir el riesgo de reacción inmunitaria a una elastasa no humana.

Sin embargo, hasta la fecha, no hay medios viables comercialmente conocidos de producción de elastasa biológicamente activa en forma suficientemente pura y en cantidades suficientes para aplicaciones clínicas. Debido a que las elastasas son poderosas proteasas que pueden hidrolizar numerosas proteínas distintas de elastina, la actividad proteolítica de la elastasa posee posibles obstáculos para su producción recombinante. Por ejemplo, la actividad de elastasa madura puede dañar la célula huésped que está expresándola, degradarse a sí misma o degradar agentes usados para ayudar en la producción o caracterización de la elastasa.

Las elastasas se expresan frecuentemente como preproteínas, que contienen un péptido señal, un péptido de activación y una porción activa madura. La escisión de la secuencia señal tras la secreción da una proproteína que puede tener poca o ninguna actividad enzimática, y cuya secuencia de aminoácidos contiene la secuencia de aminoácidos de un péptido de activación y una proteína madura. Generalmente, para expresión recombinante, un precursor inactivo puede expresarse en lugar de la enzima activa madura para evadir el daño a la célula que la expresa. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.212.068 describe la clonación de ADNc de elastasa pancreática humana (denominada allí dentro elastasa "IIA", "IIB", "IIIA" y "IIIB"). Las diversas elastasas se expresaron como ADNc de longitud completa, que incluyen las secuencias señal nativas, en células COS-1 de mamífero. Además, versiones manipuladas de las elastasas, que contienen una secuencia señal de *B. subtilis* y una secuencia señal de -galactosidasa, también se expresaron en *B. subtilis* y *E. coli*, respectivamente. La patente de EE.UU. nº 5.212.068 también sugiere que expresa elastasas en *S. cerevisiae*. Generalmente, ejemplos de trabajo de expresión de elastasa en la patente de EE.UU. nº 5.212.068 muestran baja actividad de la elastasa recuperada o requieren una etapa de activación que implica tratamiento con tripsina, para generar la elastasa activa. Además, las elastasas estuvieron ampliamente presentes en cuerpos de inclusión cuando se expresaron en *E. coli*, y solo pequeñas porciones de la elastasa expresada fueron solubles y activas. Ninguna de las preparaciones de elastasa descritas en la patente de EE.UU. nº 5.212.068 se purificó a calidad farmacéutica.

Dall'Acqua y col., 1999, Protein Engineering 12, pág. 981-986, desvela la expresión y secreción del tipo de elastasas de neutrófilos humanos del tipo salvaje y variante humana recombinantes con especificidad de sustrato alterada. Las elastasas se expresaron en *Pichia pastoris* una secuencia pro elastasa, y por lo tanto no necesitaron un paso de activación de zimógeno. La WO00/68363 se refiere a variantes de elastasa con especificidad de sustrato alterada, y prevé además la producción de una elastasa o variante de elastasa que no requiere activación de zimógeno, junto con una molécula de ácido nucleico, vector y célula huésped adecuada para su uso en este método de producción, en el que la molécula de ácido nucleico codifica una elastasa que carece de una prosequencia que por lo tanto no requiere de activación de zimógeno.

Sin embargo, hay una necesidad en la materia de procedimientos de fabricación recombinantes que permitan la generación de cantidades terapéuticas de elastasas de calidad farmacéutica biológicamente activas, y preferentemente eviten una etapa de activación de tripsina que es costosa para preparación a gran escala y puede producir contaminación por tripsina del producto final. La administración de una elastasa que contiene tripsina a un paciente podría producir la activación de los receptores 1 y 2 activados por proteasa, que puede reducir algunos de los efectos beneficiosos del tratamiento de elastasa.

La citación o identificación de cualquier referencia en la Sección 2 o en cualquier otra sección de la presente solicitud no debe interpretarse como una admisión de que tal referencia esté disponible como técnica anterior a la presente invención.

5 3. RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se define en las reivindicaciones. Hasta el punto de que la siguiente descripción puede explicar detalles referentes a la materia que no está cubierta por las reivindicaciones, tal materia se proporciona para información solo.

10 La presente invención proporciona procedimientos eficaces novedosos de preparación de proteínas elastasas recombinantes y el uso de las proteínas recombinantes en composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, formulaciones de elastasa o dosificaciones unitarias, para el tratamiento y prevención de enfermedades de conductos biológicos.

15 La presente invención se refiere a proteínas proelastasas auto-activadas, ácidos nucleicos que codifican proteínas proelastasas auto-activadas, células huésped que comprenden dichos ácidos nucleicos, procedimientos de preparación de proteínas proelastasas auto-activadas y el uso de proteínas proelastasas auto-activadas en la fabricación de proteínas elastasas biológicamente activas maduras, por ejemplo, para su uso en formulaciones farmacéuticas. El término "auto-activadas" (o "autoactivadas") se usa en el presente documento indistintamente con el término "auto-activante" y no pretende implicar que ha tenido lugar una etapa de activación. El término "activación" se usa en el presente documento indistintamente con el término "conversión" y no pretende implicar que una proteína resultante de "activación" posea necesariamente actividad enzimática.

25 Como se usa en el presente documento más adelante, y a menos que se indique lo contrario, el término "elastasa" generalmente se refiere a proteínas elastasas maduras con actividad de elastasa, además de proteínas elastasas inmaduras, que incluyen proteínas proelastasas inmaduras (también denominadas en el presente documento proproteínas elastasas) y proteínas preproelastasas inmaduras (también denominadas en el presente documento preproproteínas elastasas).

30 Las elastasas preferidas de la invención son elastasas pancreáticas tipo I, por ejemplo, elastasa pancreática tipo I humana y elastasa pancreática tipo I porcina. Las elastasas pancreáticas tipo I se denominan algunas veces en el presente documento "elastasa-1", "elastasa I", "elastasa tipo 1", "elastasa de tipo 1" o "ELA-1". La elastasa pancreática tipo I humana también se denomina en el presente documento hELA-1 o ELA-1 humana, y la elastasa pancreática tipo I porcina también se denomina en el presente documento pELA-1 o ELA-1 porcina.

35 Una proteína elastasa madura de la invención tiene normalmente una secuencia de aminoácidos codificada por un gen elastasa que se produce naturalmente o una variante de tal secuencia. Variantes de secuencia preferidas, que incluyen variantes que contienen sustituciones de aminoácidos, se describen en el presente documento. Una proteína proelastasa es un precursor ampliamente inactivo de una proteína elastasa madura, y una proteína preproelastasa contiene además una secuencia señal para la secreción de proteína. Pre y pro secuencias de las proteínas elastasas de la invención son normalmente no nativas para los genes de elastasa que codifican las proteínas elastasas maduras de la invención. Así, en un sentido, las proteínas elastasas inmaduras de la invención son proteínas "quiméricas", con sus porciones maduras codificadas por un gen de elastasa que se produce naturalmente y sus porciones inmaduras codificadas por secuencias de genes de no elastasa.

40 Para facilidad de referencia, las proteínas elastasas de la invención y sus componentes de la secuencia central se representan en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 2, los residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de proelastasa que están en el extremo N para el enlace de escisión (es decir, el enlace que se escinde para dar proteína elastasa madura) se designan en el presente documento PX,...P5, P4, P3, P2 y P1 en la que P1 está inmediatamente en el extremo N para el enlace de escisión, mientras que los residuos de aminoácidos localizados en el extremo C para el enlace de escisión (y con respecto al extremo N) de la proteína elastasa madura se designan P1', P2', P3',...PX' en la que P1' está inmediatamente en el extremo C para el enlace de escisión y representa el residuo de aminoácido del extremo N de la proteína madura.

55 La Figura 2 también muestra los siguientes componentes:

(1) SECUENCIA SEÑAL: Una secuencia que aumenta la proporción de moléculas expresadas que son secretadas de la célula. Una secuencia a modo de ejemplo es los aminoácidos 1-22 de SEC ID N°: 50 ó 51.

60 (2) PROPÉPTIDO + ESPACIADOR: Una secuencia de propéptidos opcional, preferentemente una no elastasa (tal como propropéptido de factor α de levadura) que puede incluir adicionalmente opcionalmente una o más secuencias de espaciador (secuencias de propéptidos de factor α de levadura y secuencias de espaciador de Kex2 y STE 13 se representan en la Figura 1B). En una realización específica, las secuencia de propéptidos no incluye un espaciador.

65 (3) PROPÉPTIDO DE ELASTASA: Péptido que, cuando está presente sobre el extremo N de una elastasa, convierte la molécula en inactiva o menos activa con respecto a la proteína elastasa madura

correspondiente. El propéptido de elastasa puede estar contiguo al péptido de activación o puede contener aminoácidos adicionales con respecto al péptido de activación. Secuencias de propéptidos de elastasa a modo de ejemplo son los aminoácidos 1-10 de SEC ID N°: 64 y 69.

(4) PÉPTIDO DE ACTIVACIÓN: Usado indistintamente en el presente documento con "secuencia de activación", un péptido de activación es un componente de, y puede ser contiguo a, el propéptido de elastasa. Como se muestra en la Figura 2, el péptido de activación contiene los residuos de aminoácidos P10 a P1. Una secuencia consenso de péptido de activación a modo de ejemplo es SEC ID N°: 80; otros ejemplos de secuencias de péptidos de activación son SEC ID N°: 23, 72 y 73.

(5) SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO: Una secuencia de reconocimiento es un componente del propéptido de elastasa. Como se muestra en la Figura 2, la secuencia de reconocimiento contiene los residuos de aminoácidos P3 a P1. Secuencias consenso de secuencias de reconocimiento a modo de ejemplo son SEC ID N°: 11-13 y 93, y una secuencia de reconocimiento a modo de ejemplo es SEC ID N°: 20.

(6) DOMINIO DE ESCISIÓN: Una región en la proteína proelastasa que extiende el enlace de escisión. Como se muestra en la Figura 2, el dominio de escisión contiene los residuos de aminoácidos P5 a P3'. Secuencias de dominio de escisión a modo de ejemplo son SEC ID N°: 42, 43, 48, 49, 53, 53, 54 y 55.

(7) SITIO DE ESCISIÓN: Otra región en la proteína proelastasa que también extiende el enlace de escisión. Como se muestra en la Figura 2, el sitio de escisión contiene los residuos de aminoácidos P4 a P4'. Una secuencia de sitio de escisión a modo de ejemplo es SEC ID N°: 27.

(8) PROTEÍNA PREPROELASTASA: Una proteína que puede comprender todas las partes del componente. Una proteína preproelastasa a modo de ejemplo puede comprender péptidos de SEC ID N°: 50, 51, 96 ó 97, seguido de una proteína operativamente ligada de SEC ID N°: 64 o SEC ID N°: 69.

(9) PROTEÍNA PROELASTASA: Una proteína que comprende proteína elastasa madura, un propéptido de elastasa y el propéptido opcional y secuencias de espaciador. Secuencias de proelastasa a modo de ejemplo son SEC ID N°: 64 y 69.

(10) PROTEÍNA ELASTASA MADURA: Una proteína que cuando se procesa adecuadamente muestra actividad de elastasa. Secuencias maduras a modo de ejemplo son SEC ID N°: 1 (humana) y SEC ID N°: 39 (porcina).

Los componentes de la proteína elastasa pueden considerarse unidades estructurales modulares de las proteínas elastasas, proteínas proelastasas y proteínas preproelastasas. Por ejemplo, la presente invención proporciona una proteína proelastasa que comprende la secuencia de un propéptido de elastasa y una proteína elastasa madura. El propéptido de elastasa puede contener un péptido de activación. El propéptido de elastasa también puede contener una secuencia de reconocimiento de elastasa. La presente invención también proporciona una proteína proelastasa que comprende un dominio de escisión o sitio de escisión en la región que atraviesa la unión entre el propéptido de elastasa y la proteína elastasa madura. Las proteínas proelastasas pueden comprender además una secuencia señal para la secreción. Tales proteínas se consideran proteínas preproelastasas. Las proteínas preproelastasas pueden comprender además un propéptido de factor alfa de levadura y opcionalmente una secuencia de espaciador entre la secuencia señal y el propéptido de elastasa. Las proteínas elastasas de la invención también pueden contener componentes, además de los componentes modulares del núcleo ilustrados en la Figura 2. Por ejemplo, una proteína elastasa puede contener una marca de epítipo o una marca de histidina para la purificación. Debe también observarse que las proteínas elastasas de la invención no necesitan contener todos los componentes representados en la Figura 2, pero generalmente contienen al menos uno de los componentes (incluyendo, a modo de ejemplo pero no limitación, una elastasa madura o una secuencia de proelastasa) representados en la Figura 2. Proteínas elastasas a modo de ejemplo de la invención se exponen en las realizaciones 1-12, 28-39 y 68-69 en la Sección 8 más adelante, que incluyen proteínas proelastasas tipo I a modo de ejemplo como se exponen en las realizaciones 13-27 en la Sección 8 más adelante.

Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas elastasas de la invención, procedimientos para producir y purificar las proteínas, células recombinantes y sobrenadantes de cultivo celular, composiciones que comprenden proteínas elastasas (por ejemplo, composiciones farmacéuticas, dosificaciones unitarias, formulaciones), el uso de las proteínas para fines terapéuticos y kits que comprenden las proteínas, formulaciones, composiciones farmacéuticas y dosis unitarias están englobados en el presente documento. Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas elastasas de la invención se ejemplifican en las realizaciones 40-67 en la Sección 8 más adelante, que incluyen vectores (véanse, por ejemplo, las realizaciones 70-72). También se ejemplifican en la Sección 8 células recombinantes (véanse, por ejemplo, las realizaciones 73-84), sobrenadantes de células que contienen proteínas elastasas (véase, por ejemplo, la realización 88). Los procedimientos para producir proteínas elastasas se ejemplifican en las realizaciones 89-224, 261-276 y 347-373 en la Sección 8. Los procedimientos para producir formulaciones de elastasa se ejemplifican en las realizaciones 225-260 en la Sección 8. Los procedimientos de producción de composiciones farmacéuticas se ejemplifican en las realizaciones 374-385 en la Sección 8. Las composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas elastasas se ejemplifican en las realizaciones 277-313 y 386 en la Sección 8, y las dosificaciones unitarias se ejemplifican en las realizaciones 415-420 en la Sección 8. Las formulaciones de proteínas elastasas se ejemplifican en las realizaciones 324-346 en la Sección 8. El uso de las proteínas elastasas para fines terapéuticos se ejemplifica en las realizaciones 387-414 en la Sección 8. Los kits que comprenden las proteínas se ejemplifican en la Sección 8 a modo de las realizaciones 421-424.

Diversos aspectos de la invención con respecto a composiciones farmacéuticas y/o proteínas proelastasas con SEC ID N°: 64 y 69 se ejemplifican como realizaciones 425-472 en la Sección 8 más adelante; sin embargo, tales realizaciones son aplicables a otras secuencias de proteínas elastasas y composiciones desveladas en el presente documento.

Los procedimientos de producción descritos en el presente documento frecuentemente incluyen una etapa de activación, por lo que el péptido de activación se elimina de la secuencia de proelastasa/se separa de la secuencia de elastasa madura, generando así una proteína elastasa madura. Las etapas de activación descritas en el presente documento pueden ser etapas de auto-activación, es decir, llevada a cabo por una actividad de elastasa, o etapa de no auto-activación, es decir, mediada por no elastasa, por ejemplo, llevada a cabo por tripsina.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína elastasa (que incluye, pero no se limita a, una proteína de una cualquiera de SEC ID N°: 6-9, 64-69, 88-91 ó 98-103) que comprende (i) un propéptido de elastasa que comprende una secuencia de activación de péptidos que comprende una secuencia de reconocimiento de elastasa operativamente ligada a (ii) la secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene actividad de elastasa. La proteína comprende opcionalmente además una secuencia señal, tal como un péptido señal de factor α de levadura, y se ejemplifica por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 34, operativamente ligada a dicho propéptido de elastasa. El factor α se denomina algunas veces en el presente documento "factor alfa" o "factor de apareamiento alfa" o "factor de apareamiento α ". En ciertas realizaciones específicas, la proteína comprende un propéptido de no elastasa tal como el propéptido de factor α de levadura. En ciertas realizaciones específicas, la proteína puede comprender una o más secuencias de espaciador. Las secuencias de espaciador pueden incluir, pero no se limitan a, sitios de escisión de proteasa Kex2 y STE13. En una realización específica puede usarse un espaciador de Kex2. En otra realización, un espaciador de Kex2 puede ligarse operativamente a espaciadores de STE 13 como se muestra en la Figura 1B. Una secuencia de péptidos señal y una secuencia de propéptidos de no elastasa se ejemplifica por las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 51 ó 97. Un péptido que contiene una secuencia de péptidos señal, una secuencia de propéptidos de no elastasa y una secuencia de espaciador se ejemplifica por las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 50 ó 96.

En otras realizaciones específicas, la secuencia señal es una secuencia señal de la secreción de mamífero, tal como una secuencia señal de elastasa tipo I porcina o humana (usada indistintamente con una elastasa pancreática tipo I).

Preferentemente, la secuencia de reconocimiento de elastasa es una secuencia de reconocimiento de elastasa pancreática tipo I.

En realizaciones específicas, la proteína que tiene actividad de elastasa tipo I es una elastasa tipo I humana madura, por ejemplo, una proteína de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, 4, 5, 84 u 87.

La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que comprende (i) una secuencia señal operable en *Pichia pastoris* operativamente ligada a (ii) una secuencia de activación (que incluye, pero no se limita a, una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 23, 72, 73 u 80) que comprende una secuencia de reconocimiento de proteasa (que incluye, pero no se limita a, una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID N°: 11-23 y 93 que a su vez está operativamente ligada a (iii) la secuencia de aminoácidos de una elastasa tipo I humana madura. En una realización preferida, la secuencia de reconocimiento de proteasa es una secuencia de reconocimiento de elastasa tipo I humana, lo más preferentemente una secuencia de reconocimiento de elastasa de SEC ID N°: 20.

También se proporcionan proteínas proelastasas (que comprenden opcionalmente una secuencia señal y que así representan proteínas preproelastasas) y proteínas elastasas maduras codificadas por los ácidos nucleicos de la invención, ya que son composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas, formulaciones y dosificaciones unitarias) que comprende dichas proteínas elastasas maduras.

En una realización preferida, la proteína proelastasa o proteína elastasa madura no tiene un residuo de metionina del extremo N. En otra realización, sin embargo, la proteína proelastasa o proteína elastasa madura tiene un residuo de metionina del extremo N.

La siguiente Tabla 1 resume los identificadores de secuencia usados en la presente memoria descriptiva. Proteínas preferidas de la invención comprenden o consisten en cualquiera de SEC ID N°: 1-32, 34, 37-73, 77, 78, 82-92 y 98-105 enumeradas en la siguiente Tabla 1, o están codificadas en parte o completamente por las secuencias de nucleótidos de SEC ID N°: 33 y SEC ID N°: 81.

Tabla 1: Resumen de SEC ID N° de aminoácidos y nucleótidos.

	MOLECULA	NUCLEOTIDO OR AMINOACIDO	SEQ ID NO
5	Elastasa I humana madura, incluyendo primera "valina," con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	1
10	Elastasa I humana madura, menos primera "valina," with possible polymorphism at position 220 (V or L) (numbering refers to position in context of preproprotein)	Aminoácido	2
15	Elastasa I humana madura, menos primeras dos "valinas," con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	3
20	Elastasa I humana madura, con la primera "valina" sustituida por "alanina," con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	4
	Elastasa I humana madura (isotipo 2), incluyendo primera "valina"	Aminoácido	5
25	Proteína de elastasa manipulada no. 1 (variante pPROT42), con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	6
30	Proteína de elastasa manipulada no. 2, con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	7
	Proteína de elastasa manipulada no. 3, con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	8
35	Proteína de elastasa manipulada no. 4, con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	9
40	Proteína de elastasa manipulada no.5 (secuencia tripsina activada pPROT24), con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	10
45	Secuencia de reconocimiento de elastasa de consenso 1 (Posiciones Xaa1=P3, Xaa2=P2, Xaa3=P1)	Aminoácido	11
50	Secuencia de reconocimiento de elastasa de consenso 2 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido	12
	Secuencia de reconocimiento de elastasa de consenso 3 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido	13
55	Secuencia de reconocimiento de elastasa 1 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido	14
60	Secuencia de reconocimiento de elastasa 2 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido	15
65	Secuencia de reconocimiento de elastasa 3 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido	16

ES 2 627 066 T3

	Secuencia de reconocimiento de la tripsina del tipo salvaje (pPROT24) (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido	17
5	Secuencia de reconocimiento de elastasa 5 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido	18
	Secuencia de reconocimiento de elastasa 6 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido	19
10	Secuencia de reconocimiento de elastasa 7 (Posiciones P3-P2-P1 de Variantes 48 y 55)	Aminoácido	20
	Secuencia de reconocimiento de elastasa 8	Aminoácido	21
	Secuencia de activación de elastasa humana 1	Aminoácido	22
15	Secuencia de activación de elastasa humana 2	Aminoácido	23
	Sitio de escisión pro-PROT-201	Aminoácido	24
	Sitio de escisión pPROT40	Aminoácido	25
20	Sitio de escisión pPROT41	Aminoácido	26
	Sitio de escisión pPROT42	Aminoácido	27
	Sitio de escisión pPROT43	Aminoácido	28
25	Sitio de escisión pPROT44	Aminoácido	29
	Sitio de escisión pPROT45	Aminoácido	30
	Sitio de escisión pPROT46	Aminoácido	31
30	Sitio de escisión pPROT47	Aminoácido	32
	Región codificante de una elastasa-1 humana (es decir, elastasa pancreática tipo I humana) (Nº de Entrada NCBI NM 001971)	Nucleótido	33
35	Péptido señal del factor alfa de levadura	Aminoácido	34
	Cebador 20F	Nucleótido	35
	Cebador 24R	Nucleótido	36
40	Variante de Elastasa del Sitio de Escisión pPROT42 P3, con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	37
45	Variante de Elastasa del Sitio de Escisión pPROT42 P2, con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	38
	Elastasa I pancreática porcina madura I (de GenBank Entrada P00772.1)	Aminoácido	39
50	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 40	Aminoácido	40
55	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 41	Aminoácido	41
	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 42	Aminoácido	42
60	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 43	Aminoácido	43
65	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 44	Aminoácido	44

ES 2 627 066 T3

	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 45	Aminoácido	45
5	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 46	Aminoácido	46
	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 47	Aminoácido	47
	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 48	Aminoácido	48
10	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 49	Aminoácido	49
	Péptido señal, propéptido, y secuencia espaciadora 1 del factor de acoplamiento alfa de levadura	Aminoácido	50
15	Péptido señal y secuencia del propéptido 2 del factor de acoplamiento alfa de levadura	Aminoácido	51
	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 52	Aminoácido	52
20	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 53	Aminoácido	53
	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 54	Aminoácido	54
	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 55	Aminoácido	55
25	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 56	Aminoácido	56
	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 57	Aminoácido	57
30	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 58	Aminoácido	58
	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 59	Aminoácido	59
	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 60	Aminoácido	60
35	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 61	Aminoácido	61
	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 62	Aminoácido	62
40	Dominio de Escisión del Propéptido de la Variante de Elastasa 63	Aminoácido	63
	Proenzima de Elastasa con Dominio de Escisión variante 48, con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	64
45	Proenzima de Elastasa con Dominio de Escisión variante 49, con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	65
	Proenzima de Elastasa con Dominio de Escisión variante 52, con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	66
50	Proenzima de Elastasa con Dominio de Escisión variante 53, con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	67
	Proenzima de Elastasa con Dominio de Escisión variante 54, con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	68
60	Proenzima de Elastasa con Dominio de Escisión variante 55, con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	69
65	Elastasa del Tipo Salvaje + Variante de Escisión AlaArg, con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	70

5	Elastasa del Tipo Salvaje Elastase + Variante de Escisión Arg, con posible polimorfismo en la posición 220 (V o L) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	71
	Péptido de Activación de la Elastasa Humana Variante 48	Aminoácido	72
	Péptido de Activación de la Elastasa Humana Variante 55	Aminoácido	73
10	Secuencia de Consenso del Dominio de Escisión de la Elastasa Humana; se corresponde a los residuos P5, P4, P3, P2, P1, P'1, P'2, y P'3 de un dominio de escisión de la elastasa	Aminoácido	74
15	Cebador de Mutagénesis por PCR para la construcción del pPROT3	Ácido Nucleico	75
	Cebador de Mutagénesis por PCR o construcción del pPROT3	Ácido Nucleico	76
20	Variante C-terminal de ELA1 Madura de Talas y otros, 2000, Invest Dermatol. 114(1):165-70.	Aminoácido	77
	Variantes de ELA-1 Maduras, con posibles polimorfismos en las posiciones 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	78
25	Variantes del péptido de activación (tipo salvaje, escindible por tripsina), con posibles polimorfismos en la posición 10 (Q o H) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	79
	Secuencia de "consenso" del péptido de activación	Aminoácido	80
30	Región codificante de ELA-1.2A	Aminoácido	81
	Producto de la Traducción de ELA-1.2A (Secuencia pPROT24 activada por tripsina)	Aminoácido	82
35	Producto de la Traducción de ELA-1.2A (Secuencia pPROT24 activada por tripsina), con posibles polimorfismos en las posiciones 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	83
40			
45	Elastasa I humana madura, incluyendo primera "valina," con posibles polimorfismos en las posiciones 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	84
	Elastasa I humana madura, menos priemra "valina," con posibles polimorfismos en las posiciones 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	85
50	Elastasa I humana madura, menos las dos primeras "valinas," con posibles polimorfismos en las posiciones 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	86
55	Elastasa I humana madura, con la primera "valina" sustituida por "alanina," con posibles polimorfismos en las posiciones 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	87
60	Proproteína no. 1 de elastasa manipulada (variante pPROT42), con posibles polimorfismos en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	88
65	Proproteína no.2 de elastasa manipulada, con posibles polimorfismos en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	89

ES 2 627 066 T3

5	Proproteína no.3 de elastasa manipulada, con posibles polimorfismos en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	90
10	Proproteína no.4 de elastasa manipulada, con posibles polimorfismos en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	91
15	Proproteína no.5 de elastasa manipulada (secuencia activada por tripsina pPROT24), con posibles polimorfismos en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	92
20	Secuencia de reconocimiento de la elastasa de consenso 4 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido	93
25	Elastasa Variante del Sitio de Escisión pPROT42 P3, con posibles polimorfismos en las posiciones 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	94
30	con posibles polimorfismos en las posiciones 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	95
35	Péptido señal, propéptido, y secuencia espaciadora 1 del factor de acoplamiento alfa de levadura secuencia	Aminoácido	96
40	Péptido señal y secuencia del propéptido 2 del factor de acoplamiento alfa de levadura	Aminoácido	97
45	Proenzima de Elastasa con Dominio de Escisión variante 48 Genérico para la SEQ ID NO:64, con posibles polimorfismos en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	98
50	Proenzima de Elastasa con Dominio de Escisión variante 49, con posibles polimorfismos en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	99
55	Proenzima de Elastasa con Dominio de Escisión variante 52, con posibles polimorfismos en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	100
60	Proenzima de Elastasa con Dominio de Escisión variante 53, con posibles polimorfismos en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	101
65	Proenzima de Elastasa con Dominio de Escisión variante 54, con posibles polimorfismos en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	102
	Proenzima de Elastasa con Dominio de Escisión variante 55, con posibles polimorfismos en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	103

5	Elastasa del Tipo Salvaje + Variante de escisión AlaArg, con posibles polimorfismos en las posiciones 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	104
10	Elastasa del Tipo Salvaje + Variante de Escisión Arg, con posibles polimorfismos en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	105
15	Variante de escisión de la elastasa I humana madura que carece de los primeros cuatro Aminoácidos, con posibles polimorfismos en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	106
20	Variante de escisión de la elastasa I humana madura que carece de los primeros seis Aminoácidos, con posibles polimorfismos en las posiciones 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	107
25	Variante de escisión de la elastasa I humana madura que carece de los primeros nueve Aminoácidos, con posibles polimorfismos en las posiciones 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (la numeración se refiere a la posición en el contexto de la preproteína)	Aminoácido	108
30	Secuencia de Ácidos Nucleicos de la Figura 1A	Ácido Nucleico	109
	Secuencia de Aminoácidos de la Figura 1A	Aminoácido	110
	Secuencia de Ácidos Nucleicos de la Figura 1B	Ácido Nucleico	111
	Secuencia de Aminoácidos de la Figura 1B	Aminoácido	112
35	Secuencia de Ácidos Nucleicos de la Figura 13	Ácido Nucleico	113
	Secuencia de Aminoácidos de la Figura 14	Aminoácido	114
40	Secuencia del dominio de escisión de la pPROT101-24-V activada por tripsina	Aminoácido	115
	Secuencia del dominio de escisión de la pPROT101-42-V auto-activada	Aminoácido	116
	Secuencia del dominio de escisión de la pPROT101-49-V auto-activada	Aminoácido	117
45	Secuencia del dominio de escisión de la pPROT101-55L-V autoactivada	Aminoácido	118

Hay al menos 5 polimorfismos confirmados en proteína elastasa tipo I humana, en las posiciones 10 (Q o H); 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R). La proteína de longitud completa (preproelastasa) tiene 258 aminoácidos de longitud. Los 8 primeros aminoácidos se corresponden con la secuencia señal o de "pre" péptidos que se escinde para generar una proproteína inactiva, y otra secuencia de "pro" péptidos (que comprende o que consiste en 10 aminoácidos correspondientes a un péptido de activación) se escinden para generar la proteína madura activa. Así, el polimorfismo en la posición 10 está presente en la proproteína, pero no en la proteína madura.

Por consiguiente, en la Tabla 2 a continuación se presentan todas las posibles combinaciones de los 5 polimorfismos de elastasa tipo 1 humana. La presente invención proporciona proteínas preproelastasas y proelastasas (que incluyen, pero no se limitan a, las proteínas preproelastasas y proelastasas de variante descritas en el presente documento), tales como las proteínas ejemplificadas en las realizaciones 1-39 y 68-69 o las proteínas obtenidas u obtenibles mediante el procedimiento de una cualquiera de realizaciones 89-224, 261-276 y 347- 373 en la Sección 8, que comprende cualquiera de las combinaciones de polimorfismos expuestas en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2: Variantes de proteínas elásticas (pre-pro) y proelásticas inmaduras tipo I humanas. La numeración de posiciones se refiere a la posición en el contexto de la preproteína de elastasa tipo I humana nativa.

Posición	10	44	59	220	243
Realización	Q o H	W o R	M o V	V o L	Q o R
1.	Q	W	M	V	Q
2.	Q	W	M	V	R
3.	Q	W	M	L	Q
4.	Q	W	V	V	Q
5.	Q	R	M	V	Q
6.	Q	W	M	L	R
7.	Q	W	V	L	Q
8.	Q	R	V	V	Q
9.	Q	W	V	V	R
10.	Q	R	M	L	Q
11.	Q	R	M	V	R
12.	Q	R	V	L	Q
13.	Q	R	V	V	R
14.	Q	R	M	L	R
15.	Q	W	V	L	R
16.	Q	R	V	L	R
17.	H	W	M	V	Q
18.	H	W	M	V	R
19.	H	W	M	L	Q
20.	H	W	V	V	Q
21.	H	R	M	V	Q
22.	H	W	M	L	R
23.	H	W	V	L	Q
24.	H	R	V	V	Q
25.	H	W	V	V	R
26.	H	R	M	L	Q
27.	H	R	M	V	R
28.	H	R	V	L	Q
29.	H	R	V	V	R
30.	H	R	M	L	R
31.	H	W	V	L	R
32.	H	R	V	L	R

Además, en la Tabla 3 a continuación se presentan todas las posibles combinaciones de los 4 polimorfismos de elastasa tipo I humana que pueden estar presentes en una proteína elastasa madura. La presente invención proporciona proteínas elásticas maduras (que incluyen, pero no se limitan a, las proteínas elásticas maduras de variante descritas en el presente documento), tales como las proteínas elásticas maduras obtenidas u obtenibles mediante el procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 89-224, 261-276 y 347-373 en la Sección 8, que

comprende cualquiera de las combinaciones de polimorfismos expuestas en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Variantes de proteínas elastasas tipo I humanas maduras. La numeración de posiciones se refiere a la posición en el contexto de la preproteína de elastasa tipo I humana nativa.

Posición	44	59	220	243
Realización	W o R	M o V	V o L	Q o R
1.	W	M	V	Q
2.	W	M	V	R
3.	W	M	L	Q
4.	W	V	V	Q
5.	R	M	V	Q
6.	W	M	L	R
7.	W	V	L	Q
8.	R	V	V	Q
9.	W	V	V	R
10.	R	M	L	Q
11.	R	M	V	R
12.	R	V	L	Q
13.	R	V	V	R
14.	R	M	L	R
15.	W	V	L	R
16.	R	V	L	R

Las elastasas tipo I maduras de la invención pueden purificarse, por ejemplo, para su uso en composiciones farmacéuticas. En las realizaciones específicas, las elastasas son al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% puras.

Las elastasas tipo I maduras de la invención tienen preferentemente una actividad específica superior a 1, superior a 5, superior a 10, superior a 20, superior a 25, o superior a 30 U/mg de proteína, como se ha determinado midiendo la tasa de hidrólisis del sustrato de péptidos pequeños N-succinil-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilida (SLAP), que se cataliza mediante la adición de elastasa. Una unidad de actividad se define como la cantidad de elastasa que cataliza la hidrólisis de 1 micromol de sustrato por minuto a 30 °C y la actividad específica se define como la actividad por mg de proteína elastasa (U/mg). Preferentemente, una elastasa tipo I humana madura tiene una actividad específica dentro de un intervalo en el que el límite inferior es 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 ó 20 U/mg de proteína y en el que el límite superior es, independientemente, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ó 50 U/mg de proteína. En realizaciones a modo de ejemplo, la actividad específica está en el intervalo de 1 a 40 U/mg de proteína, de 1 a 5 U/mg de proteína, de 2 a 10 U/mg de proteína, de 4 a 15 U/mg de proteína, de 5 a 30 U/mg de proteína, de 10 a 20 U/mg de proteína, de 20 a 40 U/mg de proteína, o cualquier intervalo cuyos límites superior e inferior estén seleccionados de cualquiera de los valores anteriores. Una elastasa tipo I porcina madura tiene preferentemente una actividad específica dentro de un intervalo en el que el límite inferior es 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 ó 75 U/mg de proteína y en el que el límite superior es, independientemente, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 75, 90, 95 ó 100 U/mg de proteína. En realizaciones a modo de ejemplo, la actividad específica de la elastasa porcina está en el intervalo de 10 a 50 U/mg de proteína, de 20 a 60 U/mg de proteína, de 30 a 75 U/mg de proteína, de 30 a 40 U/mg de proteína, de 20 a 35 U/mg de proteína, de 50 a 95 U/mg de proteína, de 25 a 100 U/mg de proteína, o cualquier intervalo cuyos límites superior e inferior estén seleccionados de cualquiera de los valores anteriores.

Por consiguiente, ciertos aspectos de la presente invención se refieren a composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, formulaciones de elastasa y dosificaciones unitarias, tales como aquellas ejemplificadas en las realizaciones 277-314, 346, 386 y 415-420, o aquellas obtenidas u obtenibles mediante el procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 261-276 y 374-385 en la Sección 8 más adelante.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden proteínas elastasas activadas por tripsina, por ejemplo, proteínas activadas por tripsina preparadas por cualquiera de los procedimientos desvelados en el

presente documento. En otras realizaciones, las composiciones comprenden proteínas elastasas autoactivadas, por ejemplo, proteínas elastasas autoactivadas preparadas por cualquiera de los procedimientos desvelados en el presente documento. En ciertos aspectos, una composición de la invención se caracteriza por al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete de las siguientes propiedades: (a) la composición está libre de tripsina; (b) la composición está sustancialmente libre de tripsina; (c) la composición está libre de cualquier proteína que consista en SEC ID N°: 70 y 71; (d) la composición está sustancialmente libre de cualquier proteína que consista en SEC ID N°: 2 y 3; (e) la composición está libre de proteínas bacterianas; (f) la composición está sustancialmente libre de proteínas bacterianas; (g) la composición está libre de proteínas de mamífero distintas de dicha proteína elastasa madura; (h) la composición está sustancialmente libre de proteínas de mamífero distintas de dicha proteína elastasa madura; (i) la composición está libre o sustancialmente libre de una, dos, tres o las cuatro proteínas que consisten en SEC ID N°: 85, 86, 94 y 95; (j) la composición está libre o sustancialmente libre de una, dos o las tres proteínas que consisten en SEC ID N°: 106, 107 y 108; (k) la composición contiene niveles farmacéuticamente aceptables de endotoxinas (por ejemplo, 10 UE/mg de elastasa o menos, o 5 UE/mg de elastasa o menos); (l) la proteína elastasa madura en la composición se caracteriza por una actividad específica de 1 a 40 U/mg de proteína o cualquier otro intervalo de actividad específica desvelado en el presente documento; (m) la actividad de tripsina en dicha composición se corresponde con menos de 4 ng por 1 mg de proteína elastasa madura o cualquier otro intervalo de actividad de tripsina desvelado en el presente documento; (n) la composición comprende polisorbato-80; (o) la composición comprende dextrano; (p) la composición comprende iones sodio, iones potasio, iones fosfato, iones cloruro y polisorbato-80; (q) la composición comprende iones sodio, iones potasio, iones fosfato, iones cloruro y dextrano; (r) la composición comprende iones sodio, iones potasio, iones fosfato, iones cloruro, polisorbato-80 y dextrano; (s) la proteína elastasa madura en dicha composición muestra una cantidad de estabilidad desvelada en el presente documento, por ejemplo, mantiene del 60% al 100% su actividad específica después de al menos una semana de almacenamiento a 4 °C, después de al menos un mes de almacenamiento a 4 °C, después de al menos dos meses de almacenamiento a 4 °C, después de al menos tres meses de almacenamiento a 4 °C, o después de al menos seis meses de almacenamiento a 4 °C; y (t) la composición comprende una dosificación unitaria de 0,0033 mg a 200 mg de dicha proteína elastasa madura, o cualquier otra dosificación unitaria de proteína elastasa madura desvelada en el presente documento.

En ciertos aspectos, la composición se caracteriza por al menos tres características, al menos cuatro características o cinco características independientemente seleccionadas de los siguientes grupos (i) a (v):

- (i) (a), (b) o (m)
- (ii) (e) o (f)
- (iii) (g) o (h)
- (iv) (k)
- (v) (l)

En realizaciones específicas, dos de dichas al menos tres o al menos dichas cuatro características están seleccionadas de los grupos (i) y (iv) o (v). En otras realizaciones, tres de al menos dichas cuatro características están seleccionadas de los grupos (i), (iv) y (v).

En realizaciones específicas, la presente invención proporciona una composición, que incluye pero no se limita a, una composición farmacéutica, formulación de elastasa o dosificación unitaria, que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de elastasa tipo I humana que está libre de tripsina y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, la presente invención proporciona una composición que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de elastasa tipo I humana que está sustancialmente libre de tripsina y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En las realizaciones específicas, la elastasa tipo I humana y/o la composición comprende menos de 5 ng/ml de actividad de tripsina, menos de 4 ng/ml de actividad de tripsina, menos de 3 ng/ml de actividad de tripsina, menos de 2 ng/ml de actividad de tripsina, o menos de 1,56 ng/ml de actividad de tripsina. En los ejemplos anteriores, los ng/ml de actividad de tripsina pueden ensayarse en una composición de elastasa tipo I humana líquida o preparación que contiene 1 mg/ml de proteína elastasa tipo I humana. Así, las actividades de tripsina también pueden describirse en términos de miligramos de proteína elastasa, por ejemplo, menos de 3 ng de actividad de tripsina/mg de proteína elastasa, menos de 1,56 ng de actividad de tripsina/mg de proteína elastasa, etc. La presente invención proporciona además una composición que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de elastasa tipo I humana y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que la composición comprende menos de 5 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, menos de 4 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, menos de 3 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, menos de 2 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, o menos de 1,56 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa.

La presente invención proporciona además procedimientos de mejora de la calidad de proteínas elastasas maduras producidas por procedimientos de activación de tripsina (por ejemplo, los procedimientos de la realización 145 en la Sección 8 más adelante), que comprenden purificar la proteína elastasa madura sobre una columna de resina Macro-Prep High S. Se encontró por los presentes inventores que las proteínas elastasas maduras purificadas sobre una columna de resina Macro-Prep High S dan composiciones de elastasa con niveles de actividad de tripsina correspondientes a 20-25 ng de actividad de tripsina/mg de proteína elastasa, con respecto a la purificación sobre una columna Poros (poli(estireno-divinilbenceno)) que da composiciones de elastasa con niveles de actividad de

tripsina correspondientes a aproximadamente 1000 ng de actividad de tripsina/mg de proteína elastasa. La presente invención proporciona además composiciones de elastasa que comprenden proteínas elastasas maduras producidas purificando proteínas elastasas activadas por tripsina sobre una columna de resina Macro-Prep High S. La columna de resina Macro-Prep High S está disponible de Biorad (Hercules, CA), según el cual una columna de metacrilato rígida soporta con poco encogimiento e hinchamiento. Pueden usarse otras columnas de intercambio catiónico similares de la misma clase y/o con el mismo tamaño de perla (aproximadamente 50 µm), tal como pueden usarse adecuadamente otras columnas de metacrilato.

Otros aspectos de la presente invención se refieren a composiciones que incluyen, pero no se limitan a, composiciones farmacéuticas, formulaciones de elastasa o dosificaciones unitarias, que comprenden elastasa pancreática tipo I porcina. En las realizaciones específicas, la presente invención proporciona una composición que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de elastasa pancreática tipo I porcina que está libre de tripsina y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, la presente invención proporciona una composición que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de elastasa pancreática tipo I porcina que está sustancialmente libre de tripsina y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En las realizaciones específicas, la elastasa pancreática tipo I porcina y/o la composición comprende menos de 100 ng/ml de actividad de tripsina, menos de 75 ng/ml de actividad de tripsina, menos de 50 ng/ml de actividad de tripsina, menos de 25 ng/ml de actividad de tripsina, menos de 15 ng/ml de actividad de tripsina, menos de 10 ng/ml de actividad de tripsina, menos de 5 ng/ml de actividad de tripsina, menos de 4 ng/ml de actividad de tripsina, menos de 3 ng/ml de actividad de tripsina, menos de 2 ng/ml de actividad de tripsina, o menos de 1,56 ng/ml de actividad de tripsina. En los ejemplos anteriores, los ng/ml de actividad de tripsina pueden ensayarse en una composición de elastasa pancreática tipo I porcina líquida o preparación que contiene 1 mg/ml de elastasa pancreática tipo I porcina. Así, las actividades de tripsina también pueden describirse en términos de miligramos de proteína elastasa, por ejemplo, menos de 25 ng de actividad de tripsina/mg de proteína elastasa, menos de 5 ng de actividad de tripsina/mg de proteína elastasa, etc. La presente invención proporciona además una composición que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de elastasa tipo I porcina y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que la composición comprende menos de 100 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, menos de 75 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, menos de 50 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, menos de 25 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, menos de 15 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, menos de 10 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, menos de 5 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, menos de 4 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, menos de 3 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, menos de 2 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa, o menos de 1,56 ng de actividad de tripsina por mg de elastasa.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona composiciones de proteínas elastasas, tales como proteínas elastasas maduras que incluyen, pero no se limitan a, composiciones farmacéuticas, formulaciones de elastasa o dosificaciones unitarias, que están libres de variantes del extremo N correspondientes a una, dos, tres o las cuatro de SEC ID N°: 70, 71, 104, 105. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de elastasa tipo I humana madura (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, composición farmacéutica que está libre de cualquier proteína con SEC ID N°: 70, 71, 104, 105.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona una composición que incluye, pero no se limita a, una composición farmacéutica, una formulación de elastasa o dosificación unitaria, que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de elastasa tipo I humana que está libre o sustancialmente libre de proteínas de variante que contienen aminoácidos adicionales específicos sobre el extremo N de la proteína elastasa madura (SEC ID N°: 37, 38, 70, 71, 94, 95, 104, 105) y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, la presente invención proporciona una composición que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de elastasa tipo I humana que está libre o sustancialmente libre de proteínas de variante que carecen de aminoácidos del extremo N de la proteína elastasa madura (SEC ID N°: 2, 3, 37, 38, 70, 71, 85, 86, 94, 95, 104, 105, 106, 107, 108) y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En las realizaciones específicas, la elastasa tipo I humana y/o la composición comprende menos del 25% de variantes del extremo N, menos del 20% de variantes del extremo N, menos del 15% de variantes del extremo N, menos del 10% de variantes del extremo N, menos del 5% de variantes del extremo N, menos del 4% de variantes del extremo N, menos del 3% de variantes del extremo N, menos del 2% de variantes del extremo N, menos del 1% de variantes del extremo N, menos del 0,5% de variantes del extremo N, 0% de variantes del extremo N, o comprende variantes del extremo N en una cantidad que oscila entre dos cualesquiera de los porcentajes anteriores (por ejemplo, 2%-25% de variantes del extremo N, 0,5%-10% de variantes del extremo N, 5%-15% de variantes del extremo N, 0%-2% de variantes del extremo N, etc.). Como se usa en el presente documento, el término "menos del X% de variantes del extremo N" se refiere a la cantidad de variantes del extremo N como un porcentaje de proteína elastasa total.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona una composición que incluye, pero no se limita a, una composición farmacéutica, una formulación de elastasa o dosificación unitaria, que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de elastasa tipo I humana madura (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, composición farmacéutica que está sustancialmente libre de proteínas bacterianas y/o está sustancialmente libre de proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura. En las realizaciones específicas, la elastasa tipo I humana y/o la composición comprende menos del 25% de proteínas bacterianas y/o proteínas de

mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, menos del 20% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, menos del 15% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, menos del 10% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, menos del 5% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, menos del 4% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, menos del 3% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, menos del 2% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, menos del 1% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, menos del 0,5% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, 0% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, o comprende proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura en una cantidad que oscila entre dos cualesquiera de los porcentajes anteriores (por ejemplo, 2%-25% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, 0,5%-10% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, 5%-15% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, 0%-2% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura, etc.). Como se usa en el presente documento, el término "menos del X% de proteínas bacterianas y/o proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura" se refiere a la cantidad de tales proteínas como un porcentaje de proteína total en una preparación de elastasa o en dicha composición. En ciertas realizaciones, la elastasa representa al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, al menos el 99,5% o al menos el 99,8% de la proteína total en tales composiciones o preparaciones.

En el presente documento también se desvelan procedimientos para el tratamiento y prevención de enfermedades de conductos biológicos, que comprenden la administración de composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas, formulaciones de elastasa o dosificaciones unitarias) que comprenden una elastasa tipo I humana madura purificada de la invención a un paciente en necesidad del mismo.

Adicionalmente se proporcionan vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las proteínas elastasas de la invención ("ácidos nucleicos de la invención"), células huésped manipuladas para expresar los ácidos nucleicos de la invención. En las realizaciones específicas, los vectores comprenden además una secuencia de nucleótidos que regula la expresión de la proteína elastasa. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la invención puede estar operativamente ligada a un promotor inducible por metanol. Otros promotores adecuados se ejemplifican en la Sección 5.3 más adelante.

En una realización específica, la presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marco de lectura abierto, comprendiendo el marco de lectura abierto un péptido señal de factor α de levadura o un péptido señal de elastasa tipo I (por ejemplo, péptido señal de elastasa porcina) operativamente ligado a una secuencia de proproteína elastasa tipo I humana. Opcionalmente, el vector comprende además un promotor inducible por metanol operativamente ligado al marco de lectura abierto.

También se proporcionan células huésped que comprenden los ácidos nucleicos y vectores de la invención. En ciertas realizaciones, el vector o ácido nucleico está integrado en el genoma de la célula huésped; en otras realizaciones, el vector o ácido nucleico es extracromosómico. Una célula huésped preferida es una célula de *Pichia pastoris*. Otras células huésped adecuadas se ejemplifican en la Sección 5.3 más adelante.

En una realización específica, la presente invención proporciona una célula huésped de *Pichia pastoris* genéticamente manipulada para codificar un marco de lectura abierto que comprende un péptido señal de factor α de levadura o un péptido señal de elastasa porcina operativamente ligado a una secuencia de proenzima elastasa tipo I humana. Opcionalmente, el marco de lectura abierto está bajo el control de un promotor inducible por metanol.

La presente invención proporciona además procedimientos para producir una proteína elastasa inmadura o madura de la invención que comprende cultivar una célula huésped manipulada para expresar un ácido nucleico de la invención en condiciones en las que se produce la proteína proelastasa. En ciertas realizaciones también se produce la proteína elastasa madura.

Condiciones de cultivo preferidas para producir la proelastasa y proteína maduras de la invención, particularmente para la célula huésped *Pichia pastoris*, incluyen un periodo de crecimiento a un pH bajo. Normalmente, el pH bajo es 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, o cualquier intervalo entre cualquier par de los valores anteriores. En las realizaciones específicas, el pH bajo es un pH que oscila de 2,0 a 6,0, de 2,0 a 5,0, de 3,0 a 6,0, de 3,0 a 5,0, de 4,0 a 6,0, o de 3,0 a 4,0. Al final del periodo de cultivo, el pH del cultivo puede elevarse, preferentemente a un pH de 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0 o un pH que oscila entre dos cualesquiera de los valores anteriores con el fin de separar o eliminar la secuencia de activación de la proteína elastasa madura. En las realizaciones específicas, el pH del cultivo se eleva a un pH que oscila de 7,5 a 10,0 o 8,0 a 9,0 y lo más preferentemente a un pH de 8,0.

Si la expresión de una proteína proelastasa de la invención está bajo el control de un promotor inducible por

metanol, las condiciones para producir una proteína elastasa inmadura o madura de la invención también pueden comprender un periodo de inducción por metanol.

5 Los procedimientos de producción de elastasa de la invención pueden comprender además la etapa de recuperar la proteína expresada por la célula huésped. En ciertos casos, la proteína recuperada es una proelastasa que comprende la secuencia de activación. En otros casos, la proteína recuperada es una elastasa madura que carece de la secuencia de activación. Bajo ciertas condiciones se recuperan tanto proteínas proelastasas como elastasas maduras.

10 Preferentemente, particularmente cuando se desee evadir la auto-activación de una proelastasa auto-activada, las condiciones de cultivo para la expresión de proelastasa pueden comprender un periodo de crecimiento e inducción a pH bajo. Normalmente, el pH bajo es 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 ó 6,0, o cualquier intervalo entre cualquier par de los valores anteriores. En las realizaciones específicas, el pH bajo es un pH que oscila de 2,0 a 3,0, de 4,0 a 5,0, de 5,0 a 6,0, o de 6,0 a 7,0. En las realizaciones particulares, el pH oscila de 4,0 a 6,0 y es lo más preferentemente un pH de 5,5.

15 Preferentemente, particularmente cuando se desee evadir la auto-activación de una proelastasa auto-activada, las condiciones de cultivo para la expresión de proelastasa comprenden un periodo de crecimiento e inducción en citrato de sodio, succinato de sodio o acetato sódico. En las realizaciones específicas se usa una concentración de 5-50 mM, 7,5-100 mM, 10-15 mM, 50-200 mM, 75-175 mM, 100-150 mM, 75-125 mM, o de cualquier intervalo cuyos límites superior e inferior estén seleccionados de cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, 50-75 mM, 75-100 mM, etc.). En una realización preferida, la concentración de citrato de sodio, succinato de sodio o acetato sódico es 90-110 mM y lo más preferentemente es 100 mM.

25 Adicionalmente, particularmente cuando se desee evadir la auto-activación de una proelastasa auto-activada o auto-degradación por elastasa madura, las condiciones de cultivo para la expresión de una proteína elastasa inmadura pueden comprender un periodo de crecimiento e inducción en el extremo inferior del intervalo de temperatura adecuado para la célula huésped en cuestión. Por ejemplo, si la célula huésped es una célula huésped de *Pichia pastoris*, el intervalo preferido es aproximadamente 22-28 °C. En una realización específica, la célula huésped de *Pichia pastoris* se cultiva a 28 °C.

30 Adicionalmente, particularmente cuando se desee evadir la degradación de proteína por proteasas de célula huésped, las condiciones de cultivo para la expresión de una proteína elastasa inmadura pueden comprender un periodo de crecimiento e inducción en el extremo inferior del intervalo de temperatura adecuado para la célula huésped en cuestión. Por ejemplo, si la célula huésped es una célula huésped de *Pichia pastoris*, el intervalo preferido es aproximadamente 22-28 °C. En una realización específica, la célula huésped de *Pichia pastoris* se cultiva a 28 °C.

35 La activación de una proteína proelastasa auto-activada de la invención puede iniciarse mediante la adición de elastasa extrínseca en una pequeña cantidad (catalítica). En ciertas realizaciones, una cantidad catalítica de elastasa extrínseca representa menos del 10%, menos del 5%, menos del 2%, menos del 1%, menos del 0,5% o menos del 0,1%, en tanto una base molar como de peso molecular, de la elastasa en la muestra a la que se añade la elastasa catalítica.

40 Alternativamente o simultáneamente, la proelastasa auto-activada puede someterse a pH 7 - 11 (lo más preferentemente pH 8), tras lo cual el péptido de activación de proelastasa auto-activada se elimina sin requerir tripsina y produciendo elastasa activa madura. En las realizaciones específicas se añade base Tris a una concentración de 50-200 mM, 75-175 mM, 100-150 mM, 75-125 mM, o cualquier intervalo cuyos límites superior e inferior estén seleccionados de cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, 50-75 mM, 75-100 mM, etc.) durante la etapa de activación. En una realización preferida, la base Tris se añade a una concentración 90-110 mM, lo más preferentemente 100 mM. El pH de la base Tris es preferentemente 7-11; en las realizaciones específicas, la base Tris está a un pH de 7,0-11,0, 7-9, 7,5 a 9,5, 7,5 a 10, 8-10, 8-9, o cualquier intervalo cuyos límites superior e inferior estén seleccionados de cualquiera de los valores anteriores. En una realización preferida, la base Tris está a un pH de 7,5-8,5, lo más preferentemente 8,0.

45 La expresión de una secuencia de elastasa inmadura puede dar en algunos casos una mezcla de proteínas proelastasas y proteínas elastasas maduras, además de proteínas elastasas de variante del extremo N. Así, la presente invención proporciona una composición que comprende al menos dos de (1) una proteína proelastasa, (2) una proteína elastasa madura, y (3) proteínas elastasas de variante del extremo N.

50 Una vez se ha producido una elastasa madura, puede liofilizarse, por ejemplo, para formulaciones farmacéuticas. En una realización a modo de ejemplo, la presente invención proporciona procedimientos de aislamiento de una elastasa tipo I madura liofilizada que comprende las etapas:

60 (a) cultivar una célula huésped, tal como una célula huésped de *Pichia pastoris*, manipulada para expresar una molécula de ácido nucleico que codifica un marco de lectura abierto de preproelastasa en condiciones

en las que el marco de lectura abierto se expresa, en los que, en una realización específica, dicho marco de lectura abierto comprende secuencias de nucleótidos que codifican, en una dirección de 5' a 3' (i) un péptido señal, por ejemplo, un péptido señal operable en *Pichia pastoris*; (ii) una secuencia de activación que comprende una secuencia de reconocimiento de elastasa; y (iii) la secuencia de proteína elastasa tipo I madura, produciendo así una proteína proelastasa;

(b) someter la proteína proelastasa a condiciones de autoactivación, produciendo así una elastasa tipo I madura, en los que las condiciones de autoactivación incluyen, una o una combinación de las siguientes:

(i) cambiar el pH de una disolución (que puede ser un sobrenadante de cultivo celular) que contiene la proteína proelastasa, por ejemplo, a un pH de 6,5-11, preferentemente 8-9;

(ii) purificar la proteína proelastasa, por ejemplo, por cromatografía de intercambio iónico, y someter la disolución a amplia conversión para eliminar variantes del extremo N, produciendo así elastasa tipo I humana madura;

(iii) concentrar la proteína proelastasa (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 12 veces, o un intervalo en el que los límites superior e inferior estén seleccionados independientemente de los anteriores niveles de concentraciones);

(iv) someter la proteína proelastasa a elevada temperatura (por ejemplo, 29 °C, 30 °C, 32 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, o 40 °C, o un intervalo en el que los límites superior e inferior estén seleccionados independientemente de las temperaturas anteriores);

(v) purificar la proteína proelastasa (por ejemplo, usando resina Macro-Prep High S) de un sobrenadante de cultivo celular e incubar una disolución que comprende la proteína proelastasa purificada a temperatura ambiente (por ejemplo, 22 °C a 26 °C) durante un periodo de al menos un día (por ejemplo, un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días o seis días, un intervalo de días en el que los límites superior e inferior estén seleccionados independientemente de los valores anteriores) (esto está influido por la presencia de citrato/acetato, concentración, temperatura y pH en la disolución, y puede determinarse fácilmente por un experto en la materia);

(c) opcionalmente, purificar la elastasa tipo I humana madura, por ejemplo, etapa de cromatografía de intercambio iónico para cromatografía de pulimento; y

(d) liofilizar la elastasa tipo I madura, aislando así una elastasa tipo I humana madura liofilizada. La elastasa tipo I madura es preferentemente una elastasa tipo I humana. En ciertos aspectos, la elastasa tipo I madura liofilizada tiene preferentemente más del 95% de pureza; en las realizaciones específicas, la elastasa tipo I madura liofilizada tiene más del 98% o más del 99% de pureza.

La proteínas elastasas maduras de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Así, en realizaciones a modo de ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento de generación de una composición farmacéutica que comprende una elastasa tipo I humana madura, comprendiendo dicho procedimiento (i) aislar una elastasa tipo I humana madura liofilizada según los procedimientos descritos anteriormente; y (ii) reconstituir la elastasa tipo I humana madura liofilizada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las elastasas tipo I humanas maduras de la invención tienen preferentemente una actividad específica superior a 1, superior a 5, superior a 10, superior a 20, superior a 25, o superior a 30 U/mg de proteína, como se ha determinado midiendo la tasa de hidrólisis del sustrato de péptidos pequeños N-succinil-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilida (SLAP), que se cataliza mediante la adición de elastasa. Una unidad de actividad se define como la cantidad de elastasa que cataliza la hidrólisis de 1 micromol de sustrato por minuto a 30 °C y la actividad específica se define como actividad por mg de proteína elastasa (U/mg). Preferentemente, una elastasa tipo I humana madura de la invención tiene una actividad específica dentro de un intervalo en el que el límite inferior es 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 ó 20 U/mg de proteína y en el que el límite superior es, independientemente, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ó 50 U/mg de proteína. En realizaciones a modo de ejemplo, la actividad específica está en el intervalo de 1-40 U/mg de proteína, 1-5 U/mg de proteína, 2-10 U/mg de proteína, 4-15 U/mg de proteína, 5-30 U/mg de proteína, 10-20 U/mg de proteína, 20-40 U/mg de proteína, o cualquier intervalo cuyos límites superior e inferior estén seleccionados de cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, 1-10 U/mg, 5-40 U/mg, etc.).

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente estables. En las realizaciones específicas, una composición farmacéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica preparada por liofilización y reconstitución como se ha descrito anteriormente) mantiene al menos el 50%, más preferentemente al menos el 60%, y lo más preferentemente al menos el 70% de su actividad específica después de una semana de almacenamiento a 4 °C. En las realizaciones específicas, la composición farmacéutica mantiene al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85% o al menos el 95% de su actividad específica después de reconstitución y una semana de almacenamiento a 4 °C.

La presente invención también proporciona proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos de proproteína elastasa tipo I que contiene una secuencia de dominio de escisión de elastasa. Otros dominios de escisión que pueden usarse en la presente invención son cualquiera de las secuencias descritas por la secuencia de dominio de escisión consenso (SEC ID N°: 74) Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ en la que Xaa₁=P5, Xaa₂=P4, Xaa₃=P3, Xaa₄=P2, Xaa₅=P1, Xaa₆=P'1, Xaa₇=P'2 y Xaa₈=P'3, en la que:

- Xaa₁ es glutamato, histidina, prolina, glicina, asparagina, lisina o alanina u, opcionalmente, un análogo de los mismos;

- Xaa₂ es treonina, alanina, prolina o histidina u, opcionalmente, un análogo de las mismas;
- Xaa₃ es alanina, leucina, isoleucina, metionina, lisina, asparagina o valina u, opcionalmente, un análogo de las mismas, pero preferentemente no es glicina o prolina;
- 5 - Xaa₄ es prolina, alanina, leucina, isoleucina, glicina, valina o treonina u, opcionalmente, un análogo de las mismas;
- Xaa₅ es alanina, leucina, valina, isoleucina o serina, pero no glicina, tirosina, fenilalanina, prolina, arginina, glutamato o lisina u, opcionalmente, un análogo de las mismas;
- Xaa₆ es alanina, leucina, valina, isoleucina o serina u, opcionalmente, un análogo de las mismas;
- Xaa₇ es glicina, alanina o valina u, opcionalmente, un análogo de las mismas; y
- 10 - Xaa₈ es valina, treonina, fenilalanina, tirosina o triptófano u, opcionalmente, un análogo de las mismas.

La presente invención también proporciona un procedimiento de aislamiento de una elastasa tipo I humana madura que comprende: (a) cultivar, bajo condiciones de cultivo, una célula huésped que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proproteína que comprende (i) una secuencia de activación que comprende una secuencia de reconocimiento de tripsina operativamente ligada a (ii) la secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene actividad de elastasa bajo dichas condiciones de cultivo, en el que dichas condiciones de cultivo comprenden un periodo de crecimiento o inducción a pH de 2 a 6; (b) recuperar la proproteína expresada; (c) poner en contacto la proteína recuperada con una cantidad catalítica de tripsina bajo condiciones de pH en las que la tripsina es activa; y (d) aislar elastasa tipo I humana madura. En este procedimiento, la elastasa tipo I humana madura puede consistir esencialmente en SEC ID N^o: 1, 4, 5, 84 u 87. En ciertas realizaciones, las condiciones pueden comprender (a) un periodo de crecimiento o inducción a pH de 4 a 6; (b) un periodo de crecimiento o inducción a 22 °C a 28 °C; o (c) concentraciones de citrato de sodio, succinato de sodio o acetato sódico de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM o una concentración de citrato de sodio es 90 mM a aproximadamente 110 mM en los medios de cultivo de dichas células huésped.

Debe observarse que los artículos indefinidos “un”, “una” y el artículo definidos “el” y “la” se usan en la presente solicitud, como es común en las solicitudes de patente, para indicar uno o más, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Además, el término “o” se usa en la presente solicitud, como es común en las solicitudes de patente, para indicar el disyuntivo “o” o the conjuntivo “y”.

Cualquier discusión de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se han incluido en esta memoria descriptiva es únicamente con el fin de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe tomarse como una admisión de que cualquiera o todas de estas materias formen parte de la base de la técnica anterior o fueran conocimiento general común en el campo relevante a la presente invención como existió en cualquier parte antes de la fecha de prioridad de la presente solicitud.

Las características y ventajas de la invención serán adicionalmente evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones de la misma.

40 **4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Figuras 1A-1B: La **Figura 1A** muestra la secuencia de ELA-1.2A humana sintética (es decir, recombinante). La secuencia de elastasa-1 humana recombinante (es decir, elastasa tipo 1 humana pancreática) contiene una región codificantes de 750 pares de bases. Están subrayados sitios de enzimas de restricción seleccionados. Las sustituciones de base están en texto en negrita doblemente subrayado y los codones que las contienen están doblemente subrayados. Los codones de terminación están recuadrados. La secuencia de propéptidos está en cursiva. La región codificante produce una proteína de 250 aminoácidos. Después de la escisión del propéptido de 10 aminoácidos, la enzima natural resultante tiene 240 aminoácidos. La **Figura 1B** muestra la región de fusión traduccional de pPROT324. Se representa la fusión traduccional entre el vector y la región codificante de ELA-1. La amplificación por PCR de la secuencia de ELA-1 proporcionó la incorporación de los dominios de escisión señal Kex2 y STE13 para dar un producto secretado con un extremo N esperado del primer aminoácido (texto en negrita) de la secuencia de activación (en cursiva).

Figura 2: Un esquema del extremo N al extremo C de los componentes de núcleo (solapantes) de las proteínas elastasas de la invención, en el que los componentes numerados representan: (1) secuencia señal (rayas verticales); (2) secuencia de propéptido/espaciador opcional (ladrillos); (3) propéptido de elastasa (rayas diagonales, sin sombrear y patrón de diamante combinados); (4) péptido de activación (sin sombrear y patrón de diamante combinados); (5) secuencia de reconocimiento (patrón de diamante); (6) dominio de escisión (sin sombrear, patrón de diamante y la porción izquierda de las rayas horizontales); (7) sitio de escisión (sin sombrear, patrón de diamante y la porción izquierda de las rayas horizontales); (8) proteína proelastasa (esquema entero); (9) proteína proelastasa (rayas diagonales, sin sombrear, patrón de diamante y rayas horizontales combinados); y (10) proteína elastasa madura (rayas horizontales). La tabla muestra las designaciones de aminoácido de la región en el esquema que atraviesa la flecha. No está dibujado a escala. La nomenclatura es solo para fines de referencia y no pretende connotar una función, actividad o mecanismo particular.

Figura 3. Diagrama del vector pPROT24-V. “Secreción de factor α ” se refiere a un casete que contiene el péptido y

propéptido señal de factor α de levadura, seguido de un sitio Kex2 y repeticiones de STE13.

Figura 4: Análisis de SDS-PAGE de fracciones de la cromatografía de captura de un cultivo 201-24-266-VU que contiene pro-PRT-201 activada por tripsina. Los números de carril se corresponden con los números de fracciones. Las fracciones 6-18 consisten principalmente en proenzima glucosilada (banda superior) y proenzima no glucosilada (banda inferior). Las fracciones 19-35 consisten principalmente en proenzima no glucosilada. M = marcadores de peso molecular. FT = flujo continuo de la columna.

Figuras 5A-5F: La **Figura 5A** es una tabla de datos de la proproteína auto-activada. Las secuencias de propéptidos se enumeran en la primera columna. La SDS-PAGE de sobrenadantes después de 1, 2 y 3 días de inducción (carriles 1, 2 y 3, respectivamente) se muestra en la segunda columna. Los rendimientos de proproteína relativa basados en SDS-PAGE se enumeran en la tercera columna. Las estabildades relativas de la proproteína durante 3 días de inducción basada en SDS-PAGE se enumeran en la cuarta columna. Las proproteínas con las secuencias de propéptidos 42 y 48 se clasifican como que tienen baja estabilidad debido a la presencia de proteína madura durante la inducción (observada después de 1, 2 y 3 días para la variante 42 y después de 2 y 3 días para la variante 48). Las velocidades de conversión relativas de las proproteínas como se ha determinado por tiempo para lograr la máxima velocidad de reacción de SLAP se enumeran en la quinta columna. Los porcentajes estimados de proteína convertida que comprendió las variantes del extremo N de la proteína elastasa madura se enumeran en la sexta columna. Las **Figuras 5B-5F** muestran datos de velocidades de conversión para las secuencias de propéptidos 24, 42, 48, 49 y 55, respectivamente.

Figura 6. Esquema de clonación de pPROT55M3-V. pPROT55M3-V se manipuló por ligación *in vitro* de dos casetes de expresión adicionales al esqueleto del vector pPROT55-V de 4,3 kb, dando un total de tres casetes de expresión en tándem. El fragmento del casete de expresión de 2,3 kb se liberó de pPROT55-V con una digestión con restricción con BglII y BamHT y se purificó, seguido de ligación de dos copias del casete de expresión a pPROT55-V linealizado con BamHI.

Figura 7: Optimización en matraz de agitación del clon 201-55M3-006-VU. Se preparó medio de inducción convencional, BKME, y se complementó con citrato de sodio para lograr concentraciones finales de citrato de sodio 0, 12,5, 25 y 50 mM, pH 5,5. El medio se usó para resuspender sedimentos de células en fase de crecimiento usando una relación de 1 g de peso de células húmedas a 10 ml de medio de inducción. Las suspensiones de células o 25 ml de cada una se dispusieron en un matraz sin deflector de 250 ml y se incubaron a 22 °C o 25 °C durante 3 días con agitación a 275 rpm. Se añadió metanol dos veces al día a una concentración final del 0,5% en volumen. Se tomaron alícuotas de sobrenadante durante el periodo de 3 días y se analizaron para la expresión de proteínas por SDS-PAGE y tinción con Coomassie. El panel A muestra las muestras inducidas a 22 °C y el panel B muestra las muestras inducidas a 25 °C. En ambos paneles, los carriles 1-3 son sobrenadantes después de 1, 2 y 3 días de inducción, respectivamente, que contienen 0% de citrato de sodio; los carriles 4-6 son similares, excepto con 12,5% de citrato de sodio; los carriles 7-9 son similares, excepto con 25% de citrato de sodio; y los carriles 10-12 son similares, excepto con citrato de sodio 50 mM.

Figura 8. Análisis de SDS-PAGE de sobrenadantes de fermentación de 201-55-001-VU y 201-55M3-003-VU. Carriles 1, 2: sobrenadante de 201-55-001-VU; carriles 3, 4: sobrenadante de 201-55M3-003-VU; carril 5: vacío; carril 6: marcadores de peso molecular.

Figura 9. Análisis de SDS-PAGE de fracciones de cromatografía de captura de la proproteína pPROT55M3-V. Se mezclaron un total de 30 microlitros de cada fracción de elución con 10 microlitros de 4X tampón de carga de muestra Laemmli complementado con beta-mercaptoetanol. Las proteínas se sometieron a electroforesis sobre un gel al 8-16% de gradiente lineal, seguido de tinción con Coomassie. Se observaron dos formas predominantes de PRT-201: la proproteína (fracciones 15-43) y se convirtió espontáneamente en PRT-201 madura (fracciones 15-44). Los números de carril se corresponden con números de fracción. M, marcador de peso molecular. BC, antes de la muestra de la columna (pre-carga).

Figura 10: Análisis de HIC-HPLC de conversión de proproteína purificada. pro-PRT-201-55M3-003-VU purificada se sometió a conversión a 26 °C. El gráfico muestra cantidades relativas de PRT-201 madura (longitud completa) y de variantes del extremo N producidas durante la conversión.

Figura 11: Análisis de HIC-HPLC de conversión de proproteína en sobrenadante de fermentación efectuado por filtración de flujo tangencial. Se sometió sobrenadante de fermentación de 201-55M3-003-VU clarificado a filtración de flujo tangencial con Tris 100 mM, pH 8,0, usando diafiltración de volumen constante a temperatura ambiente con membranas de celulosa regenerada. El gráfico muestra cantidades relativas de proproteína, PRT-201 madura (longitud completa) y de variantes del extremo N presentes en diversos momentos de tiempo durante la conversión.

Figuras 12. Análisis de SDS-PAGE de fracciones de cromatografía de captura de conversión de pPROT55M3-V. Se mezclaron un total de 30 microlitros de cada fracción de elución con 10 microlitros de 4X tampón de carga de muestra Laemmli complementado con beta-mercaptoetanol. Las proteínas se sometieron a electroforesis sobre un gel al 8-16% de gradiente lineal, seguido de tinción con Coomassie. Se observaron dos formas predominantes de

PRT-201: la forma madura glucosilada (fracciones 35-70) y la forma madura no glucosilada (fracciones 75-160). Los números de carril se corresponden con los números de fracción. M, marcador de peso molecular. BC, muestra antes de la columna (pre-carga).

5 **Figura 13:** Dependencia de la concentración de la conversión de pro. pro-PRT-201 purificada del clon 201-55M3-003-VU (pro-PRT-201-55M3-003-VU) se sometió a conversión a concentraciones de 0,2, 1,0, 1,6 y 1,8 mg/ml. Las reacciones de conversión se monitorizaron por HIC-HPLC en tiempo real hasta que la proproteína fue 1% de la proteína total. El gráfico muestra las cantidades relativas de PRT-201 madura (longitud completa) (barras sin sombrear) y de variantes del extremo N (barras rellenas diagonales) producidas durante las conversiones.

10 **Figura 14.** Secuencia de ADN de elastasa pancreática porcina tipo 1 sintética (es decir, recombinante). La secuencia recombinante contiene una región codificante de 750 pares de bases. Los sitios de restricción SacII y XbaI como se han subrayado se incorporaron para facilitar la clonación. Los codones de terminación están recuadrados. La secuencia de pro-péptidos está en tipo negrita.

15 **Figura 15.** Secuencia de aminoácidos de elastasa pancreática tipo I porcina sintética (es decir, recombinante). La región de pro-péptido está en tipo negrita mientras que el sitio de escisión de tripsina está recuadrado. Después de la escisión del pro-péptido de 10 aminoácidos, la enzima madura resultante tiene 240 aminoácidos.

20 **Figura 16.** Esquema de clonación de elastasa pancreática tipo I porcina en el vector PV-1. Después de la síntesis de la región codificante de la proproteína elastasa pancreática tipo I porcina, se clonó en el vector pUC de Blue Heron. Además de amplificar la secuencia codificante de elastasa pancreática tipo I porcina, se usó PCR para incorporar sitios de restricción XhoI y SacII para clonación en el vector PV-1. El producto de PCR se digirió, se purificó en gel y se ligó con el vector PV-1 digerido con XhoI y SacII, produciendo así un vector de expresión PROT101-24-V que codifica proproteína elastasa pancreática tipo I porcina activada con tripsina.

25 **Figura 17.** Análisis de expresión de los clones pPROT101-42-V auto-activados y pPROT101-24-V activados con tripsina durante la inducción por metanol por SDS-PAGE. Sobrenadantes de matraz de agitación después de 1 día de inducción se analizaron sobre un gel al 8-16% de gradiente, seguido de tinción con tinción con Coomassie. Los carriles 1-10 contienen sobrenadantes de diez clones diferentes transformados con pPROT101-42-V. Los carriles 11-12 contienen sobrenadantes de dos clones diferentes transformados con pPROT101-24-V. M, marcadores de peso molecular.

30 **Figura 18.** Análisis de expresión de los clones pPROT101-49-V y pPROT101-55L-V auto-activados durante la inducción por metanol por SDS-PAGE. Sobrenadantes de matraz de agitación después de 1 y 2 días de inducción se analizaron sobre un gel al 8-16% de gradiente, seguido de tinción con Coomassie. Los carriles 1-2 contienen sobrenadantes de un clon de pPROT101-49-V después de 1 y 2 días de inducción, respectivamente. Los carriles 3-4 contienen sobrenadantes de un clon de pPROT101-55L-V después de 1 y 2 días de inducción, respectivamente. M, marcadores de peso molecular.

35 **Figura 19.** Activación del transcurso de tiempo de proteínas pPROT101-49-V y pPROT101-55L-V por ensayo de conversión a pequeña escala como se ha determinado por actividad de elastasa SLAP. Las barras de error representan \pm DE de la media (n=4).

40 **Figura 20.** Análisis de SDS-PAGE de sobrenadantes de pPROT101-49-V y pPROT101-55L-V antes y después del ensayo de conversión a pequeña escala. Antes de la electroforesis, las muestras se mezclaron con ácido cítrico, el agente reductor TCEP y tampón de muestra LDS (Invitrogen, CA). Las muestras se calentaron a 70 °C durante 10 minutos. Carriles 1-2: sobrenadante del ensayo pre- y post-conversión de pPROT101-49-V, respectivamente; carriles 3-4: sobrenadante del ensayo pre- y post-conversión de pPROT101-55L-V, respectivamente. M, marcadores de peso molecular.

45 **Figura 21.** Curva patrón de TrypZean.

50 **Figura 22.** Una vista lateral, parcialmente en sección, de una realización del dispositivo médico descrito en la Sección 5.9.

55 **Figura 23.** Una vista similar a la de la Figura 22 que ilustra el movimiento de los actuadores del dispositivo médico.

60 **Figura 24.** Una vista en sección desde un extremo en el plano de la línea 2-2 en la Figura 22.

65 **Figura 25.** Una vista en sección desde un extremo en el plano de la línea 3-3 en la Figura 22.

Figura 26. Un diagrama de la trayectoria de fluido del dispositivo médico de la Figura 22, que se extiende desde los conos de Luer pasando por los conductos de administración de fluido al depósito y luego a los penetradores de tejido.

Figura 27. Una vista lateral, parcialmente en sección, de una segunda realización del dispositivo médico de la presente invención que muestra los actuadores en sus configuraciones restringidas.

Figura 28. Una vista similar a la Figura 27, pero que muestra los actuadores en sus configuraciones restringidas.

Figura 29. Una vista desde un extremo en perspectiva del montaje a lo largo de la línea 3'-3' de la Figura 27.

Figura 30. Una vista desde un extremo en perspectiva del montaje a lo largo de la línea 4'-4' de la Figura 29 que muestra los penetradores de tejido.

Figura 31. Una vista lateral que muestra el detalle del extremo proximal del dispositivo, mostrado a la derecha en las Figuras 27 y 28.

Figura 32. Una vista parcial del exterior del dispositivo médico de la Figura 22 en su posición restringida.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos para la expresión recombinante y la producción de proteínas elastasas biológicamente activas maduras. La presente invención proporciona novedosos procedimientos eficaces de preparación de proteínas elastasas recombinantes cultivando células huésped, que incluyen la célula huésped preferida, *Pichia pastoris*, que comprende ácidos nucleicos que codifican proteínas proelastasas y proteínas preproelastasas. También se proporciona el uso de las proteínas recombinantes para fabricar composiciones farmacéuticas para el tratamiento y la prevención de enfermedades de conductos biológicos (incluyendo arterias o venas).

En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a proteínas proelastasas auto-activadas recombinantes y ácidos nucleicos, células huésped y procedimientos de fabricación relacionados. Tales proteínas proelastasas auto-activadas se manipulan para contener un sitio de reconocimiento de elastasa inmediatamente en el extremo N para el primer residuo de la proteína elastasa madura. Bajo condiciones de cultivo especificadas, tales como aquellas descritas en la Sección 6 más adelante, es posible reducir la auto-activación hasta que se desee la activación. También es posible reducir la auto-activación hasta que la proelastasa se elimine del cultivo celular.

La presente invención proporciona procedimientos de expresión y purificación eficaces para producir proteínas elastasas de calidad farmacéutica. La presente invención también proporciona procedimientos para tratar o prevenir enfermedades de conductos biológicos usando las proteínas elastasas de la invención.

La descripción en la Sección 5 en el presente documento es aplicable a las realizaciones de la Sección 8. Así, por ejemplo, una referencia a una proteína elastasa de la invención incluye, pero no se limita a, una referencia a una proteína elastasa según una cualquiera de las realizaciones 1-39 y 68-69, o una proteína elastasa obtenida u obtenible mediante el procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 89-224, 261 a 276 y 347 a 373. Asimismo, una referencia a un ácido nucleico de la invención se refiere, entre otras cosas, a un ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones 40-67; referencia a un vector se refiere, entre otras cosas, a referencia a un vector según una cualquiera de las realizaciones 70-72; referencia a una célula se refiere, entre otras cosas, a una célula según una cualquiera de las realizaciones 73-87; referencia a un sobrenadante de cultivo celular se refiere, entre otras cosas, a un sobrenadante de cultivo celular según la realización 88; referencia a composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, formulaciones de elastasa y dosificaciones unitarias, incluye, por ejemplo, aquellas ejemplificadas en las realizaciones 277-314, 346, 386 y 415-420, o aquellas obtenidas u obtenibles mediante el procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 261-276 y 374-385; y referencias a procedimientos terapéuticos también incluyen una referencia a procedimientos terapéuticos según una cualquiera de las realizaciones 387-414; y referencia a un kit incluye una referencia a, entre otras cosas, una referencia a un kit de las realizaciones 421-425 de la Sección 8.

5.1 PROTEÍNAS ELASTASAS

La presente invención se refiere, entre otras cosas, a procedimientos para la expresión y producción recombinante de proteínas elastasas biológicamente activas maduras. Las proteínas elastasas se expresan generalmente como preproteínas, que contienen, entre otras secuencias, un péptido señal, un péptido de activación y una porción madura con actividad biológica. Secuencias de proteínas elastasas maduras adecuadas se describen en la Sección 5.1.1 más adelante. Secuencias de péptidos de activación adecuadas se describen en la Sección 5.1.2 más adelante. Secuencias señal adecuadas se describen en la Sección 5.1.3 más adelante.

Por consiguiente, en ciertos aspectos, las proteínas elastasas de la invención son proteínas preproelastasas. La eliminación de la secuencia señal de las preproteínas tras la secreción generalmente da una proproteína inactiva que contiene un péptido de activación y una proteína madura. La frases "secuencia de activación" y "péptido de activación" se usan indistintamente en el presente documento. Así, en otros aspectos, las proteínas elastasas de la invención son proteínas proelastasas que comprenden un péptido de activación que está operativamente ligado a

una proteína elastasa madura. En una realización a modo de ejemplo, un péptido de activación o secuencia de una elastasa pancreática tipo I humana natural comprende los 10 primeros aminoácidos del extremo N de la proproteína elastasa tipo I humana (SEC ID N°: 22). En ciertas realizaciones, el péptido de activación es un péptido de SEC ID N°: 80. Los péptidos de activación o secuencias útiles en la práctica de la presente invención también incluyen, pero no se limitan a, SEC ID N°: 23, 72 y 73. Todavía otras secuencias de activación útiles en la práctica de la presente invención pueden obtenerse a partir de los residuos 1-10 del extremo N de SEC ID N°: 64-69 y 98-103.

La eliminación del péptido de activación de la secuencia de proelastasa genera una proteína elastasa madura. La etapa por la que el péptido de activación se elimina de la secuencia de proelastasa/se separa de la secuencia de elastasa madura para generar una proteína elastasa madura se denomina en el presente documento una etapa de activación. Así, en todavía otros aspectos, las proteínas elastasas de la invención son proteínas elastasas maduras.

Los residuos de aminoácidos que comprenden el extremo C (es decir, extremo carboxi) del péptido de activación y el extremo N (es decir, extremo amino) de la proteína madura que rodean el enlace de escisión se representan en la Figura 2 y también se identifican en el presente documento del siguiente modo. Primero, los residuos localizados en el extremo C del péptido de activación se designan PX,...P5, P4, P3, P2 y P1 en la que P1 es el residuo del extremo C del péptido de activación. Los residuos localizados en el extremo N de la proteína madura se designan P1', P2', P3',...PX' en la que P1' es el residuo del extremo N de aminoácido de la proteína madura. El enlace escindible que se escinde por proteólisis (denominado el "enlace de escisión" en la Figura 2) es el enlace peptídico entre el residuo P1 del péptido de activación y el residuo P1' de la proteína madura.

La región que atraviesa 4 aminoácidos del extremo C del péptido de activación (residuos P4 a P1) hasta los 4 primeros aminoácidos del extremo N de la proteína madura (residuos P1' a P4') se denomina en el presente documento el "sitio de escisión".

La región que atraviesa aproximadamente 5 aminoácidos del extremo C del péptido de activación (es decir, residuos P5 a P1) hasta aproximadamente los 3 primeros aminoácidos del extremo N de la proteína madura (es decir, residuos P1' a P3') se denomina en el presente documento el "dominio de escisión". Ejemplos de dominios de escisión que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, SEC ID N°: 42, 43, 48, 49, 52, 53, 54 ó 55. Otros dominios de escisión que pueden usarse en la presente invención son cualesquiera de las secuencias descritas por la secuencia del dominio de escisión consenso Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ en la que Xaa₁=P5, Xaa₂=P4, Xaa₃=P3, Xaa₄=P2, Xaa₅=P1, Xaa₆=P1', Xaa₇=P2' y Xaa₈=P3', en la que:

- Xaa₁ es glutamato, histidina, prolina, glicina, asparagina, lisina o alanina u, opcionalmente, un análogo de los mismos;
- Xaa₂ es treonina, alanina, prolina o histidina u, opcionalmente, un análogo de las mismas;
- Xaa₃ es alanina, leucina, isoleucina, metionina, lisina, asparagina o valina u, opcionalmente, un análogo de las mismas, pero preferentemente no es glicina o prolina;
- Xaa₄ es prolina, alanina, leucina, isoleucina, glicina, valina o treonina u, opcionalmente, un análogo de las mismas;
- Xaa₅ es alanina, leucina, valina, isoleucina o serina, pero no glicina, tirosina, fenilalanina, prolina, arginina, glutamato o lisina u, opcionalmente, un análogo de las mismas;
- Xaa₆ es alanina, leucina, valina, isoleucina o serina u, opcionalmente, un análogo de las mismas;
- Xaa₇ es glicina, alanina o valina u, opcionalmente, un análogo de las mismas; y
- Xaa₈ es valina, treonina, fenilalanina, tirosina o triptófano u, opcionalmente, un análogo de las mismas.

La región de tres aminoácidos que atraviesa los residuos P3, P2, y P1 del péptido de activación se denomina en el presente documento un "sitio de reconocimiento de elastasa". Ejemplos de sitios de reconocimiento que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, SEC ID N°: 14-16 y 18-21. Otros sitios de reconocimiento contemplados por la presente invención incluyen cualquier sitio de reconocimiento descrito por los sitios de reconocimiento consenso de SEC ID N°: 11, 12, 13 ó 93. La secuencia de reconocimiento de elastasa consenso 1 de SEC ID N°: 11 se representa por la secuencia de péptidos Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ en la que Xaa₁=P3, Xaa₂=P2, Xaa₃=P1, en la que:

- Xaa₁ es alanina, leucina, isoleucina, metionina, lisina, asparagina o valina u, opcionalmente, un análogo de las mismas, pero preferentemente no es glicina o prolina;
- Xaa₂ es prolina, alanina, leucina, isoleucina, glicina, valina o treonina u, opcionalmente, un análogo de las mismas;
- Xaa₃ es alanina, leucina, valina, isoleucina o serina u, opcionalmente, un análogo de las mismas, pero preferentemente no es glicina, tirosina, fenilalanina, prolina, arginina, glutamato, o lisina.

La secuencia de reconocimiento de elastasa consenso 2 de SEC ID N°: 12 se representa por la secuencia Xaa₁ Pro Xaa₂, en la que:

- Xaa₁ es alanina, leucina, isoleucina, metionina, lisina o valina u, opcionalmente, un análogo de las mismas,

pero preferentemente no es glicina o prolina;

- Pro es prolina u, opcionalmente, un análogo de la misma;
- Xaa₂ es alanina, leucina, valina, isoleucina o serina u, opcionalmente, un análogo de las mismas, pero preferentemente no es glicina, tirosina, fenilalanina, prolina, arginina, glutamato o lisina.

La secuencia de reconocimiento de elastasa consenso 3 de SEC ID N°: 13 se representa por la secuencia de péptidos Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃, en la que Xaa₁=P3, Xaa₂=P2, Xaa₃=P1, en la que Xaa₁ es asparagina o alanina u, opcionalmente, un análogo de las mismas; en la que Xaa₂ es prolina o alanina u, opcionalmente, un análogo de las mismas, y en la que Xaa₃ es alanina, leucina o valina u, opcionalmente, un análogo de las mismas.

La secuencia de reconocimiento de elastasa consenso 4 de SEC ID N°: 93 se representa por la secuencia Xaa₁ Pro Xaa₂, en la que:

- Xaa₁ es alanina, leucina, isoleucina, metionina, lisina, asparagina o valina u, opcionalmente, un análogo de las mismas, pero preferentemente no es glicina o prolina;
- Pro es prolina u, opcionalmente, un análogo de la misma;
- Xaa₂ es alanina, leucina, valina, isoleucina o serina u, opcionalmente, un análogo de las mismas, pero preferentemente no es glicina, tirosina, fenilalanina, prolina, arginina, glutamato o lisina.

Referencia a una secuencia como “secuencia de escisión”, “dominio de escisión”, “secuencia de activación”, “secuencia de reconocimiento de elastasa”, etc., es únicamente para facilidad de referencia y no pretende implicar ninguna función de la secuencia o mecanismo por el que la secuencia sea reconocida o procesada.

Las proteínas de la invención están generalmente compuestas de aminoácidos y pueden incluir además uno o más (por ejemplo, hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 ó 15) análogos de aminoácido. Generalmente, como se usa en el presente documento, un aminoácido se refiere a un L-estereoisómero que se produce naturalmente. Un análogo de aminoácido se refiere a un D-estereoisómero, un aminoácido químicamente modificado u otro aminoácido no natural. Por ejemplo, aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a, ácido azetidincarboxílico, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, -alanina, ácido aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, terc-butilglicina, ácido 2,4-diaminoisobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasparagina, homoprolina, hidroxilisina, alohidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilalanina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilpentilglicina, N-metilvalina, naftalanina, norvalina, norleucina, ornitina, pentilglicina, ácido piperídico y tioprolina. Un aminoácido químicamente modificado incluye un aminoácido que está químicamente bloqueado, reversiblemente o irreversiblemente, y/o modificado en uno o más de sus grupos laterales, átomos de carbono α , grupo amino terminal o grupo ácido carboxílico terminal. Una modificación química incluye añadir restos químicos, crear nuevos enlaces y eliminar restos químicos. Ejemplos de aminoácidos químicamente modificados incluyen, por ejemplo, sulfóxido de metionina, metioninasulfona, S-(carboximetil)-cisteína, sulfóxido de S-(carboximetil)-cisteína y S-(carboximetil)-cisteínasulfona. Modificaciones en grupos laterales de aminoácidos incluyen acilación de grupos -amino de lisina, N-alquilación de arginina, histidina o lisina, alquilación de grupos ácido carboxílico glutámico o aspártico, y desamidación de glutamina o asparagina. Modificaciones del extremo amino incluyen las modificaciones de des-amino, N-alquilo inferior, N-di-alquilo inferior y N-acilo. Modificaciones del grupo carboxi terminal incluyen las modificaciones de amida, alquil inferior-amida, dialquilamida y éster de alquilo inferior. Un alquilo inferior es un alquilo C₁-C₄. Además, uno o más grupos laterales, o grupos terminales, pueden protegerse por grupos protectores conocidos para el químico de proteínas habitual en la técnica. El carbono α de un aminoácido puede estar mono- o di-metilado.

Las proteínas de la invención pueden modificarse o derivatizarse, tal como modificarse por fosforilación o glucosilación, o derivatizarse por conjugación, por ejemplo, con un lípido u otra proteína (por ejemplo, para la elección de diana o estabilización), o similares.

La presente invención frecuentemente se refiere a una proteína elastasa “aislada” o “purificada”. Una proteína elastasa aislada es una que se elimina de su medio celular. Una proteína elastasa purificada está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de células o de tejido de la que se deriva la proteína elastasa, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de proteína elastasa en las que la proteína se separa de componentes celulares de las células de las que se produce recombinantemente. Así, proteína elastasa que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína elastasa que tienen menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10% o 5% (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en el presente documento “proteína contaminante”). Si la proteína elastasa se produce mediante un procedimiento en el que es secretada en medio de cultivo, también está preferentemente sustancialmente libre del 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 proteína elastasa.

En ciertas realizaciones, una elastasa aislada o purificada está adicionalmente libre o sustancialmente libre de ADN

celular. En las realizaciones específicas, el ADN genómico de célula huésped está presente en una cantidad de menos de 10 picogramos, menos de 5 picogramos, menos de 3 picogramos, menos de 2 picogramos, o menos de 1 picogramo de ADN por miligramo de proteína elastasa en una preparación de proteína elastasa aislada o purificada, o en una composición que comprende proteína elastasa aislada o purificada. En una realización, el ADN de célula huésped es ADN de *Pichia pastoris*.

Secuencias de proteínas elastasas útiles se proporcionan en la Tabla 1. En una realización específica, la invención proporciona una proteína proelastasa (que incluye, pero no se limita a, una proteína de una cualquiera de SEC ID N°: 6-9, 64-69, 88-91 y 98-103) que comprende (i) una secuencia de activación que comprende una secuencia de reconocimiento de elastasa operativamente ligada a (ii) la secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene actividad de elastasa tipo I. Se conocen varios polimorfismos de elastasa tipo I humana. Cualquier combinación de polimorfismos se contempla en las secuencias de proteínas proelastasas de la presente invención, que incluyen, pero no se limitan a, las combinaciones de polimorfismos expuestas en la Tabla 2. La proteína comprende opcionalmente además una secuencia señal operativamente ligada a dicha secuencia de activación. En ciertas realizaciones específicas, la secuencia señal es operable en *Pichia pastoris*, tal como un péptido señal de factor α de levadura, ejemplificado por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 34. Péptido señal alternativo que contiene secuencias se ejemplifican en SEC ID N°: 50 y 96 (que contienen un péptido señal, un propéptido de no elastasa y una secuencia de espaciador) y SEC ID N°: 51 y 97 (que contiene el péptido señal y un propéptido de no elastasa). En otras realizaciones específicas, la secuencia señal es una secuencia señal de la secreción de mamífero, tal como una secuencia señal de elastasa porcina. Preferentemente, la secuencia de reconocimiento de elastasa es una secuencia de reconocimiento de elastasa tipo I, lo más preferentemente una secuencia de reconocimiento de elastasa tipo I humana.

La presente invención engloba adicionalmente variantes de las proteínas elastasas de la invención. Las variantes pueden contener sustituciones de aminoácidos en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos. Preferentemente, una variante incluye no más de 15, no más de 12, no más de 10, no más de 9, no más de 8, no más de 7, no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2 o no más de 1 sustitución de aminoácidos conservativa con respecto a una elastasa madura que se produce naturalmente y/o no más de 5, no más de 4, no más de 3, o no más de 2 sustituciones de aminoácidos no conservativas, o no más de 1 sustitución de aminoácidos no conservativa, con respecto a una elastasa madura que se produce naturalmente.

En realizaciones específicas, la variante tiene no más de 10 o más preferentemente no más de cinco sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto a una elastasa madura, una proelastasa o una preproelastasa de la invención, tal como con respecto a una elastasa madura de SEC ID N°: o SEC ID N°: 84 o una proteína proelastasa de SEC ID N°: 6-9, 64-69, 88-91 y 98-103. Las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 1 y 84 contienen una o más posiciones correspondientes a posibles polimorfismos en la secuencia de elastasa madura, en las posiciones 44 (W o R); 59 (M o V); 220 (V o L); y 243 (Q o R) (las posiciones se refieren a preproteína). Así, la invención engloba proteínas elastasas maduras con cualquier combinación de los cuatro polimorfismos identificados en SEC ID N°: 84. Cada una de tales combinaciones se explica brevemente en la Tabla 3 anterior. La secuencia de SEC ID N°: 88-91 y 98-103 contiene adicionalmente un posible polimorfismo en la secuencia de propéptidos, en la posición 10 (Q o H). Así, la invención engloba secuencias de preproelastasa y proelastasa que contienen cualquier combinación de los cinco polimorfismos identificados en SEC ID N°: 88-91 y 98-103. Cada una de tales combinaciones se explica brevemente en la Tabla 2 anterior.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se sustituye con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la materia. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano).

Las proteínas elastasas de variante de la invención pueden incluir sustituciones de aminoácidos con análogos de aminoácidos, además de aminoácidos, como se describen en el presente documento.

En realizaciones específicas, la proteína de la invención comprende o consiste esencialmente en una variante de una elastasa tipo I humana madura, por ejemplo, una variante que es al menos aproximadamente el 75%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% idéntica a las proproteínas elastasas o proteínas elastasas maduras enumeradas en la Tabla 1, tal como, pero no se limitan a, las proproteínas elastasas de SEC ID N°: 6-9, 64-69, 88-91 y 98-103, y retienen actividad de elastasa cuando se expresan para producir una proteína elastasa madura de SEC ID N°: 1, 4, 5, 84 ó 87.

Para determinar la identidad en porcentaje de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias están alineadas para fines de comparación óptimos (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para alineamiento óptimo con una

segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos). Entonces se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Si una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. La identidad en porcentaje entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (% de identidad = $(n^\circ \text{ de posiciones idénticas} / n^\circ \text{ total de posiciones solapantes}) \times 100$). En una realización, las dos secuencias son de la misma longitud. En otras realizaciones, las dos secuencias se diferencian en longitud por no más del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% o el 10% de la longitud de la más larga de las dos secuencias.

La determinación de la identidad en porcentaje entre dos secuencias puede llevarse a cabo usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Un algoritmo tal se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación puede utilizarse BLAST con huecos como se describen en Altschul y col. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternativamente, PSI-Blast puede usarse para realizar una búsqueda iterativa que detecta relaciones distantes entre moléculas (idem). Si se utilizan los programas BLAST, BLAST con huecos y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Otro ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Un algoritmo tal se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias CGC. Si se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede usarse una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Algoritmos adicionales para el análisis de secuencias se conocen en la técnica e incluyen ADVANCE y ADAM como se describe en Torellis y Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; y FASTA descrito en Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que fija la sensibilidad y velocidad de la búsqueda. Si ktup=2, se encuentran regiones similares en las dos secuencias que se comparan buscando en pares de residuos alineados; si ktup=1, se examinan aminoácidos alineados individuales. ktup puede fijarse a 2 ó 1 para secuencias de proteína, o de 1 a 6 para secuencias de ADN. El valor por defecto si ktup no se especifica es 2 para proteínas y 6 para ADN. Para otra descripción de parámetros de FASTA véase <http://bioweb.pastur.fr/docs/man/man/fasta.1.htm1#sect2>.

La identidad en porcentaje entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a aquellas descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. En el cálculo de la identidad en porcentaje normalmente se cuentan emparejamientos exactos.

Las proteínas elastasas de la invención pueden presentar modificaciones post-traduccionales, que incluyen, pero no se limitan a, glucosilaciones (por ejemplo, glucosilaciones ligadas en N o ligadas en O), miristilaciones, palmitilaciones, acetilaciones y fosforilaciones (por ejemplo, serina/reonina o tirosina). En una realización, las proteínas elastasas de la invención presentan niveles reducidos de glucosilación ligada en O y/o glucosilación ligada en N con respecto a proteínas elastasas endógenamente expresadas. En otra realización, las proteínas elastasas de la invención no presentan glucosilación ligada en O o glucosilación ligada en N.

5.1.1. LA SECUENCIA DE ELASTASA MADURA

Las secuencias de elastasa madura de la presente invención son preferentemente secuencias de elastasa de mamífero, lo más preferentemente secuencias de elastasa humana. En otras realizaciones, las secuencias de elastasa de mamífero madura son de otros mamíferos tales como ratón, rata, cerdo, vaca o caballo.

En los procedimientos y composiciones de la invención, la secuencia de elastasa madura empleada es preferentemente la de una elastasa pancreática tipo I, que preferencialmente escinde secuencias de proteína hidrófobas, preferible sobre el lado carboxi de residuos de aminoácidos hidrófobos pequeños tales como alanina. Ejemplos de elastasas pancreáticas tipo I incluyen la enzima elastasa I humana (número de acceso de NCBI NP_001962) que se expresa en piel y la enzima elastasa pancreática porcina I (número de acceso de NCBI CAA27670) que se expresa en el páncreas. SEC ID N^o: y SEC ID N^o: 84 son ejemplos de secuencias de elastasa tipo I humana madura.

Alternativamente puede usarse una elastasa tipo II que puede escindir secuencias de proteína hidrófoba, preferentemente sobre el lado carboxi de residuos de aminoácidos hidrófobos de medios a largos. Ejemplos de elastasas tipo II incluyen la enzima elastasa IIA humana (número de acceso de NCBI NP254275) y la enzima elastasa porcina II (número de acceso de NCBI A26823), que son ambas expresadas en el páncreas.

También se engloban variantes de una proteína elastasa madura de la invención. Las variantes incluyen proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a o derivadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína elastasa madura de la invención y presentan actividad de elastasa biológica. Una porción biológicamente activa de una proteína elastasa madura de la invención puede ser una proteína que tiene, por ejemplo, al menos 150, 160, 175, 180, 185, 190, 200, 210, 220, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238 ó 239 aminoácidos de longitud. Además, otras porciones biológicamente activas, en las que otras regiones de la proteína están deletionadas, pueden prepararse por técnicas recombinantes y evaluarse para una o más de las actividades funcionales de la forma nativa de una proteína elastasa madura de la invención.

Además, las proteínas elastasas maduras que comprenden cualquier combinación de los cuatro polimorfismos de elastasa tipo I humana se representan por SEC ID N°: 84. Posibles combinaciones se exponen en la Tabla 3 anterior.

5.1.2. SECUENCIAS DE ACTIVACIÓN DE PROELASTASA

La secuencia de activación de elastasa es cualquier secuencia cuya eliminación de una proteína proelastasa produzca una proteína elastasa madura biológicamente activa.

Las secuencias de activación generalmente contienen sitios de reconocimiento de proteasa adyacentes a donde las proproteínas se escinden para producir proteínas biológicamente activas maduras. Una secuencia de activación puede manipularse para añadir un sitio de reconocimiento de proteasa o elastasa, o puede manipularse para sustituir un sitio de reconocimiento de proteasa existente con otro sitio de reconocimiento de proteasa. Los péptidos de activación o secuencias útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, SEC ID N°: 23, 72 y 73. Todavía otras secuencias de activación útiles en la práctica de la presente invención pueden obtenerse a partir de los residuos 1-10 del extremo N de SEC ID N°: 64-68. En aspectos preferidos, la secuencia de activación de proelastasa se manipula para contener una secuencia de reconocimiento para una elastasa tipo I o tipo II. Lo más preferentemente, la secuencia de reconocimiento de elastasa es reconocida por la elastasa madura con la que está operativamente ligada. Así, en las realizaciones referidas a elastasa tipo II, la secuencia de reconocimiento es lo más preferentemente una secuencia de reconocimiento de elastasa tipo II. En cambio, en las realizaciones dirigidas a una elastasa tipo I, la secuencia de reconocimiento es lo más preferentemente una secuencia de reconocimiento de elastasa tipo I. En una realización preferida, la secuencia de reconocimiento es una secuencia de reconocimiento de elastasa tipo I humana. Las secuencias de reconocimiento tipo I a modo de ejemplo incluyen la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14-16 y 18-21. Otros sitios de reconocimiento contemplados por la presente invención incluyen cualquier sitio de reconocimiento descrito por los sitios de reconocimiento consenso de SEC ID N°: 11, 12 ó 13.

5.1.3. SECUENCIAS SEÑAL

Las proteínas proelastasas de la invención pueden contener adicionalmente una secuencia señal que aumenta la secreción de proteína proelastasa en el medio de cultivo de la célula huésped en el que se expresa.

La secuencia señal nativa de la proteína elastasa puede usarse particularmente para la expresión en una célula huésped de mamífero. En otras realizaciones, la secuencia señal nativa de una proteína elastasa de la invención puede eliminarse y sustituirse con una secuencia señal de otra proteína, tal como la secuencia señal de elastasa tipo I porcina, la secuencia señal de elastasa tipo I humana o la secuencia señal de factor α de levadura. En ciertas realizaciones específicas, el péptido señal de factor α de levadura puede comprender además (1) una propéptido de factor α de levadura o (2) un propéptido de factor α de levadura y secuencia de espaciador, cada uno se ejemplifica respectivamente por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 50 y 96 o SEC ID N°: 51 y 97. Alternativamente, la secuencia secretora de gp67 de la proteína de la envuelta del baculovirus puede usarse como secuencia señal heteróloga (Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., eds., John Wiley & Sons, 1992)). Otros ejemplos de secuencias señal heterólogas eucariotas incluyen las secuencias secretoras de melitina y fosfatasa alcalina placentaria humana (Stratagene; La Jolla, California). En otro ejemplo más, secuencias señal heterólogas procariotas útiles incluyen la señal secretora phoA (Sambrook y col., arriba) y la señal secretora de proteína A (Pharmacia Biotech; Piscataway, Nueva Jersey).

5.2 ÁCIDOS NUCLEICOS DE ELASTASA

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico recombinantes que codifican una proteína elastasa recombinante de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "molécula de ácido nucleico" está previsto que incluya moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados usando análogos de nucleótido. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican las proteínas elastasas de la invención. Así, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína proelastasa (que incluye, pero no se limita a, una proteína de

una cualquiera de SEC ID N°: 6-9, 64-69, 88-91 ó 98-103) que comprende (i) una secuencia de activación que comprende una secuencia de reconocimiento de elastasa operativamente ligada a (ii) la secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene actividad de elastasa tipo I. En otras realizaciones, la presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que comprende (i) una secuencia señal operable en *Pichia pastoris* operativamente ligada a (ii) una secuencia de activación (que incluye, pero no se limita a, una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 23, 72 ó 73) que comprende una secuencia de reconocimiento de proteasa que a su vez está operativamente ligada a (iii) la secuencia de aminoácidos de una elastasa tipo I humana madura.

10 Puede purificarse un ácido nucleico de la invención. Una molécula de ácido nucleico “purificada”, tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

15 En los casos en los que la molécula de ácido nucleico sea una molécula de ADNc o ARN, por ejemplo, ARNm, tales moléculas pueden incluir una “cola” de poli A o, alternativamente, pueden carecer de tal cola en 3’.

Una molécula de ácido nucleico de la invención puede amplificarse usando ADNc, ARNm o ADN genómico como molde y cebadores de oligonucleótidos apropiados según técnicas de amplificación por PCR convencionales. El ácido nucleico así amplificado puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de secuencias de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a toda o una parte de una molécula de ácido nucleico de la invención pueden prepararse por técnicas sintéticas convencionales, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado.

25 **5.3 VECTORES DE EXPRESIÓN RECOMBINANTES Y CÉLULAS HUÉSPED**

Adicionalmente se proporcionan vectores que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención o células huésped manipuladas para expresar los ácidos nucleicos de la invención. En las realizaciones específicas, los vectores comprenden una secuencia de nucleótidos que regula la expresión de la proteína codificada por el ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la invención puede estar operativamente ligada a un promotor inducible por metanol.

También se proporcionan células huésped que comprenden los ácidos nucleicos y vectores de la invención. En ciertas realizaciones, el vector o ácido nucleico está integrado en el genoma de la célula huésped; en otras realizaciones, el vector o ácido nucleico es extracromosómico. Una célula huésped preferida es una célula de *Pichia pastoris*.

Como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico con el que se ha ligado. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores pueden replicarse autónomamente en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y así se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores, vectores de expresión, pueden dirigir la expresión de secuencias codificantes con las que están operativamente ligados. En general, vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos (vectores).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden secuencia de nucleótidos que codifica una elastasa madura, una proelastasa o una preproelastasa de la invención en una forma adecuada para la expresión en una célula huésped. Esto significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células huésped que van a usarse para la expresión, que está operativamente ligada a la secuencia de ácidos nucleicos a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, “operativamente ligado” pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está ligada a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de un modo que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped). El término “secuencia reguladora” está previsto que incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Se apreciará por aquellos expertos en la materia que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de la proteína elastasa deseada, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células huésped para así producir proteínas elastasas

codificadas por ácidos nucleicos como se describe en el presente documento.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para la expresión de una proteína elastasa de la invención en procariotas (por ejemplo, *E. coli*) o células eucariotas (por ejemplo, células de insecto (usando vectores de expresión en baculovirus), células de levadura o células de mamífero). Células huésped adecuadas se tratan adicionalmente en Goeddel, arriba. Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo, usando secuencias reguladoras del promotor T7 y T7 polimerasa.

La expresión de proteínas en procariotas es casi siempre llevada a cabo en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de tanto proteínas de fusión como de no fusión. Los vectores de fusión añaden varios aminoácidos a una proteína codificada en su interior, normalmente al extremo amino de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión normalmente sirven a tres fines: 1) para aumentar la expresión de la proteína elastasa recombinante; 2) para aumentar la solubilidad de la proteína elastasa recombinante; y 3) para ayudar en la purificación de la proteína elastasa recombinante actuando de ligando en purificación por afinidad. Frecuentemente, en vectores de expresión de fusión, un dominio de escisión proteolítica se introduce en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión posterior a la purificación de la proteína de fusión. Así, el resto de fusión y el dominio de escisión proteolítica pueden juntos servir de secuencia de activación, que incluye un sitio de reconocimiento de proteasa, para la expresión recombinante de una proteína elastasa. Enzimas que pueden activar tales proteínas de fusión, y sus secuencias de reconocimiento relacionadas, incluyen factor Xa, trombina y enterocinasa. Vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc.; Smith y Johnson, 1988, Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, con la proteína recombinante diana.

Ejemplos de vectores de expresión en *E. coli* de no fusión inducibles adecuados incluyen pTrc (Amann y col., 1988, Gene 69:301-315) y pET-11d (Studier y col., 1990, Gene Expression: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California, 185:60-89). La expresión génica diana del vector pTrc se basa en la transcripción de ARN polimerasa huésped de un promotor de fusión híbrido de *trp-lac*. La expresión génica diana del vector pET-11d se basa en la transcripción de un promotor de fusión de T7 *gn10-lac* mediado por una ARN polimerasa viral coexpresada (T7 *gn1*). Esta polimerasa viral se suministra por cepas huésped BL21(DE3) o HMS174(DE3) de un profago λ residente que aloja un gen T7 *gn1* bajo el control transcripcional del promotor *lacUV 5*.

Una estrategia para maximizar la expresión de proteínas elastasas recombinantes en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria huésped con una capacidad alterada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante (Gottesman, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California 185:119-129). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácidos nucleicos del ácido nucleico a insertar en un vector de expresión de manera que los codones individuales para cada aminoácido sean aquellos preferencialmente utilizados en *E. coli* (Wada y col., 1992, Nucleic Acids Res. 20:2111-2118). Tal alteración de secuencias de ácidos nucleicos de la invención puede llevarse a cabo por técnicas de síntesis de ADN convencionales.

En otra realización, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para la expresión en levadura *S. cerevisiae* o *P. pastoris* incluyen pYepSec1 (Baldari y col., 1987, EMBO J. 6:229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, 1982, Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz y col., 1987, Gene 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) y pPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA). Para la expresión en levadura se usa preferentemente un promotor inducible por metanol. En el presente documento también se contempla la alteración de la secuencia de ácidos nucleicos del ácido nucleico a insertar en un vector de expresión de manera que los codones individuales para cada aminoácido sean aquellos preferencialmente utilizados en *P. pastoris*. Más específicamente, los codones de SEC ID N°: 33 o SEC ID N°: 81 pueden sustituirse con codones que se utilizan preferencialmente en *P. pastoris*.

Alternativamente, el vector de expresión es un vector de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf 9) incluyen las series pAc (Smith y col., 1983, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) y las series pVL (Lucklow y Summers, 1989, Virology 170:31-39). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácidos nucleicos del ácido nucleico a insertar en un vector de expresión de manera que los codones individuales para cada aminoácido sean aquellos preferencialmente utilizados en células de insecto.

En otra realización más, una proteína elastasa se expresa en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, 1987, Nature 329(6142):840-2) y pMT2PC (Kaufman y col., 1987, EMBO J. 6:187-195). Cuando se usa en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión se proporcionan frecuentemente por elementos reguladores virales. Por ejemplo, promotores comúnmente usados se derivan de poliovirus, adenovirus 2, citomegalovirus y virus simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados para tanto células procariotas como eucariotas véanse los Capítulos 16 y 17 de

Sambrook y col., arriba.

En otra realización, el vector de expresión de mamífero recombinante puede dirigir la expresión del ácido nucleico preferencialmente en un tipo de célula particular (por ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido se conocen en la técnica. Ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de albúmina (específico de hígado; Pinkert y col., 1987, *Genes Dev.* 1:268-277), promotores específicos de linfocitos T (Calame y Eaton, 1988, *Adv. Immunol.* 43:235-275), en particular promotores de receptores de linfocitos T (Winoto y Baltimore, 1989, *EMBO J.* 8:729-733) e inmunoglobulinas (Banerji y col., 1983, *Cell* 33:729-740; Queen y Baltimore, 1983, *Célula* 33:741-748), promotores específicos de neurona (por ejemplo, el promotor de neurofilamento; Byrne y Ruddle, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477), promotores específicos de páncreas (Edlund y col., 1985, *Science* 230:912-916) y promotores específicos de las glándulas mamarias (por ejemplo, promotor de suero de la leche; la patente de EE.UU. nº 4.873.316 y la publicación de solicitud europea nº EP264166). También están englobados promotores regulados por el desarrollo, por ejemplo, los promotores *hox* de ratón (Kessel y Gruss, 1990, *Science* 249:374-379) y el promotor de la fetoproteína beta (Campes y Tilghman, 1989, *Genes Dev.* 3:537-546).

En ciertos aspectos de la invención, la expresión de una proteína de la invención puede aumentarse aumentando la dosificación del gen correspondiente, por ejemplo, por el uso de un vector de expresión de alta copia o amplificación génica. La amplificación génica puede lograrse en células CHO deficientes en dihidrofolato reductasa ("*dhfr*") por cotransfección del gen de interés con el gen *dhfr* y exposición a medio selectivo con concentraciones crecientes escalonadas de metotrexato. Véase, por ejemplo, Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Unidad 16.14 (John Wiley & Sons, Nueva York, 1996). Un procedimiento alternativo para aumentar el número de copias de genes es multimerizar un casete de expresión (por ejemplo, promotor con secuencia codificante) que codifica la proteína elastasa de interés en un vector antes de introducir el vector en la célula huésped. Procedimientos y vectores para conseguir la multimerización de casetes de expresión se conocen en sistemas de levadura y de células huésped de mamífero (véase, por ejemplo, Monaco, *Methods in Biotechnology 8: Animal Cell Biotechnology*, en las págs. 39-348 (Humana Press, 1999); Vassileva y col., 2001, *Protein Expression and Purification* 21:71-80; Mansur y col., 2005, *Biotechnology Letter* 27(5):339-45. Además, están comercialmente disponibles kits para la expresión génica de múltiples copias. Por ejemplo, puede obtenerse un kit de expresión de *Pichia* de múltiples copias de Invitrogen (Carlsbad, California). La multimerización de un casete de expresión se ejemplifica en el Ejemplo 6, más adelante.

Por consiguiente, otros aspectos de la invención se refieren a células huésped en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Los términos "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se usan indistintamente en el presente documento. Se entiende que tales términos se refieren no solo a la célula objeto particular, sino a la progenie o posible progenie de una célula tal. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido tanto a mutación como a influencias medioambientales, tal progenie puede, en realidad, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía se incluye dentro del alcance del término como se usa en el presente documento.

Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota (por ejemplo, *E. coli*) o eucariota (por ejemplo, células de insecto, levadura o células de mamífero).

El ADN de vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Como se usa en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico extraño en una célula huésped, que incluyen co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Procedimientos adecuados para transformar o transfectar células huésped pueden encontrarse en Sambrook y col. (arriba), y otros manuales de laboratorio.

Para transfección estable de células de mamífero se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección usada, solo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, una secuencia codificante para un marcador de selección (por ejemplo, para resistencia a antibióticos) se introduce generalmente en las células huésped junto con el marco de lectura abierto de interés. Marcadores de selección preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina, Zeocin y metotrexato. Células establemente transfectadas con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por selección de fármacos (por ejemplo, células que han incorporado la secuencia codificante del marcador de selección sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

En otra realización, las características de expresión de una secuencia codificante de elastasa endógena dentro de una célula, línea celular o microorganismo pueden modificarse insertando un elemento regulador de ADN heterólogo a la secuencia codificante de elastasa en el genoma de una célula, línea celular estable o microorganismo clonado de forma que el elemento regulador insertado esté operativamente ligado con el gen endógeno.

Una secuencia heteróloga, que contiene un elemento regulador, puede insertarse en una línea celular estable o microorganismo clonado, de forma que se ligue operativamente con y active la expresión de un gen de elastasa

endógeno, usando técnicas tales como recombinación de homólogos dirigida, que son muy conocidas para aquellos expertos en la materia, y se describen, por ejemplo, en Chappel, patente de EE.UU. nº 5.272.071; publicación PCT nº. WO 91/06667, publicada el 16 de mayo de 1991. La secuencia heteróloga puede incluir adicionalmente los péptidos señal, secuencias de escisión y/o secuencias de activación de la presente invención.

5.4 PROCEDIMIENTOS DE FABRICACIÓN DE PROTEÍNAS ELASTASAS MADURAS

Una célula huésped de la invención, tal como una célula huésped procariota o eucariota en cultivo, puede usarse para producir una proteína elastasa de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona además procedimientos para producir una proteína elastasa de la invención usando las células huésped de la invención. En una realización, el procedimiento comprende cultivar la célula huésped de invención (en la que un vector de expresión recombinante que codifica una proteína elastasa de la invención se ha introducido) en un medio adecuado de forma que se produzca la proteína elastasa. En otra realización, el procedimiento comprende además aislar la proteína elastasa del medio o la célula huésped.

La presente invención proporciona además procedimientos para producir las proteínas elastasas inmaduras de la invención que comprenden cultivar una célula huésped manipulada para expresar un ácido nucleico de la invención en condiciones en las que se produce la proteína proelastasa. En ciertas realizaciones también se produce la proteína preproelastasa. La presente invención proporciona además procedimientos para producir proteínas elastasas maduras de la invención que comprenden cultivar una célula huésped manipulada para expresar un ácido nucleico de la invención en condiciones en las que se produce una proteína proelastasa y someter la proteína proelastasa a condiciones de activación de forma que se produzca la proteína elastasa madura.

Condiciones de cultivo preferidas para producir las proteínas inmaduras y maduras de la invención, particularmente para la célula huésped *Pichia pastoris*, incluyen un periodo de crecimiento a un pH bajo. En las realizaciones específicas, el pH bajo es un pH de 2-6, un pH de 2-5, un pH de 3-6, un pH de 3-5, un pH de 4-6, un pH de 3-4 o cualquier intervalo cuyos límites superior e inferior estén seleccionados de cualquiera de los valores anteriores. Al final del periodo de cultivo, el pH del cultivo puede elevarse, preferentemente a un pH de 7-11, lo más preferentemente a un pH de 8.

Si la expresión de una proteína proelastasa de la invención está bajo el control de un promotor inducible por metanol, condiciones para producir una proteína elastasa inmadura o madura de la invención también pueden comprender un periodo de inducción por metanol.

Los procedimientos de producción de elastasa de la invención pueden comprender además la etapa de recuperar la proteína expresada por la célula huésped. En ciertos casos, la proteína recuperada es una proelastasa, que contiene la secuencia de activación. En otros casos, la proteína recuperada es una elastasa madura que carece de la secuencia de activación. Bajo ciertas condiciones se producen tanto las proteínas proelastasas como elastasas maduras. En otros casos se produce la preproelastasa.

Preferentemente, particularmente cuando se desee evitar la auto-activación de una proelastasa auto-activada, condiciones de cultivo para la expresión de proelastasa comprenden un periodo de crecimiento en citrato de sodio, succinato de sodio o acetato sódico. En las realizaciones específicas se usa una concentración de aproximadamente 5-50 mM, 7,5-100 mM, 10-150 mM, 50-200 mM, 75-175 mM, 100-150 mM, 75-125 mM, o de cualquier intervalo cuyos límites superior e inferior estén seleccionados de cualquiera de los valores anteriores. En una realización preferida, la concentración de citrato de sodio, succinato de sodio o acetato sódico es 90-110 mM, lo más preferentemente 100 mM.

Adicionalmente, particularmente cuando se desee eludir la degradación de proteína, condiciones de cultivo para la de expresión de proelastasa comprenden un periodo de crecimiento e inducción en el extremo inferior del intervalo de temperatura adecuado para la célula huésped en cuestión. Por ejemplo, si la célula huésped es una célula huésped de *Pichia pastoris*, el intervalo preferido es aproximadamente 22-28 °C. En las realizaciones específicas, la célula huésped de *Pichia pastoris* se cultiva a una temperatura de aproximadamente 28 °C. El crecimiento e inducción no necesita realizarse a la misma temperatura; por ejemplo, en una realización en la que se utiliza *Pichia pastoris* como célula huésped, el crecimiento puede realizarse a 28 °C, mientras que la inducción puede realizarse a 22 °C.

La activación de una proteína proelastasa auto-activada de la invención puede iniciarse mediante la adición de elastasa extrínseca en una pequeña cantidad (catalítica). Alternativamente o simultáneamente, la activación de una proteína proelastasa auto-activada de la invención puede iniciarse elevando el pH de la disolución que contiene la proteína proelastasa auto-activada. El pH es preferentemente 7-11; en las realizaciones específicas, la disolución está a un pH de 7-10, 7-9, 8-10, 8-9, o cualquier intervalo cuyos límites superior e inferior estén seleccionados de cualquiera de los valores anteriores. En una realización preferida, el pH de la disolución 7-9, lo más preferentemente 8.

En realizaciones específicas, la proelastasa auto-activada puede someterse a base Tris, durante la etapa de

5 activación. En las realizaciones específicas, la base Tris se añade a una concentración de 5-50 mM, 7,5-100 mM, 10-150 mM, 50-200 mM, 75-175 mM, 100-150 mM, 75-125 mM, o de cualquier intervalo cuyos límites superior e inferior estén seleccionados de cualquiera de los valores anteriores. En una realización preferida, la base Tris se añade a una concentración 90-110 mM, lo más preferentemente 100 mM. El pH de la base Tris es preferentemente 7-11; en las realizaciones específicas, la base Tris está a un pH de 7-10, 7-9, 8-10, 8-9, o cualquier intervalo cuyos límites superior e inferior estén seleccionados de cualquiera de los valores anteriores. En una realización preferida, la base Tris está a un pH de 7-9, lo más preferentemente 8.

10 En ciertos aspectos de la invención, la temperatura para la autoactivación de elastasa es temperatura ambiente, por ejemplo, una temperatura que oscila de 22 °C a 26 °C. En ciertas realizaciones, la etapa de activación de elastasa se realiza preferentemente con la proelastasa a una baja concentración inicial, por ejemplo, 0,1-0,3 mg/ml, para la precisión óptima de la reacción de escisión y formación mínima de variantes del extremo N.

15 En ciertas realizaciones de la invención no se requiere la adición de cantidades catalíticas de elastasa para convertir la proelastasa auto-activada en elastasa madura, ya que la proelastasa puede experimentar autoproteólisis. En ciertas realizaciones, la tasa de autoproteólisis es independiente de la concentración. Sin procurar limitar por teoría, se cree que la autoproteólisis independiente de la concentración de ciertas proteínas proelastasas auto-activadas está mediada mediante un procedimiento intramolecular en el que la molécula de proelastasa se escinde a sí misma mediante una reacción intramolecular. Sin embargo, en otras realizaciones, la activación de la proelastasa auto-activada depende de la concentración. Sin procurar limitar por teoría, se cree que la autoproteólisis dependiente de la concentración de ciertas proteínas proelastasas auto-activadas está mediada mediante una reacción intermolecular en la que la proelastasa se escinde por otra proelastasa y/o por una elastasa madura. En otras realizaciones más, ciertas proproteínas elastasas auto-activadas muestran una combinación de activación dependiente de la concentración e independiente de la concentración. En aquellos casos en los que la auto-activación sea dependiente de la concentración, la proproteína puede mantenerse en una forma más diluida para reducir la activación, si se desea. La activación de proproteínas elastasas que comprenden el dominio de escisión de propéptido de elastasa de SEC ID N°: 55 que incluye, pero no se limitan a, la proproteína de SEC ID N°: 69, puede controlarse manteniendo tales proproteínas en una forma diluida.

20 También se reconoce que ciertas variantes de secuencias del extremo N no deseadas de elastasa madura pueden acumularse en el transcurso de la producción de proteínas elastasas maduras de la presente invención. Más específicamente, las proteínas proelastasas que contienen el dominio de escisión del propéptido de elastasa de SEC ID N°: 42 que incluyen la proproteína de SEC ID N°: 6 pueden dar variantes de secuencia del extremo N en las que la escisión se ha producido en el enlace peptídico que está en el extremo C para cualquiera de los residuos en las posiciones P3 o P2. Sin embargo, la aparición de tales variantes del extremo N no deseables puede reducirse colocando ciertos aminoácidos en ciertas localizaciones en la secuencia de activación. Por ejemplo, si una prolina está presente en la posición P2, la producción de variantes del extremo N con uno o dos aminoácidos del extremo N adicionales se reduce o elimina. Por tanto, la eliminación de la necesidad de tripsina para la activación reduce o elimina la producción de la variante que carece de nueve residuos del extremo N. Adicionalmente, la aparición de variantes del extremo N no deseables puede reducirse o eliminarse realizando la reacción de activación bajo ciertas condiciones.

25 Más específicamente, en ciertas realizaciones, las condiciones de activación incluyen una etapa de "amplia conversión" durante la que variantes del extremo N producidas durante la porción inicial de la reacción de conversión se degradan posteriormente selectivamente. Las cantidades relativas de especies de proteína durante la "amplia conversión" pueden monitorizarse en tiempo real por HIC-HPLC. La degradación selectiva de variantes del extremo N no deseadas aumenta la proporción PRT-201 madura de longitud completa en la reacción de conversión y reduce la proporción de variantes del extremo N. Para proteínas proelastasas que contienen el dominio de escisión del propéptido de elastasa de SEC ID N°: 55, la etapa de amplia conversión se realiza durante 4 a 8 horas, y preferentemente aproximadamente 6 h. Para otras proteínas proelastasas, la etapa de amplia conversión puede aumentarse o disminuirse, dependiendo de la proporción de variantes del extremo N con respecto a elastasa madura (longitud completa) inmediatamente después de que se haya convertido toda la proelastasa. Si la conversión se produce en medios complejos, tales como caldo de fermentación, el periodo de una amplia conversión puede aumentarse debido a la competición en el sitio activo de elastasa madura por otras proteínas y péptidos en disolución. Alternativamente, una mezcla de elastasa madura y elastasa de variante del extremo N puede recuperarse de los medios complejos antes de la etapa de amplia conversión, reduciendo así la competición por el sitio activo y el tiempo requerido para eliminar las especies de variante del extremo N.

30 Como se ha mencionado anteriormente, durante una reacción de conversión para pro-PRT-201-55M3-003-VU, hay una reacción secundaria que conduce a la producción de variantes del extremo N. En el caso específico de pro-PRT-201-55M3-003-VU, estas variantes del extremo N han perdido las dos primeras valinas y tienen poca o ninguna actividad de elastasa. Para otras pro-proteínas mutantes se producen variantes del extremo N adicionales, algunas con adiciones y otras con diferentes deleciones. Se ha desarrollado una etapa de eliminación del extremo N que reduce las variantes del extremo N a un intervalo del 0-2%. El desarrollo de esta etapa de eliminación se desarrolló de una variedad de experimentos y observaciones. Como se ha mencionado previamente, durante la optimización de experimentos de condiciones de conversión con pro-PRT-201-42, se observó que reacciones de amplias

conversiones frecuentemente condujeron a un porcentaje muy bajo de variantes del extremo N. Posteriormente se determinó que las reacciones de conversión prolongadas permitieron que PRT-201 madura degradara selectivamente variantes del extremo N. El descubrimiento de la capacidad de PRT-201 para degradar selectivamente variantes del extremo N bajo ciertas condiciones tuvo un enorme beneficio ayudando a producir un producto de PRT-201 más purificado con menos variantes del extremo N. Esta etapa de eliminación de variantes del extremo N se implementó en un procedimiento de producción a gran escala estableciendo condiciones que permitirían que la pro-PRT-201 se convirtiera en PRT-201 madura y luego permitirían que la PRT-201 degradara las variantes del extremo N.

Un ejemplo representativo de una etapa tal se muestra en la Figura 10 como se monitorizó en tiempo real por HIC-HPLC. A aproximadamente 50 minutos, el 100% de pro-PRT-201-SSM3 se había convertido completamente en aproximadamente el 86% de PRT-201 madura y el 14% de variantes del extremo N. Se amplió la reacción de conversión que permitió que PRT-201 madura degradara selectivamente las variantes del extremo N produciendo una disminución de variantes del 14% al 2%. Con incubaciones prolongadas, las variantes del extremo N pueden degradarse selectivamente a un nivel indetectable. Si el nivel de variante del extremo N es suficientemente bajo, la actividad de PRT-201 se suprime con citrato de sodio y ajuste del pH de reacción a 5,0.

Una vez se ha obtenido elastasa madura purificada, la enzima activa puede llevarse a una disolución en la que la proteína elastasa es relativamente inactiva y disponerse en un tampón para las posteriores etapas de purificación por cromatografía en columna, por ejemplo, por cromatografía de intercambio catiónico. En general, la proteína elastasa puede disponerse en citrato de sodio a una concentración de aproximadamente 5 a 25 mM y un pH de aproximadamente 2 a 5. En una realización específica, la elastasa se dispone en citrato de sodio 20 mM, pH 5. Las fracciones eluidas se analizan entonces opcionalmente por uno, más de uno, o todos los siguientes procedimientos: (1) espectrofotometría a A280 para determinar la concentración, (2) SDS-PAGE para evaluar la pureza, (3) ensayo de actividad, por ejemplo, ensayo de SLAP, para evaluar la actividad de elastasa específica, y (4) HIC-HPLC para detectar elastasa madura y variantes del extremo N, y se reúnen fracciones con características adecuadas (por ejemplo, actividad específica aceptable, niveles aceptablemente bajos (preferentemente ausencia) de glucoformas detectables, y niveles aceptablemente bajos (preferentemente ausencia) de variantes del extremo N detectables).

Una vez se ha obtenido elastasa madura purificada, la enzima activa puede llevarse a una disolución adecuada para liofilización. En general, la proteína elastasa puede ponerse en un tampón de 1 X solución salina tamponada con fosfato ("PBS") (cloruro sódico 137 mM, fosfato de sodio 10 mM, fosfato de potasio 2,7 mM a pH 7,4) antes de la liofilización. En ciertas realizaciones, la proteína elastasa puede ponerse en un tampón de 0,1 X PBS (cloruro sódico 13,7 mM, fosfato de sodio 1,0 mM, fosfato de potasio 0,27 mM a pH 7,4) antes de la liofilización.

La expresión de una secuencia de proelastasa puede dar en algunos casos una mezcla de proteínas proelastasas y elastasas maduras. Así, la presente invención proporciona una composición que comprende tanto una proteína proelastasa como una proteína elastasa madura.

5.5 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Las proteínas elastasas maduras de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Tales composiciones normalmente comprenden la proteína elastasa y componentes farmacéuticamente inertes, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, está previsto que el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluya todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También se contemplan como componentes farmacéuticamente inertes excipientes, vehículos, cargas, aglutinantes, disgregantes, disolventes, agentes solubilizantes y colorantes convencionales. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Excepto en tanto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con una proteína elastasa madura, se contempla el uso del mismo en las composiciones. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Por consiguiente, ciertos aspectos de la presente invención se refieren a composiciones farmacéuticas. En las realizaciones específicas, la presente invención proporciona una composición que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de una elastasa tipo I humana madura y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. La elastasa tipo I humana madura que puede usarse en la composición incluye, pero no se limita a, las proteínas de SEC ID N°: 1, 4, 5, 84, 87. La elastasa tipo I humana madura puede contener cualquiera de las combinaciones de polimorfismos expuestas en la Tabla 3 anterior.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de elastasa tipo I humana madura, (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, composición farmacéutica que está libre de tripsina, o fragmentos de tripsina. En otras realizaciones, la composición farmacéutica está sustancialmente libre de tripsina o fragmentos de tripsina. Como se usa en el presente documento, el término "libre de tripsina" se refiere a una composición en la que la tripsina no se usa en ninguna porción del procedimiento de producción. Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente libre

de tripsina” se refiere a una composición en la que la tripsina está presente a un porcentaje final (es decir, peso de tripsina/peso de la composición total) de no más de aproximadamente el 0,0025% o más preferentemente, menos del aproximadamente el 0,001% en una base en peso/peso. Como se usa en el presente documento, el término “libre de” tripsina se refiere a una composición en la que la variante es indetectable, por ejemplo, por medio de un ensayo enzimático o ELISA.

En ciertos aspectos, una composición de la invención tiene menos actividad de tripsina que el equivalente de 3 ng/ml de tripsina como se mide por un ensayo de BENZ, preferentemente menos actividad de tripsina que el equivalente de 2,5 ng/ml de tripsina como se mide por un ensayo de BENZ, e incluso más preferentemente menos actividad de tripsina que el equivalente de 2 ng/ml de tripsina como se mide por un ensayo de BENZ. En una realización específica, la presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína elastasa en la que la actividad de tripsina es el equivalente de menos de 1,6 ng/ml de tripsina como se mide por un ensayo de BENZ. Ejemplos de composiciones de elastasa con menos actividad de tripsina que el equivalente de 1,6 ng/ml de tripsina como se mide por un ensayo de BENZ se proporcionan en el Ejemplo 8 más adelante. En ciertas realizaciones, los ng/ml de actividad de tripsina pueden ensayarse en una composición de elastasa tipo I humana líquida o preparación que contiene 1 mg/ml de proteína elastasa tipo I humana. Así, las actividades de tripsina también pueden describirse en términos de miligramos de proteína elastasa, por ejemplo, menos de 3 ng de actividad de tripsina/mg de proteína elastasa, menos de 1,56 ng de actividad de tripsina/mg de proteína elastasa, etc.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que están tanto libres como sustancialmente libres de variantes del extremo N no deseables de elastasa madura. Variantes del extremo N no deseables incluyen, pero no se limitan a, variantes producidas por escisión en el enlace peptídico que es el extremo C con respecto a cualquiera de los residuos en las posiciones P5, P4, P3, P2, P'1, P'2, P'3, P'4, P'6 y/o P'9. Ciertas variantes del extremo N no deseables se producen por activación de tripsina; otras se producen por autoactivación de secuencias de proelastasa que no contienen secuencias de activación optimizadas.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica está libre o sustancialmente libre de una, más de una o todas las variantes del extremo N de elastasa madura que incluyen, pero no se limitan a, SEC ID N°: 2, 3, 37, 38, 70, 71, 85, 86, 94, 95, 104, 105, 106, 107, 108. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de elastasa tipo I humana madura, (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, composición farmacéutica que está libre o sustancialmente libre de cualquier proteína con SEC ID N°: 2, 3, 37, 38, 70, 71, 85, 86, 94, 95, 104, 105, 106, 107 ó 108. En otras realizaciones, la composición farmacéutica está sustancialmente libre de variantes del extremo N de elastasa madura que incluyen, pero no se limitan a, SEC ID N°: 2, 3, 37, 38, 70, 71, 85, 86, 94, 95, 104, 105, 106, 107 ó 108. Como se usa en el presente documento, el término “libre de” una variante particular se refiere a una composición en la que la variante es indetectable, por ejemplo, por medio de ensayo de HPLC de intercambio catiónico, ensayo de HPLC de interacción hidrófoba o espectrometría de masas combinada con cromatografía de líquidos. Como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente libre” se refiere a una composición en la que la variante del extremo N está presente a un porcentaje final (es decir, peso de la variante del extremo N/peso de la composición total) de al menos menos de aproximadamente el 0,5%. En ciertas realizaciones preferidas, la composición que está sustancialmente libre de variante del extremo N es una composición en la que la concentración de variante del extremo N es menos de aproximadamente el 0,1% o menos de aproximadamente el 0,01 % o, más preferentemente, incluso menos de aproximadamente el 0,001% en una base en peso/peso. En ciertos aspectos, la presencia de variantes del extremo N se detecta por medio de ensayo de HPLC de intercambio catiónico, ensayo de HPLC de interacción hidrófoba o espectrometría de masas combinada con cromatografía de líquidos.

En ciertas realizaciones específicas, una composición farmacéutica que está libre de variantes del extremo N de SEC ID N°: 70, 71, 104 y 105 se produce por activación de una proelastasa que no contiene una arginina en la posición P1 y/o una alanina en la posición P2.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de elastasa tipo I humana madura, (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, composición farmacéutica que está sustancialmente libre de proteínas bacterianas y/o está sustancialmente libre de proteínas de mamífero distintas de dicha elastasa tipo I humana madura. Como se usa en el presente documento, la expresión “sustancialmente libre de proteínas de mamífero” o “sustancialmente libre de proteínas bacterianas” se refiere a una composición en la que tales proteínas están presentes a un porcentaje final (es decir, peso de proteínas de mamífero (distintas de elastasa y, opcionalmente, una proteína portadora tal como albúmina) o proteínas bacterianas/peso de composición total) de al menos menos de aproximadamente el 0,5%. En ciertas realizaciones preferidas, la composición que está sustancialmente libre de tales proteínas es una composición en la que la concentración de la proteína no deseable es menos de aproximadamente el 0,1% o menos de aproximadamente el 0,01%, o, más preferentemente, incluso menos de aproximadamente el 0,001% en una base en peso/peso.

En ciertos aspectos, una composición farmacéutica que está “libre de proteínas de mamífero” (distintas de elastasa) contiene elastasa que se produce a partir de una línea celular recombinante que no es una célula de mamífero y en

la que ninguna proteína con una secuencia de mamífero o sustancialmente una secuencia de mamífero está presente en cualquier porción del procedimiento de producción. En ciertos aspectos, una composición farmacéutica que está "libre de proteínas bacterianas" contiene elastasa que se produce a partir de una línea celular recombinante que no es una célula bacteriana y en la que ninguna proteína con una secuencia bacteriana o sustancialmente una secuencia bacteriana está presente en cualquier porción del procedimiento de producción.

Las elastasas tipo I humanas maduras (incluyendo variantes) de la invención están lo más preferentemente purificadas para su uso en composiciones farmacéuticas. En las realizaciones específicas, las elastasas tienen al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de pureza. En otras realizaciones específicas, las elastasas tienen hasta el 98%, 98,5%, 99%, 99,2%, 99,5% o el 99,8% de pureza.

Para formular en composiciones farmacéuticas, las elastasas tipo I humanas maduras de la invención tienen preferentemente una actividad específica de más de más de 1, más de 5, más de 10, más de 20, más de 25 o más de 30 U/mg de proteína, como se ha determinado midiendo la tasa de hidrólisis del sustrato de péptidos pequeños N-succinil-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilida (SLAP), que se cataliza mediante la adición de elastasa. Una unidad de actividad se define como la cantidad de elastasa que cataliza la hidrólisis de 1 micromol de sustrato por minuto a 30 °C y la actividad específica se define como actividad por mg de proteína elastasa (U/mg). Preferentemente, una composición farmacéutica comprende una elastasa tipo I humana madura que tiene una actividad específica dentro de un intervalo en el que el límite inferior es 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 ó 20 U/mg de proteína y en el que el límite superior es, independientemente, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ó 50 U/mg de proteína. En realizaciones a modo de ejemplo, la actividad específica está en el intervalo de 1-40 U/mg de proteína, 1-5 U/mg de proteína, 2-10 U/mg de proteína, 4-15 U/mg de proteína, 5-30 U/mg de proteína, 10-20 U/mg de proteína, 20-40 U/mg de proteína, o cualquier intervalo cuyos límites superior e inferior estén seleccionados de cualquiera de los valores anteriores.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente estables. En realizaciones específicas, una composición farmacéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica preparada por liofilización anteriormente) mantiene al menos el 50%, más preferentemente al menos el 60%, y lo más preferentemente al menos el 70% de su actividad específica después de una semana, más preferentemente después de un mes, todavía más preferentemente después de 3 meses, y lo más preferentemente después de 6 meses de almacenamiento a 4 °C. En las realizaciones específicas, la composición farmacéutica mantiene al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% de su actividad específica después de una semana, más preferentemente después de un mes, todavía más preferentemente después de 3 meses, y lo más preferentemente después de 6 meses de almacenamiento a 4 °C.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Los procedimientos para administrar elastasas para tratar o prevenir enfermedades de conductos biológicos se describen en los documentos WO 2001/21574; WO 2004/073504; y WO 2006/036804. La vía de administración más preferida es parenteral, por ejemplo, administración directa a la pared del vaso, que incluye administración local a la superficie adventicia externa de vasos quirúrgicamente expuestos y administración local a la pared de vasos usando un catéter de administración de fármaco. Las disoluciones o suspensiones usadas para administración parenteral pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, azúcares tales como sacarosa o dextranos, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol, polisorbato-80 (también conocido como Tween-80), u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones tales como fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis única o múltiples dosis hechos de vidrio o plástico. La preparación parenteral también puede encerrarse en un catéter de administración de fármaco. En todos los casos, la composición debe ser estéril.

En realizaciones específicas, una composición farmacéutica de la invención es una formulación líquida que comprende uno o más de los siguientes excipientes: dextrosa (por ejemplo, 2-10% en peso/volumen); lactosa (por ejemplo, 2-10% en peso/volumen); manitol (por ejemplo, 2-10% en peso/volumen); sacarosa (por ejemplo, 2-10% en peso/volumen); trehalosa (por ejemplo, 2-10% en peso/volumen); ácido ascórbico (por ejemplo, 2-10 mM); cloruro de calcio (por ejemplo, 4-20 mM); dextrano-70 (por ejemplo, 2-10% en peso/volumen); poloxámero 188 (por ejemplo, 0,2-1% en peso/volumen); polisorbato-80 (por ejemplo, 0,001-5% en peso/volumen, más preferentemente 0,1-5%); glicerina (por ejemplo, 0,2-5% en peso/volumen); arginina (por ejemplo, 2-10% en peso/volumen); glicina (por ejemplo, 2-10% en peso/volumen); dextrano-44 (por ejemplo, 2-10% en peso/volumen); y dextrano-18 (por ejemplo, 2-10% en peso/volumen). En ciertas realizaciones, la concentración, individualmente o en el agregado, de dextrosa, lactosa, manitol, sacarosa, trehalosa, dextrano-70, glicerina, arginina, glicina, dextrano-44 o dextrano-18 está dentro de un intervalo en el que el límite inferior es el 2,5, 4, 5 o el 7% en peso/volumen y en el que el límite superior es, independientemente, el 4, 5, 6, 8 o el 10% en peso/volumen.

Una formulación líquida puede prepararse añadiendo agua a una formulación seca que contiene una proteína elastasa madura, uno o más tampones reactivos y/o uno o más excipientes. La formulación seca puede prepararse liofilizando una disolución que comprende proteína elastasa madura, uno o más reactivos tampón, y/o uno o más

excipientes.

Una formulación líquida puede prepararse, por ejemplo, reconstituyendo proteínas elásticas liofilizadas de la invención con agua esterilizada o una disolución de tampón. Ejemplos de una disolución de tampón incluyen disoluciones estériles de solución salina o solución salina tamponada con fosfato. En una realización específica, después de la reconstitución de una formulación seca que comprende proteína elastasa madura a la concentración de proteína deseada, la disolución contiene aproximadamente cloruro sódico 137 mM, fosfato de potasio 2,7 mM, fosfato de sodio 10 mM (una concentración de solución salina tamponada con fosfato que se considera 1X) y el pH de la disolución es aproximadamente 7,4. En ciertos aspectos, la formulación seca que comprende proteína elastasa madura también contiene iones sodio, cloruro y fosfato en cantidades de forma que solo se necesite agua para la reconstitución.

Una formulación líquida también puede prepararse, por ejemplo, reconstituyendo proteínas elásticas liofilizadas con una disolución de tampón que contiene uno o más excipientes. Ejemplos de excipientes incluyen polisorbato-80 y dextrano. En una realización específica, después de la reconstitución de una formulación seca que comprende proteína elastasa madura a la concentración deseada de proteína, la disolución resultante contiene aproximadamente cloruro sódico 137 mM, fosfato de potasio 2,7 mM, fosfato de sodio 10 mM, 0,01% de polisorbato-80, y el pH de la disolución es aproximadamente 7,4. El uno o más excipientes pueden mezclarse con la proteína elastasa madura antes de la liofilización o después de la liofilización, pero antes de la reconstitución. Así, en ciertos aspectos, la formulación seca que comprende proteína elastasa madura también contiene excipientes tales como polisorbato-80 o dextrano.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona una formulación líquida que comprende: 0,001-50 mg/ml de proteína elastasa madura en una disolución de cloruro sódico 137 mM, fosfato de potasio 2,7 mM, fosfato de sodio 10 mM y que comprende 5-10%, más preferentemente 6-9%, de un excipiente seleccionado de dextrosa, lactosa, manitol, sacarosa, trehalosa, dextrano-70, glicerina, arginina, glicina, dextrano-44 o dextrano-18.

En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación líquida que comprende: 0,001-50 mg/ml de proteína elastasa madura en una disolución de cloruro sódico 137 mM, fosfato de potasio 2,7 mM, fosfato de sodio 10 mM con un pH de 7,4.

En otra realización específica, la presente invención proporciona una formulación líquida que comprende: 0,001-50 mg/ml de proteína elastasa madura en una disolución de cloruro sódico 137 mM, fosfato de potasio 2,7 mM, fosfato de sodio 10 mM y que comprende 0,01% de polisorbato-80, con un pH de 7,4.

En otra realización específica, la presente invención proporciona una formulación líquida que comprende: 0,001-50 mg/ml de proteína elastasa madura en una disolución de cloruro sódico 137 mM, fosfato de potasio 2,7 mM, fosfato de sodio 10 mM y que comprende 0,01% de polisorbato-80 y 8% de dextrano-18, con un pH de 7,4.

En otra realización específica, la presente invención proporciona una formulación líquida que comprende: 0,001-50 mg/ml de proteína elastasa madura en una disolución de cloruro sódico 137 mM, fosfato de potasio 2,7 mM, fosfato de sodio 10 mM y que comprende 8% de dextrano-18, con un pH de 7,4.

Las formulaciones líquidas de la invención preferentemente contienen una concentración final de proteínas elásticas maduras dentro de un intervalo en el que el límite inferior es 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15 ó 20 mg/ml y en el que el límite superior es, independientemente, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ó 1500 mg/ml.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona una formulación líquida que comprende: 0,0001-500 mg/ml (más preferentemente 1-100 mg/ml, y todavía más preferentemente 0,5-20 mg/ml) de proteína elastasa madura en una disolución de 0,5X PBS-1,5X PBS (más preferentemente 1X PBS), comprendiendo la disolución 5-10% (más preferentemente 6-9%) de un excipiente seleccionado de dextrosa, lactosa, manitol, sacarosa, trehalosa, dextrano-70, glicerina, arginina, glicina, dextrano-44 o dextrano-18 y que tiene un pH de 6,5 - 8,5. En una realización específica, la formulación líquida comprende 0,5 mg/ml de proteína elastasa madura y 8% de dextrano-18 en 1X PBS, pH 7,4. En una realización específica, la formulación líquida comprende 5 mg/ml de proteína elastasa madura y 8% de dextrano-18 en 1X PBS, pH 7,4.

Una formulación líquida de la invención tiene preferentemente una osmolalidad dentro de un intervalo en el que el límite inferior es 100, 125, 150, 175, 200, 250 ó 275 mOsm/kg y en el que el límite superior es, independientemente, 500, 450, 400, 350, 325, 300, 275 ó 250 mOsm/kg. En realizaciones específicas, la osmolaridad de una formulación líquida de la invención preferentemente tiene una osmolalidad de aproximadamente 125 a 500 mOsm/kg, más preferentemente de aproximadamente 275 a 325 mOsm/kg, por ejemplo, como se mide por el procedimiento de depresión del punto de congelación.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales, tales como composiciones que pueden prepararse en las formulaciones líquidas de la invención, en forma unitaria de dosificación para facilidad de la administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en el presente

documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que va a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de proteína elastasa madura calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

5 Como se define en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína elastasa madura (es decir, una dosificación eficaz) oscila de aproximadamente 0,0033 mg - 200 mg. Para vasos con menor diámetro y paredes más delgadas, tales como aquellas en una fístula arteriovenosa radiocefálica, se prefieren dosis más pequeñas (tales como de 0,0033 mg - 2,0 mg). Para vasos con mayor diámetro y paredes más gruesas tales como arterias femorales se prefieren mayores dosis (tales como 2,05 - 100 mg).

10 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase, dispensador o catéter. En otras realizaciones más, las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase, dispensador o catéter junto con instrucciones para administración. Las instrucciones para administración pueden incluirse en forma impresa tanto dentro de como sobre un recipiente, envase, dispensador o catéter.
15 Alternativamente, las instrucciones para administración pueden incluirse tanto dentro de como sobre un recipiente, envase, dispensador o catéter en forma de una referencia a otro documento impreso o accesible por internet que proporciona las instrucciones.

20 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador. En otras realizaciones más, las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para administración. Las instrucciones para administración pueden incluirse en forma impresa tanto dentro de como sobre un recipiente, envase o dispensador. Alternativamente, las instrucciones para administración pueden incluirse tanto dentro de como sobre un recipiente, envase o dispensador en forma de una referencia a otro documento impreso o accesible por internet que proporciona las instrucciones.

25 La invención incluye procedimientos para preparar composiciones farmacéuticas. Una vez se produce una elastasa madura según la invención, puede liofilizarse y guardarse hasta que se reconstituya en una formulación farmacéutica adecuada para administración. En una realización a modo de ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento de aislamiento de una elastasa tipo I humana madura liofilizada que comprende: (a) cultivar una
30 célula huésped, tal como una célula huésped de *Pichia pastoris*, manipulada para expresar una molécula de ácido nucleico que codifica un marco de lectura abierto de preproelastasa en condiciones en las que el marco de lectura abierto se expresa, en el que dicho marco de lectura abierto comprende secuencias de nucleótidos que codifican en una dirección de 5' a 3', (i) un péptido señal operable en *Pichia pastoris*; (ii) una secuencia de activación que comprende una secuencia de reconocimiento de elastasa; y (iii) la secuencia de proteína elastasa tipo I madura,
35 produciendo así una proteína proelastasa; (b) someter la proteína proelastasa a condiciones de autoactivación, produciendo así una elastasa tipo I madura, en el que las condiciones de autoactivación incluyen, por ejemplo: (i) cambiar el pH de una disolución que contiene la proteína proelastasa, por ejemplo, a un pH de 6,5-11, preferentemente 8-9; o (ii) purificar la proteína proelastasa, por ejemplo, por cromatografía de intercambio iónico, y someter la disolución a amplia conversión para eliminar variantes del extremo N, produciendo así elastasa tipo I
40 humana madura; (c) opcionalmente, purificar la elastasa tipo I humana madura, por ejemplo, etapa de cromatografía de intercambio iónico para cromatografía de pulimento; y (d) liofilizar la elastasa tipo I madura, aislando así una elastasa tipo I humana madura liofilizada. La elastasa tipo I madura es preferentemente una elastasa tipo I humana. En ciertos aspectos, la elastasa tipo I madura liofilizada tiene preferentemente más del 95% de pureza; en las realizaciones específicas, la elastasa tipo I madura liofilizada tiene más del 98% o más del 99% de pureza.

45 La proteínas elastasas maduras de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Así, en una realización a modo de ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento de generación de una composición farmacéutica que comprende una elastasa tipo I humana madura, comprendiendo dicho procedimiento
50 (i) aislar una elastasa tipo I humana madura liofilizada según los procedimientos descritos anteriormente (por ejemplo, en la Sección 5.4); y (ii) reconstituir la elastasa tipo I humana madura liofilizada en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5.6 DOSIS EFICAZ

55 La presente invención generalmente proporciona el beneficio de administración parenteral, preferentemente local, de proteínas elastasas recombinantes, solas o en combinación con otros agentes, para tratar o prevenir enfermedad en conductos biológicos.

60 En ciertas realizaciones, como una alternativa a la administración parenteral, puede usarse la administración por vía oral de agentes para tratar o prevenir enfermedad en conductos biológicos.

65 La toxicidad y eficacia terapéutica de las proteínas elastasas utilizadas en la práctica de los procedimientos de la invención puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/DE50. Tal información puede usarse

para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos.

5.7 PROCEDIMIENTOS DE ADMINISTRACIÓN

5 La invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden novedosas proteínas elastasas y procedimientos de uso de las mismas para prevenir o tratar enfermedad en conductos biológicos. Tales composiciones farmacéuticas pueden formularse de un modo convencional como se describe en la Sección 5.5 anterior.

10 La composiciones de elastasa de la presente invención pueden administrarse al segmento deseado del conducto biológico que está tratándose por un dispositivo conocido para un experto en la materia por ser aceptable para la administración de disoluciones a la pared de una arteria o vena, por ejemplo, una jeringuilla, un catéter de administración de fármaco, una aguja de administración de fármaco, un polímero de administración de fármaco implantado, tal como una preparación de hoja o microesfera, un catéter implantable o una prótesis endovascular recubierta de polímero, preferentemente una prótesis endovascular autoexpansora.

15 En ciertas realizaciones, la administración al segmento deseado puede guiarse por visualización directa, ultrasonidos, TAC, orientación fluoroscópica, RMN u orientación endoscópica.

20 En ciertos aspectos de la presente invención, la administración de una elastasa a un conducto biológico comprende aplicar una formulación líquida de elastasa directamente a la superficie adventicia externa de una arteria o vena quirúrgicamente expuesta. En aspectos específicos de la presente invención, la administración se realiza con una jeringuilla.

25 En ciertos aspectos de la presente invención, la administración de una elastasa a un conducto biológico comprende localizar un aparato de administración en estrecha proximidad al segmento del conducto biológico que va a tratarse. En algunas realizaciones, durante la administración de la proteína elastasa por un aparato de administración, una parte del aparato de administración puede insertarse en la pared del conducto biológico. En algunas realizaciones, la luz del conducto biológico puede presurizarse mientras que la proteína elastasa se administra al segmento presurizado del conducto biológico. En algunas realizaciones, la luz del conducto biológico se presuriza por acción mecánica. En algunas realizaciones, la luz del conducto biológico se presuriza con un catéter con globo. En algunas realizaciones, la presión se aplica a la pared interna del conducto biológico por un miembro autoexpansor que es parte de un catéter o dispositivo. En algunas realizaciones, la proteína elastasa se administra y la presurización se realiza por el mismo dispositivo. En algunas realizaciones, el conducto biológico está quirúrgicamente expuesto y la proteína elastasa se administra a la luz o se aplica a la superficie externa del conducto biológico *in vivo*. En las realizaciones que implican administración luminal, la circulación sanguínea a través del vaso puede detenerse con una pinza o para permitir que la elastasa se ponga en contacto con la pared del vaso durante periodos de tiempo prolongados y para prevenir la inhibición de la elastasa por suero. En algunas realizaciones, el conducto biológico se extrae quirúrgicamente y la elastasa se administra a la superficie luminal y/o a la superficie externa del conducto *in vitro*. El conducto tratado puede entonces, en ciertas realizaciones, devolverse al cuerpo.

40 En otros aspectos de la presente invención, la administración de una elastasa a un conducto biológico implica el uso de una formulación de polímero que se coloca como prótesis endovascular dentro del vaso que va a tratarse, una pinza o tira aplicada a la superficie externa del conducto biológico, o una envoltura sobre o alrededor del vaso que va a tratarse, u otros dispositivo en, alrededor de o próximos al vaso que va a tratarse.

45 En todavía otros aspectos de la presente invención, una elastasa se inyecta percutáneamente en una región de tejido con el fin de dilatar las arterias y/o vena dentro de esa región, que incluye arterias colaterales. En otros aspectos, una elastasa se inyecta percutáneamente directamente en la pared de una arteria o vena o en los tejidos de alrededor con el fin de dilatar un segmento específico del vaso. En las realizaciones que tienen como objetivo el tratamiento de vasos del corazón, una proteína elastasa puede tanto administrarse percutáneamente al espacio pericárdico como aplicarse directamente a vasos coronarios quirúrgicamente expuestos.

50 Los dispositivos médicos que pueden usarse para administrar las proteínas elastasas de la invención a vasos sanguíneos se describen en la Sección 5.9 más adelante.

5.8 KITS

60 La presente invención proporciona kits para poner en práctica los procedimientos de la presente invención. Un kit "terapéutico" de la invención comprende en uno o más recipientes uno o más de los agentes descritos en el presente documento como útiles para tratar o prevenir enfermedad en conductos biológicos, opcionalmente junto con cualquier agente que facilite su administración. Un kit alternativo de la invención, el kit de "fabricación", comprende en uno o más recipientes uno o más de los agentes descritos en el presente documento como útiles para la preparación de proteínas elastasas recombinantes.

65 El kit terapéutico de la invención puede comprender opcionalmente componentes adicionales útiles para realizar los

procedimientos de la invención. A modo de ejemplo, el kit terapéutico puede comprender vehículos farmacéuticos útiles para formular los agentes de la invención. El kit terapéutico también puede comprender un dispositivo o un componente de un dispositivo para realizar los procedimientos terapéuticos de la invención, por ejemplo, una jeringuilla o aguja. También se contempla la inclusión de dispositivos tales como catéteres para inyección intramural o perivascular o catéteres para inyección intraluminal en los kits terapéuticos. En ciertas realizaciones, los agentes de la invención pueden proporcionarse en forma de dosis unitaria. Además, o alternativamente, los kits de la invención pueden proporcionar un material de instrucciones que describe el cumplimiento de uno o más procedimientos de la invención, o un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, aviso que refleja la autorización por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana. Los materiales de instrucción pueden incluirse en forma impresa tanto dentro de como sobre uno o más recipientes del kit. Alternativamente, los materiales de instrucción pueden incluirse tanto dentro de como sobre uno o más recipientes del kit en forma de una referencia a otro documento impreso o accesible por internet que proporciona los materiales de instrucción.

En realizaciones específicas, un kit de la invención comprende un dispositivo médico como se describe en la Sección 5.9 más adelante.

El kit de fabricación de la invención puede comprender opcionalmente componentes adicionales útiles para realizar los procedimientos de la invención.

5.9 DISPOSITIVOS MÉDICOS ÚTILES PARA LA ADMINISTRACIÓN DE PROTEÍNAS ELASTASAS

En el presente documento se proporcionan dispositivos médicos que pueden usarse para administrar las proteínas elastasas de la presente invención a un conducto biológico, tal como una arteria o vena. Tales dispositivos se describen más adelante y en la solicitud provisional nº 61/025.084, presentada el 31 de enero de 2008, la solicitud provisional nº 61/025.463, presentada el 1 de febrero de 2008, y la solicitud provisional nº 61/075.710, presentada el 25 de junio de 2008.

Las proteínas elastasas de la presente invención también pueden administrarse a conductos biológicos mediante catéteres convencionales.

En una realización, un dispositivo médico útil para administración de proteínas elastasas tiene un eje longitudinal central, y comprende uno o más activadores, en el que el uno o más activadores pueden existir en una configuración restringida en la que una longitud de dicho uno o más activadores está orientada sustancialmente paralela al eje longitudinal de dicho dispositivo médico y una configuración sin restringir en la que al menos una parte de la longitud de dicho uno o más activadores está orientada sustancialmente no paralela al eje longitudinal central del dispositivo. Después de colocar el dispositivo en un sitio diana adyacente a la pared de un conducto biológico, uno o más activadores (y si se desea, todos los activadores) pueden liberarse de una configuración restringida y se permite que adopten una configuración sin restringir, haciendo así contacto con la pared del conducto biológico. El uno o más activadores pueden ser de cualquier forma, y en las realizaciones preferidas, el movimiento del uno o más activadores de la configuración restringida a la configuración sin restringir se produce tras la liberación de una fuerza limitante por el cirujano del dispositivo, pero sin la contribución por el cirujano de cualquier fuerza deformante al dispositivo o el tejido diana.

En una primera realización específica, mostrada en la Figura 22, el dispositivo es un catéter 10 de administración de líquido que comprende uno o más activadores que están formados como un par de chavetas 12, 14 alargadas, cuyas regiones intermedias son móviles entre una configuración restringida que está orientada sustancialmente paralela al eje longitudinal central del montaje de catéter y una configuración sin restringir en la que al menos una parte del par de chavetas está orientada sustancialmente no paralela a dicho eje longitudinal central (véanse las porciones izquierda I y derecha D de las longitudes de chaveta en la Figura 23). La una o más chavetas 12, 14 pueden construirse como bandas o alambres alargados que tienen cada uno extremos proximales y distales opuestos. En una realización preferida, las chavetas tienen superficies 24, 26 interiores enfrentadas planas y superficies 28, 30 exteriores orientadas opuestas planas. En esta realización, las chavetas 12, 14 pueden convertirse entre posiciones restringidas y posiciones sin restringir, como se muestra respectivamente en las Figuras 22 y 23. En una realización, el par de chavetas está posicionado espalda contra espalda en sus configuraciones restringidas como se muestra en la Figura 22.

El catéter 10 comprende además uno o más penetradores 16, 18 de tejido asegurados a una o más superficies de la una o más chavetas 12, 14, un componente 20 del catéter central que tiene una longitud alargada y un componente 22 del catéter exterior que puede proteger el penetrador o penetradores de tejido durante el movimiento del catéter dentro del conducto biológico.

Los penetradores 16, 18 de tejido pueden construirse de cualquier material adecuado. Ejemplos preferidos de tales materiales incluyen, pero no se limitan a, níquel, aluminio, acero y aleaciones de los mismos. En una realización específica, los penetradores de tejido se construyen de nitinol.

El componente 20 del catéter central y el componente 22 del catéter exterior pueden construirse de materiales normalmente empleados en la construcción de catéteres. Ejemplos de tales materiales incluyen, pero no se limitan a, silicona, poliuretano, nailon, Dacron y PEBAX™.

5 Los activadores están preferentemente contruidos de un material resistente flexible. En una realización preferida, el material resistente flexible puede restringirse tras la aplicación de una fuerza limitante, por ejemplo, cuando los activadores están en la configuración restringida, y adoptar su forma original sin restringir cuando la fuerza limitante se elimina, por ejemplo, cuando los activadores están en la configuración sin restringir. Puede usarse cualquier material resistente flexible tal, que incluye, pero no se limita a, acero quirúrgico, aluminio, polipropileno, materiales olefínicos, poliuretano y otros materiales de caucho o plástico sintéticos. El uno o más activadores están contruidos lo más preferentemente de un material con memoria de forma. Ejemplos de tales materiales con memoria de forma incluyen, pero no se limitan a, aleaciones de cobre-cinc-aluminio-níquel, aleaciones de cobre-aluminio-níquel y aleaciones de níquel-titanio (NiTi). En una realización preferida, el material con memoria de forma es nitinol. En una realización preferida, cuando el par de chavetas asume la configuración sin restringir, las propiedades de memoria de forma del material a partir del cual se forma cada chaveta hacen que las chavetas, sin la aplicación de ninguna fuerza deformante externa, se inclinen radialmente separándose en un único plano como se muestra en la Figura 23.

Una o más de las chavetas (y preferentemente cada una de las chavetas) tiene un conducto 32, 34 de administración de fluido flexible que se extiende a lo largo de la longitud de la chaveta, o dentro de la chaveta, como se muestra en la Figura 24. A medida que las chavetas 12, 14 se mueven de sus configuraciones restringidas rectas a sus configuraciones sin restringir inclinadas, los conductos 32, 34 de administración de fluido también se mueven de configuraciones rectas a configuraciones inclinadas. En una realización, los conductos 32, 34 de administración de fluido son conductos tubulares separados que están asegurados a lo largo de las longitudes del par de chavetas 12, 14. En otra realización, los conductos de administración de fluido son conductos formados en o dentro del material de las chavetas.

Una o más de las chavetas (y preferentemente cada una de las chavetas 12,14) también se forma con una vía 36, 38 de cremallera que se extiende a lo largo de una longitud de la chaveta (Figura 24). Las vías 36, 38 de cremallera están formadas de tanto el mismo material que las chavetas 12, 14 como de un material que se flexiona con las chavetas 12, 14.

Uno o más de los penetradores 16, 18 de tejido está asegurado a las superficies 28, 30 exteriores del par de chavetas 12, 14 (Figura 24). Los penetradores 16, 18 de tejido están conectados a y se comunican con los conductos 32, 34 de administración de fluido que se extienden a lo largo de las longitudes de las chavetas 12, 14. Los penetradores 16, 18 de tejido están posicionados para sobresalir sustancialmente perpendiculares de las superficies 28, 30 exteriores de las chavetas 12, 14. Los penetradores 16, 18 de tejido tienen perforaciones interiores huecas que se comunican con los conductos 32, 34 de administración de fluido de las chavetas. Los extremos distales de los penetradores de tejido tienen puertos de administración de fluido que se comunican con las perforaciones interiores de los penetradores de tejido.

El dispositivo permite la administración de fluidos en o través de una o más capas distintas de una pared de un conducto biológico, por ejemplo, una pared vascular. La pared vascular comprende numerosas estructuras y capas, que incluyen la capa endotelial y la capa de membrana basal (conjuntamente la capa de la íntima), la lámina elástica interna, la capa media y la capa adventicia. Estas capas están dispuestas de forma que el endotelio se exponga a la luz del vaso y la membrana basal, la lámina elástica interna, la media y la adventicia están cada una sucesivamente dispuestas en capas sobre el endotelio, como se describe en la publicación de solicitud de EE.UU. nº 2006/0189941A1. Con los dispositivos médicos de la presente invención, la profundidad a la que los penetradores 16, 18 de tejido pueden penetrar se determina por la longitud de cada penetrador 16, 18 de tejido. Por ejemplo, si la capa diana es la capa adventicia, se usan penetradores 16, 18 de tejido que tienen una longitud definida suficiente para la penetración a la profundidad de la capa adventicia con utilización del dispositivo. Asimismo, si la capa diana es la capa media, se usan penetradores 16, 18 de tejido que tienen una longitud definida suficiente para la penetración a la profundidad de la capa media con utilización del dispositivo.

En realizaciones específicas, la longitud de los penetradores 16, 18 de tejido puede oscilar de aproximadamente 0,3 mm a aproximadamente 5 mm para aplicaciones vasculares, o hasta aproximadamente 20 mm o incluso 30 mm para aplicaciones que implican otros espacios biológicos o conductos, por ejemplo, en aplicaciones colónicas. Los penetradores 16, 18 de tejido tienen preferentemente un diámetro de aproximadamente 0,2 mm (33 de calibre) a aproximadamente 3,4 mm (10 de calibre), más preferentemente 0,2 mm a 1,3 mm (aproximadamente 33 a 21 de calibre). Las puntas distales de los penetradores de tejido pueden tener un bisel estándar, un bisel corto o un bisel corto real. En una realización alternativa, los penetradores de tejido unidos a una chaveta cualquiera no son de longitudes idénticas, pero pueden configurarse de forma que sus extremos distales se alineen de manera que sean equidistantes de la pared del conducto biológico cuando el dispositivo médico está en la posición sin restringir, por ejemplo, durante uso.

El componente 20 del catéter central tiene una longitud alargada con extremos proximales y distales opuestos, mostrado a la izquierda y derecha respectivamente en la Figura 22. En una realización, el componente 20 del catéter

central tiene una superficie exterior cilíndrica que se extiende a lo largo de su longitud alargada. Los extremos proximales de las chavetas 12, 14 están unidos, por ejemplo, soldados o pegados, al extremo distal del componente 20 del catéter central, mientras que los extremos distales de las chavetas 12, 14 están unidos, por ejemplo, soldados o pegados, a una punta 40 guía del catéter. La punta 40 tiene una superficie exterior suave que se diseña para moverse fácilmente en el conducto biológico. Una perforación 48 de alambre guía se extiende a lo largo de la longitud del catéter 20 central y la punta 40. La perforación de alambre guía está dimensionada para recibir un alambre guía en ajuste deslizante a través de la perforación.

Un par de luces 44, 46 de administración de fluido se extienden a través del interior del componente 20 del catéter central durante la longitud entera del componente de catéter (Figura 25). En el extremo distal del componente 20 del catéter central el par de luces 44, 46 de administración de fluido se comunica con el par de conductos 32, 34 de administración de fluido que se extienden a lo largo de las longitudes de las chavetas 12, 14 hacia los penetradores 16, 18 de tejido. Una perforación 48 de alambre guía también se extiende a través del interior del componente 20 del catéter central desde el extremo proximal al extremo distal del componente del catéter central (Figura 25). El extremo proximal del componente 20 del catéter central está provisto de un par de conos 50, 52 de Luer (Figura 22). En una realización, cada uno de los conos 50, 52 de Luer se comunica con una de las luces 44, 46 de administración de fluido que se extienden a través de la longitud del catéter central. Cada cono 50, 52 de Luer se diseña para conectarse con una fuente de administración de fluido para comunicar un fluido a través de cada cono 50, 52 de Luer, luego mediante cada luz 44, 46 de administración de fluido que se extiende a través del componente 20 del catéter central, luego a través de cada conducto 32, 34 de administración de fluido que se extiende a lo largo de las longitudes del par de chavetas 12, 14, y luego a través de los penetradores 16, 18 de tejido asegurados a cada una del par de chavetas. En otra realización, cada cono 50, 52 de Luer se comunica independientemente con ambas luces 44, 46 de administración de fluido que se extienden a través de la longitud del componente del catéter central. En esta configuración, un primer fluido puede administrarse a través de un primer cono de Luer a ambos penetradores 16, 18 de tejido y un segundo fluido puede administrarse a través de un segundo cono de Luer a ambos penetradores 16, 18 de tejido. La administración de fluido a ambos penetradores de tejido de cada cono de Luer puede lograrse por un conducto independiente que se extiende de cada cono de Luer a un depósito 61 común distal como se muestra en la Figura 32. Este depósito se comunica con ambos penetradores 16, 18 de tejido. Alternativamente, en otra realización, el dispositivo médico de la presente invención comprende solo un único cono de Luer conectado a una única luz de administración que se extiende a través del catéter central, que entonces está unido a un depósito común distal, que permite la administración de un único fluido a ambos penetradores 16, 18 de tejido.

El componente 22 del catéter exterior tiene una configuración tubular que rodea el par de chavetas 12, 14 y la mayoría del catéter 20 central (Figura 22). El componente 22 del catéter tiene una longitud alargada que se extiende entre los extremos proximales y distales opuestos del componente de catéter mostrado a la izquierda y derecha, respectivamente en la Figura 22. El extremo distal del componente de catéter está dimensionado para ajustarse en un ajuste seguro con la punta 40 guía, en la que la superficie exterior de la punta 40 se fusiona con la superficie exterior del componente 22 del catéter cuando el extremo distal del componente de catéter se engancha con la punta. La configuración tubular del componente 22 del catéter está dimensionada de manera que una superficie interior del componente 22 del catéter se separe hacia afuera de la pluralidad de penetradores 16, 18 de tejido sobre el par de chavetas 12, 14 en las posiciones restringidas del par de chavetas. El extremo proximal del catéter 20 central se extiende más allá del extremo proximal del componente 22 del catéter cuando el extremo distal del componente de catéter se engancha con la punta 40 guía del catéter.

Se proporciona una conexión 54 mecánica entre el extremo proximal del componente 22 del catéter exterior y el extremo proximal del componente 20 del catéter central que permite que el componente del catéter exterior se mueva hacia atrás a lo largo de las longitudes del par de chavetas 12, 14 y el componente 20 del catéter central haciendo que el extremo distal del componente 22 del catéter exterior se separe de la punta 40 guía y pase sobre el par de chavetas 12, 14, y hacia delante sobre la longitud del componente 20 del catéter central y sobre las longitudes del par de chavetas 12, 14 para enganchar el extremo distal del componente 22 del catéter exterior con la punta 40 (Figura 22). La conexión 54 mecánica podría proporcionarse por un asa o botón que desliza manualmente el componente 22 del catéter exterior sobre el componente 20 del catéter central. La conexión 54 también podría proporcionarse por una rueda selectora o mecanismo activador. Además, la conexión 54 podría proveerse de un indicador audible o táctil (tal como que haga clic) del movimiento gradual del componente 22 del catéter exterior con respecto al componente 20 del catéter central.

En una realización, el componente 22 del catéter exterior está provisto de un único recorrido 56 de cremallera que se extiende a lo largo de la longitud entera de un lado del componente 22 del catéter exterior sobre la superficie interior del componente de catéter exterior (Figura 24). El recorrido 56 de cremallera en el interior del componente 22 del catéter exterior se engancha en un ajuste deslizante con las vías 36, 38 de cremallera a un lado de cada una de las chavetas 12, 14. Avanzando el componente 22 del catéter exterior hacia delante a lo largo de las longitudes del componente 20 del catéter central y el par de chavetas 12, 14 hacia la punta 40 guía del montaje de catéter se provoca que el recorrido 56 de cremallera del componente de catéter exterior se deslice a lo largo de las vías 36, 38 del par de chavetas 12, 14. Esto mueve el par de chavetas 12, 14 de su configuración sin restringir inclinada, mostrada en la Figura 23, hacia su configuración restringida espalda contra espalda mostrada en la Figura 22. El

enganche de las vías 36, 38 de la chaveta en el recorrido 56 de cremallera del componente 22 del catéter exterior sujeta el par de chavetas 12, 14 en sus posiciones relativas espalda contra espalda mostradas en la Figura 22. Con el componente 22 del catéter exterior avanzado sobre el componente 20 del catéter central y el par de chavetas 12, 14 hacia donde el extremo distal del componente 22 del catéter exterior se engancha con la punta 40 guía, los penetradores 16, 18 de tejido se cubren y el montaje de catéter de la presente invención puede moverse con seguridad hacia adelante o hacia atrás en un conducto biológico. El componente 22 del catéter exterior cubre los penetradores 16, 18 de tejido que sobresalen del par de chavetas 12, 14 y el enganche del componente 22 del catéter exterior con la punta 40 guía distal provee al montaje de catéter de una superficie exterior suave que facilita la inserción del montaje de catéter en y a través de un conducto biológico tal como un vaso sanguíneo. En otra realización, el componente 22 del catéter exterior está provisto de dos recorridos de cremallera a 180 grados entre sí que se extienden a lo largo de la longitud entera del componente 22 del catéter exterior sobre la superficie interior y las chavetas tienen vías en ambos lados.

Se usa un alambre 58 guía con el montaje de catéter (Figura 22). El alambre 58 guía se extiende a través de la perforación 48 de alambre guía del componente del catéter central, a lo largo de las chavetas 12, 14, y a través de la salida 42 de la punta guía. En ciertas realizaciones, el alambre 58 guía tiene un núcleo sólido, por ejemplo, acero inoxidable o nitinol superelástico. El alambre guía puede construirse de material radiopaco, tanto en su totalidad como en sus porciones distales (por ejemplo, el más distal 1 mm a 25 mm o el más distal 3 mm a 10 mm). El alambre 58 guía puede recubrirse opcionalmente con un recubrimiento médicamente inerte tal como TEFLON®.

En uso de este dispositivo, el alambre 58 guía se posiciona en el conducto biológico mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. El alambre 58 guía se extiende desde el conducto biológico, a través de la salida 42 del alambre guía en la punta 40 del montaje, a través del catéter 22 de protección exterior, pasados los penetradores 16, 18 de tejido, y a través de la perforación de alambre 48 guía del catéter 20 central. En otras realizaciones, el montaje de catéter es un montaje de catéter de intercambio rápido, en el que la luz del alambre guía está presente en el extremo distal de la punta 40 guía del catéter, pero no se extiende a través de toda la longitud entera del dispositivo médico.

Después de posicionar el alambre guía, el dispositivo se hace avanzar en el conducto biológico a lo largo del alambre 58 guía previamente posicionado. Uno o más marcadores radiopacos pueden proporcionarse opcionalmente sobre el dispositivo para monitorizar la posición del dispositivo en el conducto biológico. Cualquier material que prevenga el paso de radiación electromagnética se considera radiopaco y podría usarse. Materiales radiopacos preferidos incluyen, pero no se limitan a, platino, oro o plata. El material radiopaco puede recubrirse sobre la superficie de toda o una parte de la punta 40, sobre toda o parte de las chavetas 12, 14 u otros activadores, sobre el alambre 58 guía, o sobre alguna combinación de las estructuras anteriores. Alternativamente, un anillo de material radiopaco puede unirse a la punta 40. El dispositivo puede proveerse opcionalmente de obtención de imágenes a bordo, tal como ultrasonidos intravascular o tomografía de coherencia óptica. La punta del dispositivo puede proveerse opcionalmente de óptica que se usa para determinar la posición del dispositivo o características del conducto biológico de alrededor.

Cuando el dispositivo está en su posición deseada en el conducto biológico, el cirujano usa la conexión 54 mecánica para retirar el componente 22 del catéter exterior hacia atrás lejos de la punta 40 guía. En una realización preferida, a medida que el componente 22 del catéter exterior se extrae de encima de los penetradores 16, 18 de tejido, el recorrido 56 de cremallera del componente 22 del catéter exterior se extrae sobre las vías 36, 38 del par de chavetas 12, 14. Este movimiento libera el par de chavetas 12, 14 de su configuración restringida, espalda contra espalda, mostrada en la Figura 22, y permite que el material con memoria de forma de las chavetas 12, 14 adopte sus configuraciones inclinadas sin restringir mostradas en la Figura 23. A medida que las chavetas 12, 14 se mueven a sus configuraciones inclinadas sin restringir, las chavetas se ponen en contacto con la superficie interna de la(s) pared(es) del conducto biológico y los penetradores 16, 18 de tejido sobre las superficies 28, 30 exteriores de las chavetas 12, 14 se presionan sobre la superficie interior del conducto biológico en la posición del dispositivo.

Después de que los penetradores 16, 18 de tejido hayan entrado en la capa deseada de la pared de un conducto biológico, puede administrarse un fluido a través de las luces 44, 46 de administración de fluido en el componente 20 del catéter central, a través de los conductos 32, 34 de administración de fluido sobre el par de chavetas 12, 14 y a través de los penetradores 16, 18 de tejido. Cuando se completa la administración de fluido, el cirujano usa la conexión 54 mecánica para mover el componente 22 del catéter exterior (que también puede denominarse un componente protector) hacia delante sobre el componente 20 del catéter central y sobre el par de chavetas 12, 14 hacia la punta 40 guía. A medida que el componente 22 del catéter exterior se mueve hacia delante sobre el par de chavetas 12, 14, el recorrido 56 de cremallera sobre el interior del componente 22 del catéter exterior pasa sobre las vías 36, 38 en el par de chavetas 12, 14, haciendo que las chavetas 12, 14 se muevan de nuevo de su configuración inclinada sin restringir a su configuración restringida. Cuando el componente 22 del catéter exterior ha avanzado en su totalidad sobre el par chavetas 12, 14 y se engancha de nuevo con la punta 40 guía, el recorrido 56 de cremallera en el componente 22 del catéter exterior contiene las chavetas 12, 14 en su configuración restringida. El dispositivo puede entonces volver a posicionarse para liberación en otra localización en el conducto biológico u otro conducto biológico, o sacarse del cuerpo.

La forma y longitud de las chavetas 12, 14 están seleccionadas de forma que diversas realizaciones del dispositivo puedan usarse en espacios biológicos o conductos de diversos tamaños o diámetros. En ciertas realizaciones, las chavetas pueden ser planas o redondeadas. Las chavetas planas tienen preferentemente una anchura que oscila de aproximadamente 0,2 mm a aproximadamente 20 mm, una altura que oscila de aproximadamente 0,2 mm a aproximadamente 5 mm y una longitud que oscila de aproximadamente 10 mm a aproximadamente 200 mm, dependiendo de la aplicación particular. Las chavetas redondeadas tienen preferentemente un diámetro que oscila de aproximadamente 0,2 mm a aproximadamente 20 mm y una longitud que oscila de aproximadamente 10 mm a aproximadamente 200 mm, dependiendo de la aplicación particular. En las realizaciones específicas, las chavetas planas tienen 3,5 mm a 5 mm, 5 mm a 10 mm, 10 mm a 15 mm, 15 mm a 20 mm de anchura, o cualquier intervalo en su interior (por ejemplo, 3,5 mm a 10 mm); 3,5 mm a 5 mm, 5 mm a 10 mm, 10 mm a 15 mm, 15 mm a 20 mm en altura, o cualquier intervalo en su interior (por ejemplo, 3,5 mm a 10 mm); y 10 mm a 20 mm, 20 mm a 40 mm, 40 mm a 80 mm, 80 mm a 120 mm, 120 mm a 150 mm o 150 a 200 mm de longitud, o cualquier intervalo en su interior (por ejemplo, 10 mm a 40 mm), o cualquier permutación de lo anterior (por ejemplo, una anchura de 5 mm a 10 mm, una altura o 3,5 a 5 mm, y una longitud de 20 a 40 mm). En otras realizaciones, las chavetas redondeadas tienen 3,5 mm a 5 mm, 5 mm a 10 mm, 10 mm a 15 mm, 15 mm a 20 mm de diámetro, o cualquier intervalo en su interior (por ejemplo, 3,5 mm a 10 mm) y 10 mm a 20 mm, 20 mm a 40 mm, 40 mm a 80 mm, 80 mm a 120 mm, 120 mm a 150 mm o 150 a 200 mm de longitud, o cualquier intervalo en su interior (por ejemplo, 10 mm a 40 mm), o cualquier permutación de lo anterior (por ejemplo, un diámetro de 5 mm a 10 mm y una longitud de 20 a 40 mm).

En una segunda realización específica, mostrada en la Figura 27, el dispositivo de la presente invención es un catéter 110 de administración de líquido que comprende un componente 112 del catéter central que tiene una longitud alargada con un eje 113 longitudinal, uno o más (y preferentemente dos) activadores resistentes flexibles que, en esta realización específica, se forman como tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido que se extienden desde la porción distal del componente 112 del catéter central. Al menos una parte de los tubos 114, 116 de presentación de tejido son móviles entre una configuración restringida que está orientada sustancialmente paralela al eje 113 longitudinal central del montaje de catéter y una configuración sin restringir que está orientada sustancialmente no paralela al eje 113 longitudinal central del catéter.

El catéter comprende además uno o más (y preferentemente dos) penetradores 118, 120 de tejido alargados flexibles que se extienden a través de los dos tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido y un tubo 122 de utilización exterior que se extiende sobre porciones de las longitudes del componente 112 del catéter central, los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido y la vía 132 intermedia.

El componente 112 del catéter central y el tubo 122 de utilización exterior pueden construirse de cualquier material adecuado para construir catéteres. Ejemplos de tales materiales incluyen, pero no se limitan a, silicona, poliuretano, nailon, Dacron y PEBAX™.

Los penetradores 118, 120 de tejido se conectan con conos 166, 168 respectivos (Figura 31). Uno o más del par de penetradores 118, 120 de tejido tiene preferentemente un diámetro de aproximadamente 0,2 mm (33 de calibre) a aproximadamente 3,4 mm (10 de calibre), más preferentemente 0,8 mm a 1,3 mm (aproximadamente 18 a 21 de calibre). Uno o más del par de penetradores de tejido puede tener un bisel convencional, un bisel corto o un bisel corto real. El par de penetradores 118, 120 de tejido están preferentemente contruidos de materiales que permiten que los penetradores de tejido se flexionen a lo largo de sus longitudes. Ejemplos de tales materiales incluyen, pero no se limitan a, níquel, aluminio, acero y aleaciones de los mismos. En una realización específica, los penetradores de tejido se construyen de nitinol. La longitud completa de los penetradores 118, 120 de tejido puede construirse de un único material, o los extremos distales (por ejemplo, el distal 1 mm al distal 20 mm), que incluyen las puntas 156, 158, de los penetradores 118, 120 de tejido, pueden construirse de un material y conectarse a los conos 166, 168 respectivos mediante un tubo construido de un material diferente, por ejemplo, plástico.

Uno o más del par de tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido está preferentemente construido de un material resistente flexible. Tal material resistente flexible puede deformarse, por ejemplo, cuando los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido están en la configuración restringida recta de la Figura 27, pero vuelve a su forma original cuando se retira la fuerza de deformación, por ejemplo, cuando los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido están en la configuración sin restringir curva mostrada en la Figura 28. Puede usarse cualquier material resistente flexible tal, que incluye, pero no se limita a, acero quirúrgico, aluminio, polipropileno, materiales olefínicos, poliuretano y otros materiales de caucho o plástico sintéticos. El par de tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido está construido lo más preferentemente de un material con memoria de forma. Ejemplos de tales materiales con memoria de forma incluyen, pero no se limitan a, aleaciones de cobre-cinc-aluminio-níquel, aleaciones de cobre-aluminio-níquel y aleaciones de níquel-titanio (NiTi). En una realización preferida, el material con memoria de forma es nitinol.

El componente 112 del catéter central tiene una longitud alargada flexible con extremos proximal 124 y distal 126 opuestos (Figura 27). El extremo 126 distal del componente del catéter central está formado como una punta guía que tiene una configuración de forma exterior que guiará el extremo 126 distal a través de un conducto biológico. Una perforación de alambre guía 128 dentro de la vía 132 intermedia se extiende a través del centro 112 del catéter central desde el extremo 124 proximal hasta el extremo 126 distal. La perforación 128 del alambre guía recibe un

alambre 130 guía alargado flexible para movimiento deslizante de la perforación 128 sobre el alambre (Figura 29). El alambre 130 guía se usa para guiar el montaje de catéter a través de un conducto biológico. En ciertas realizaciones, el alambre 130 guía tiene un núcleo sólido, por ejemplo, acero inoxidable o nitinol superelástico. El alambre guía puede construirse opcionalmente de material radiopaco, tanto en su totalidad como en sus porciones distales (por ejemplo, la más distal 1 mm a 25 mm o la más distal 1 mm a 3 mm). El alambre 130 guía puede recubrirse opcionalmente con un recubrimiento médicamente inerte tal como TEFLON®. En otras realizaciones, el montaje de catéter es un montaje de catéter de intercambio rápido en el que un alambre guía se posiciona sobre el extremo distal de la punta 126 guía y se extiende a partir del mismo.

Una vía 132 intermedia estrecha que rodea la perforación 128 del alambre guía se extiende desde la punta guía del extremo 126 distal del catéter hacia el extremo 124 proximal del catéter. La vía 132 intermedia conecta la punta 126 guía con una porción 138 base del componente del catéter central.

La porción 138 base del componente del catéter central tiene una superficie exterior cilíndrica que se extiende a lo largo de la longitud entera de la porción base. La porción 138 base se extiende a lo largo de la mayoría de la longitud total del componente 112 del catéter central. Como se muestra en la Figura 29, la perforación 128 de alambre guía se extiende a través del centro de la porción 138 base del componente del catéter central. Además, un par de luces 140, 142 de penetrador de tejido también se extienden a través de la longitud de la porción 138 base del componente del catéter central junto a la perforación 128 de alambre guía. En el extremo 124 proximal del componente del catéter central, un par de puertos 144, 146 comunican el par de luces 140, 142 con el exterior del componente 112 del catéter central (Figura 27).

En una realización alternativa, el dispositivo médico de la Figura 27 también puede comprender un único activador resistente flexible que se forma como tubo de presentación del penetrador de tejido, un único penetrador de tejido alargado flexible que se extiende a través del tubo de presentación del penetrador de tejido y conecta con un cono, y un tubo de utilización exterior que se extiende sobre porciones de las longitudes del componente del catéter central, el tubo de presentación del penetrador de tejido y la vía intermedia.

El par de primer y segundo tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido sobresalen de la porción 138 base del componente de catéter central hacia el extremo 126 distal del catéter. Cada uno de los tubos de presentación del penetrador de tejido está formado como un tubo alargado estrecho que tiene un extremo proximal que está asegurado a la porción 138 base del componente del catéter central, y un extremo 148, 150 distal opuesto. Cada uno del primer y segundo tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido tiene una perforación 152, 154 interior que se comunica con la primera luz 140 del penetrador de tejido y segunda luz 142 del penetrador de tejido respectiva en la porción 138 base del componente del catéter central.

Como se muestra en las Figuras 29 y 30, las configuraciones exteriores de los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido coinciden con la vía 132 intermedia de manera que las longitudes de los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido puedan posicionarse lado a lado sobre lados opuestos de la vía 132 intermedia. Los extremos 148, 150 distales del tubo del penetrador de tejido pueden formarse como superficies de la punta guía que también facilitan el paso del catéter a través de un sistema vascular. Los extremos 148, 150 distales del tubo del penetrador de tejido son preferentemente más largos en diámetro que los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido. En una realización específica, las puntas 148, 150 distales del tubo del penetrador de tejido son puntas redondeadas y bulbosas. Tales puntas son atraumáticas y los tubos no perforarán involuntariamente la pared de un conducto biológico. Las puntas 148, 150 se exponen y no se extienden hacia afuera más allá del diámetro de la punta 126 guía.

Cada uno de los tubos 114, 116 del penetrador de tejido está preferentemente construido de un material con memoria de forma, tal como nitinol. Los tubos 114, 116 se forman con configuraciones sin restringir curvas, mostradas en la Figura 28. Los tubos 114, 116 se mueven a las configuraciones sin restringir curvas mostradas en la Figura 28 cuando no se aplica fuerza limitante contra los tubos. Con el fin de que los tubos 114, 116 de presentación se encuentren en configuraciones restringidas rectas a lo largo de la vía 132 intermedia, debe aplicarse una fuerza limitante a los tubos para mantenerlos en sus posiciones restringidas rectas mostradas en la Figura 27. Como cada uno de los tubos 114, 116 se mueve de su configuración restringida recta mostrada en la Figura 28 a su configuración sin restringir curva mostrada en la Figura 28, las perforaciones 152, 154 del penetrador de tejido que se extienden a través de los tubos también se mueven de configuraciones rectas a configuraciones curvas.

El par de penetradores 118, 120 de tejido, desde sus puntas distales hasta los conos 166, 168, tienen longitudes que son ligeramente más largas que las longitudes combinadas de las luces 140, 142 del penetrador de tejido que se extienden a través de la porción 138 base del catéter central y las perforaciones 152, 154 de penetrador de tejido que se extienden a través de los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido. Las puntas 156, 158 de los penetradores 118, 120 de tejido están posicionadas adyacentes a los extremos 148, 150 distales de los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido y están posicionadas dentro de los orificios 152, 154 de los tubos en la configuración restringida de la Figura 27. Los extremos proximales opuestos de los penetradores 118, 120 de tejido sobresalen a través de los puertos 144, 146 112 laterales del catéter central. El par de penetradores 118, 120 de tejido están dimensionados para deslizarse fácilmente a través de las luces 140, 142 del penetrador de tejido del

componente 112 del catéter central y las perforaciones 152, 154 del penetrador de tejido de los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido. Los puertos 144, 146 laterales del componente 112 del catéter central están preferentemente a ángulos de 20° a 90° con respecto al extremo 124 proximal del catéter central, lo más preferentemente a ángulos de 30° a 60° con respecto al extremo 124 proximal del catéter central.

5 Un par de movimientos manuales del cirujano a los controladores 162, 164 de movimiento lineal pueden conectarse a los extremos proximales de los penetradores 118, 120 de tejido y pueden asegurarse a los puertos 144, 146 del catéter central (Figura 31). Los controladores 162, 164 pueden construirse para convertir movimiento del cirujano en movimiento lineal controlado de los penetradores 118, 120 de tejido a través de las luces 140, 142 del penetrador de tejido del catéter central y a través de las perforaciones 152, 154 del tubo de presentación del penetrador de tejido. En una realización, hay controladores 162, 164 giratorios que pueden moverse manualmente en una dirección, de forma que las puntas 156, 158 de inyección del penetrador de tejido en los extremos distales del penetrador de tejido puedan posicionarse de forma ajustable para extender una longitud deseada fuera de las perforaciones 152, 154 de tubos del penetrador de tejido en los extremos 148, 150 distales de tubos del penetrador de tejido. Girando los controladores en la dirección opuesta, los penetradores 118, 120 de tejido pueden retirarse en las perforaciones 152, 154 de tubos del penetrador de tejido. Cada uno de los movimientos del cirujano a los controladores 162, 164 de movimiento lineal puede proveerse de un cono 166, 168 que se comunica con la perforación interior que se extiende a través de los penetradores 118, 120 de tejido y puede usarse para conectar una jeringuilla o tubo que contiene una disolución de un agente de diagnóstico o terapéutico.

20 El tubo 122 de utilización exterior tiene una longitud tubular que rodea el catéter 112 central, los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido y la vía 132 intermedia. El tubo 122 de utilización puede estar montado sobre el componente 112 del catéter central y el par de tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido para el movimiento de deslizamiento a una posición directa del tubo 122 de utilización en la que un extremo 172 distal abierto del tubo de utilización está posicionado adyacente a los extremos 148, 150 distales de los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido como se muestra en la Figura 27, y una posición trasera del tubo 122 de utilización en el que el extremo 172 distal del tubo está posicionado adyacente a la conexión de los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido con el componente 112 del catéter central como se muestra en la Figura 28. El extremo 174 proximal opuesto del tubo 122 de utilización puede proveerse de una conexión 176 mecánica al catéter 112 central. La conexión 176 mecánica permite que el tubo 122 de utilización se mueva entre sus posiciones delantera y trasera con respecto al catéter 112 central y los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido (Figuras 27 y 28). Una conexión tal podría proporcionarse por una rueda selectora, una conexión de deslizamiento, un botón de accionamiento o pulsador, o alguna otra conexión que sea manualmente operable para hacer que el tubo 122 de utilización se mueva con respecto al catéter 112 central y los tubos 114, 116 de presentación. Cuando el tubo 122 de utilización se mueve a su posición delantera mostrada en la Figura 27, el extremo 172 distal del tubo pasa sobre las longitudes de los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido y mueve los tubos de presentación a sus posiciones restringidas que se extienden a lo largo de los lados opuestos de la vía 132 intermedia del catéter central. Cuando el tubo 122 de utilización se mueve a su posición trasera mostrada en la Figura 28, el extremo 172 distal del tubo de utilización se retira sobre la longitud de los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido y gradualmente permite que los tubos 114, 116 de presentación liberen su energía restringida y se muevan a sus configuraciones sin restringir curvas mostradas en la Figura 28.

45 En uso del catéter 110, el tubo 122 de utilización está en la posición delantera mostrada en la Figura 27. El alambre 130 guía está posicionado en un conducto biológico (tal como una arteria o vena) de una manera conocida. El catéter se hace avanzar entonces en el conducto biológico sobre el alambre guía. El alambre 130 guía se extiende desde el conducto biológico, y entra en el extremo 126 distal del componente del catéter central a través de la luz 128 del alambre guía. El alambre 130 pasa a través de la longitud 112 del catéter central y sale en el extremo proximal del componente del catéter central adyacente a los puertos 144, 146 de catéter, en los que el alambre 130 guía puede manipularse manualmente.

50 El catéter 110 puede avanzarse a través del conducto biológico y puede guiarse por el alambre 130 guía. Opcionalmente pueden proporcionarse marcadores radiopacos sobre el montaje para monitorizar la posición del montaje en el conducto biológico. Cualquier material que prevenga el paso de radiación electromagnética se considera radiopaco y puede usarse. Materiales radiopacos útiles incluyen, pero no se limitan a, platino, oro o plata. El material radiopaco puede recubrirse sobre la superficie de toda o una parte de la punta 126, sobre todo o parte de los tubos 114, 116 de presentación, sobre todo o parte de los penetradores 118, 120 de tejido, sobre el alambre 130 guía, o sobre cualquier combinación de las estructuras anteriores. Alternativamente, un anillo de material radiopaco puede unirse a la punta 126. El montaje puede proveerse opcionalmente de obtención de imágenes a bordo, tales como ultrasonidos intravascular o tomografía de coherencia óptica. La punta del montaje puede opcionalmente proveerse de óptica que es útil para determinar la posición del montaje o las características del conducto biológico de alrededor. Cuando el montaje está en una posición deseada, el tubo 122 de utilización exterior puede moverse de su posición delantera mostrada en la Figura 27 hacia su posición trasera mostrada en la Figura 28 por manipulación manual de la mecánica 176 de conexión.

65 A medida que el tubo 122 de utilización se saca de sobre el par de tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido, la energía restringida de los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido se libera y los tubos se

mueven hacia sus configuraciones curvas sin restringir mostradas en la Figura 28. Este movimiento posiciona las perforaciones 152, 154 del penetrador de tejido en los extremos 148, 150 distales de los tubos del penetrador de tejido contra las superficies interiores del conducto biológico en el que se ha insertado el montaje 110.

- 5 El movimiento del cirujano a los controladores 162, 164 de movimiento lineal puede entonces operarse manualmente para extender los extremos 156, 158 distales del penetrador de tejido desde las perforaciones del penetrador 152, 154 de tejido en los extremos 148, 150 distales de los tubos de presentación del penetrador de tejido. Puede proporcionarse un calibre en cada uno de los movimientos del cirujano a los controladores 162, 164 de movimiento lineal que proporciona una indicación visual del grado de proyección de las puntas 156, 158 del penetrador de tejido
- 10 desde los extremos 148, 150 de los tubos del penetrador de tejido a medida que giran los controladores 162, 164. Los controladores también podrían proporcionar un sonido audible o sensación táctil tal como hacer clic para indicar etapas de distancia gradual de los movimientos del penetrador de tejido. Esto utiliza las puntas 156, 158 del penetrador de tejido una distancia deseada en las paredes del conducto biológico.
- 15 En una tercera realización específica, un dispositivo médico de la presente invención es un catéter de administración de líquido que comprende uno o más penetradores de tejido construidos de un material resistente flexible. En ciertos aspectos, el dispositivo médico de la presente invención tiene un eje longitudinal central, y comprende uno o más penetradores de tejido, en el que el uno o más penetradores de tejido pueden existir en una configuración restringida en la que una longitud de dicho uno o más penetradores de tejido está orientada sustancialmente paralela al eje longitudinal de dicho dispositivo médico y una configuración sin restringir en la que al menos una parte de la longitud de dicho uno o más penetradores de tejido está orientada sustancialmente no paralela al eje longitudinal central del dispositivo. Después de posicionarse el dispositivo en un sitio diana adyacente a la pared de un conducto biológico, uno o más penetradores de tejido (y si se desea, todos los penetradores de tejido) pueden liberarse de una configuración restringida y permitirse que adopten una configuración sin restringir, haciendo así contacto con la
- 20 pared del conducto biológico. El uno o más penetradores de tejido pueden ser de cualquier forma, y en las realizaciones preferidas, el movimiento de uno o más penetradores de tejido de la configuración restringida a la configuración sin restringir se produce tras la liberación de una fuerza por el cirujano del dispositivo, pero sin la contribución por el cirujano de cualquier fuerza deformante al dispositivo o el tejido diana.
- 25 En una realización preferida, los penetradores de tejido se construyen de material resistente flexible que puede restringirse tras la aplicación de una fuerza limitante, por ejemplo, cuando los penetradores de tejido están en la configuración restringida, y adoptan su forma sin restringir original cuando la fuerza limitante se elimina, por ejemplo, cuando los penetradores de tejido están en la configuración sin restringir. Puede usarse cualquier material resistente flexible tal, que incluye, pero no se limita a, acero quirúrgico, aluminio, polipropileno, materiales olefínicos, poliuretano y otros materiales de caucho o plástico sintéticos. El uno o más penetradores de tejido están construidos lo más preferentemente de un material con memoria de forma. Ejemplos de tales materiales con memoria de forma incluyen, pero no se limitan a, aleaciones de cobre-cinc-aluminio-níquel, aleaciones de cobre-aluminio-níquel y aleaciones de níquel-titanio (NiTi). En una realización preferida, el material con memoria de forma es nitinol. En una realización preferida, cuando los penetradores de tejido asumen la configuración sin restringir, las propiedades de
- 30 memoria de forma del material del que se forma cada penetrador de tejido hacen que los penetradores de tejido, sin la aplicación de ninguna fuerza deformante externa, se muevan de una posición sustancialmente paralela al eje longitudinal del dispositivo médico a una posición sustancialmente perpendicular al eje longitudinal del dispositivo médico.
- 35 En una realización preferida, los penetradores de tejido se mantienen en la configuración restringida por un componente de catéter exterior que tiene una configuración tubular que rodea los penetradores de tejido. Se proporciona una conexión mecánica entre el componente de catéter exterior y el componente del catéter central al que están unidos los penetradores de tejido. La conexión mecánica permite que el componente de catéter exterior se mueva hacia atrás a lo largo de la longitud del componente del catéter central, destapándose así los restringidos uno
- 40 o más penetradores de tejido y permitiendo que el uno o más penetradores de tejido asuman una configuración sin restringir en la que hacen contacto con el sitio de administración diana. Un experto habitual en la materia apreciaría que esta realización específica puede adaptarse fácilmente para incorporar marcadores radiopacos para facilitar el posicionamiento del dispositivo o características de rápido intercambio para facilitar el uso del dispositivo.
- 45 El dispositivo médico de la presente invención, en sus diversas realizaciones, permite la administración de fluidos a distintas capas de una pared vascular. La pared vascular consiste en numerosas estructuras y capas, estructuras y capas, que incluyen la capa endotelial y la capa de la membrana basal (conjuntamente la capa de la íntima), la lámina elástica interna, la capa media y la capa adventicia. Estas capas están dispuestas de forma que el endotelio se exponga a la luz del vaso y la membrana basal, la íntima, la lámina elástica interna, la media y la adventicia están
- 50 cada uno sucesivamente dispuestas en capas sobre el endotelio, como se describe en la publicación de solicitud de EE.UU. nº 2006/0189941A1. Con los dispositivos médicos de la presente invención, la profundidad a la que las puntas 156, 158 del penetrador de tejido pueden penetrar en el tejido diana puede controlarse girando los controladores 162, 164. Por ejemplo, si la capa diana es la capa adventicia, la energía restringida de los tubos 114, 116 se libera, los tubos adoptan sus configuraciones curvas sin restringir mostradas en la Figura 28 y las puntas 156, 158 del penetrador de tejido se hacen avanzar con los controladores a una longitud suficiente para la penetración a la profundidad de la capa adventicia. Asimismo, si la capa diana es la capa media, la energía restringida de los tubos
- 55
- 60
- 65

114, 116 se libera, los tubos adoptan sus configuraciones curvas sin restringir mostradas en la Figura 28 y las puntas 156, 158 del penetrador de tejido se hacen avanzar con los controladores a una longitud suficiente para la penetración a la profundidad de la capa media.

5 Con los penetradores de tejido incorporados en la capa deseada de la pared del conducto biológico, un fluido puede entonces administrarse a través de los penetradores 118, 120 de tejido. Cuando se completa la administración de fluido, los controladores 162, 164 pueden manipularse para retirar las puntas 156, 158 del penetrador de tejido de nuevo a las perforaciones 152, 154 interiores de los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido. El tubo 122 de utilización puede entonces moverse a su posición delantera en la que el extremo 172 distal del tubo de
10 utilización mueve los tubos 114, 116 de presentación del penetrador de tejido de nuevo a sus posiciones restringidas mostradas en la Figura 27. Cuando el tubo 122 de utilización se ha movido a su posición delantera completa mostrada en la Figura 27, el montaje puede entonces volver a posicionarse o sacarse del cuerpo.

15 El dispositivo médico de la presente invención también permite la administración de fluidos a depósitos de placa sobre el interior de la pared del conducto biológico o dentro de la pared del conducto biológico.

20 El dispositivo médico de la presente invención también permite la administración de fluidos a espacios extracelulares o tejidos localizados fuera de la pared externa del conducto biológico (por ejemplo, a la superficie exterior de un vaso sanguíneo o un músculo posicionado contra la superficie exterior del vaso tal como miocardio).

25 Una característica ventajosa de los dispositivos de la presente invención es que los activadores, en virtud de su diseño, hacen contacto con menos de la circunferencia completa de la pared interna de un conducto biológico tras su utilización allí. En las realizaciones preferidas, los activadores hacen contacto con menos del 100% de la circunferencia de la pared interna de un conducto biológico en el que se utilizan. Más preferentemente, los
30 activadores hacen contacto con menos del 75%, 50% o el 25% de la circunferencia de la pared interna de un conducto biológico en el que se utilizan. Lo más preferentemente, los activadores hacen contacto con menos del 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5% o el 0,1% de la circunferencia de la pared interna de un conducto biológico en el que se utilizan.

35 Los dispositivos pueden usarse para administrar fluidos que comprenden una variedad de agentes terapéuticos y/o de diagnóstico a una pared de un conducto biológico. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, productos químicos, moléculas pequeñas, células y ácidos nucleicos. Un agente terapéutico administrado por el dispositivo puede tanto comprender una micropartícula como una nanopartícula, estar complejado con una micropartícula o una nanopartícula, o unirse a una micropartícula o una nanopartícula. Los agentes de proteína
40 incluyen elastasas, agentes antiproliferativos y agentes que inhiben vasoespasmo. Se contempla específicamente el uso de los dispositivos para la administración de una elastasa. Varias solicitudes de patente publicadas (documentos WO 2001/21574; WO 2004/073504; y WO 2006/036804) enseñan que la elastasa, sola y en combinación con otros agentes, es beneficiosa en el tratamiento de enfermedades de conductos biológicos, que incluyen obstrucción de conductos biológicos y vasoespasmo. Los agentes de diagnóstico incluyen, pero no se limitan a, agentes de contraste, micropartículas, nanopartículas u otros agentes de obtención de imágenes.

45 Con el dispositivo puede ponerse en práctica una variedad de procedimientos de administración de fluido. En ciertas aplicaciones pueden administrarse distintos fluidos a través de cada penetrador de tejido del dispositivo tanto simultáneamente como secuencialmente. En otras aplicaciones, el mismo puede administrarse a través de ambos penetradores de tejido tanto simultáneamente como secuencialmente. También se contemplan realizaciones y/o procedimientos en los que un primer fluido se administra a través de ambos penetradores de tejido, seguido de la administración de un segundo fluido a través de ambos penetradores de tejido.

50 También se contemplan específicamente procedimientos de uso de los dispositivos para administrar fluidos en o a través de una pared de un conducto biológico. Estos procedimientos comprenden las etapas de introducir el dispositivo en el conducto biológico, hacer avanzar el dispositivo a un sitio diana dentro del conducto, liberar los activadores de sus posiciones restringidas, opcionalmente hacer avanzar los penetradores de tejido a través de luces en los activadores para que penetren a una profundidad deseada en la pared de un conducto biológico, administrar al menos un fluido en o a través de la pared, devolver opcionalmente de nuevo los penetradores de tejido
55 a las luces de los activadores, retirar los activadores a su posición restringida, volver a colocar el dispositivo en el mismo conducto o un conducto diferente para la administración de fluido adicional si así se desea y sacar el dispositivo del conducto.

60 **6. EJEMPLOS**

Esta sección describe procedimientos de producción de elastasa tipo I recombinante para uso clínico, por ejemplo, como agente para agrandar el diámetro de vasos sanguíneos y así la luz de los vasos sanguíneos. La elastasa pancreática tipo I humana muestra el 89% de identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud entera de la elastasa pancreática tipo I porcina, con conservación completa de la "tríada catalítica" y residuos determinantes de la especificidad por sustrato. La elastasa tipo I porcina se sintetiza inicialmente como una enzima enzimáticamente
65 inactiva que se activa por tripsina para dar la enzima madura que contiene cuatro enlaces disulfuro internos y sin

glucosilación (véanse Shotton, 1970, *Methods Enzymol* 19:113-140, Elastase; y Hartley y Shotton, 1971, *Biochem. J.* 124(2): 289-299, Pancreatic Elastase. *The Enzymes* 3:323-373 y referencias en su interior).

5 Los ejemplos más adelante demuestran el desarrollo de expresión eficaz y expandible de elastasa tipo I porcina y humana recombinante y esquemas de purificación adecuados para la fabricación por cGMP de estas enzimas para estudios no clínicos y clínicos, y uso farmacéutico comercial. A la elastasa porcina madura se le ha dado el nombre PRT-102. A la elastasa tipo I humana madura se le ha dado el nombre PRT-201.

10 6.1 TERMINOLOGÍA Y ABREVIATURAS

Como se usa en el presente documento, los términos PRT-101, PRT-102, PRT-201 y pro-PRT-201 deben significar lo siguiente:

PRT-101: elastasa pancreática porcina. A menos que se indique lo contrario, la elastasa porcina pancreática empleada en los ejemplos es elastasa pancreática porcina altamente purificada comprada de Elastine Products Company, Inc, Owensville, MO, nº de catálogo EC134.

15 PRT-102: elastasa pancreática porcina tipo I recombinante madura. Debe observarse que los vectores con la designación "pPROT101-XXX" codifican PRT-102.

PRT-201: elastasa pancreática humana tipo I recombinante madura.

20 pro-PRT-201: forma de proenzima de elastasa pancreática tipo I humana recombinante que contiene una secuencia de propéptidos.

Las siguientes abreviaturas se usan en la Sección 6 de la solicitud:

25	BKGY:	medio complejo de glicerol tamponado
	BKME:	medio complejo de metanol tamponado
	CHO:	ovario de hámster chino
	<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
	ELA-1:	elastasa pancreática tipo I
	HEK:	riñón embrionario humano
30	hELA-1:	ELA-1 humana
	HIC:	cromatografía de interacción hidrófoba
	MBP:	proteína de unión a maltosa
	pELA-1:	ELA-1 porcina
	<i>P. pastoris</i> :	<i>Pichia pastoris</i>
35	PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
	PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
	RP:	fase inversa
	<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	SDS-PAGE:	electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida
40	SEC:	cromatografía de exclusión por tamaño
	USP:	Farmacopea de los Estados Unidos
	YPDS:	medio de extracto de levadura-peptona-dextrosa-sorbitol

45 6.2 EJEMPLO 1: SÍNTESIS DE ADN DE ELASTASA

La secuencia codificante de elastasa-1 humana se obtuvo de la patente de EE.UU. nº 5.162.205 (Takiguichi y col., 1992). Se hicieron varios cambios de secuencia para facilitar la clonación en los vectores de expresión (Figura 1A). Los cambios de base se encontraron dentro de la degeneración del código genético, de manera que no se cambiaron residuos de aminoácidos. Un segundo codón de terminación se añadió inmediatamente después del codón de terminación nativo para minimizar la posible ultralectura de ribosomas.

La secuencia codificante modificada se sintetizó por Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA) usando una técnica de "oligo largo" de no PCR bajo licencia de Amgen (Thousand Oaks, CA). El ADN recombinante, llamado ELA-1.2A (SEC ID Nº: 81), se clonó en el vector pUC de Blue Heron, un derivado de pUC119, y el plásmido resultante se llamó pPROT1. pPROT1 se secuenció en ambas cadenas para confirmar la secuencia correcta. Los datos de secuenciación de alta calidad con amplio solapamiento en ambas cadenas permitió asignaciones de bases inequívocas a lo largo de la secuencia entera, que se cubrió por un mínimo de cuatro reacciones de secuenciación con al menos una reacción para cada hebra.

60 6.3 EJEMPLO 2: EXPRESIÓN DE PRT-201 EN *E. COLI*

Se intentaron una variedad de estrategias de expresión en un esfuerzo por obtener elastasa humana soluble y enzimáticamente activa en *E. coli*.

65 Un conjunto de vectores de expresión de *E. coli* comprendidos en fusiones en marco de la elastasa pancreática tipo I humana (ELA-1) con el extremo carboxi de una proteína de unión a maltosa (MBP) que a su vez se fusionó con un

péptido secretor del extremo N. Tanto las secuencias codificantes de ELA-1 madura humana como de proenzima se clonaron como fusiones del extremo C en marco con la secuencia codificante de MBP del plásmido pMAL-p2G (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) para dar tanto pPROT3 (ELA-1 madura) como pPROT5 (proenzima ELA-1). La construcción de pPROT3 se efectuó obteniendo primero por mutagénesis por PCR una ELA-1 humana madura de 6,6 kb que codificaba el fragmento con un sitio SnaBI en el codón de valina del extremo N de ELA-1 humana madura y un sitio HindIII localizado 3' con respecto a los codones de terminación de ELA-1 madura. Esta mutagénesis por PCR usa un molde de pPROT1 que comprende la secuencia codificante de ELA-1.2A (SEC ID N°: 81) y dos cebadores de oligonucleótidos (5' ATC TAC GTA GTC GGA GGG ACT GAG GCC, SEC ID N°: 75; y 5' gtc gac aag ctt atc agt tgg agg cga t, SEC ID N°: 76). El fragmento de PCR de 6,6 kb resultante se aisló, se digirió con SnaBI y HindIII y posteriormente se clonó en el vector pMAL-p2G digerido con XmaI/HindIII para dar pPROT3. La construcción de pPROT3 se efectuó clonando el fragmento Scal/HindIII de pPROT1 y ligándolo en el vector pMAL-p2G que se había digerido con SnaBI y HindIII. La fusión resultante enlaza operablemente el extremo N de la región codificante de la proenzima ELA-1 humana con el extremo C de MBP de pMAL-p2G en pPROT5. El dominio de escisión de tripsina de la proproteína ELA-1 humana se preserva en pPROT5.

La cepa TB 1 de *E. coli* se transformó con pPROT3 y pPROT5 y posteriormente se indujo con IPTG para determinar si podría producirse tanto la proteína de fusión como ELA-1 humana enzimáticamente activa. En el caso de pPROT3, toda la proteína de fusión MBP-ELA-1 producida fue insoluble. No se detectó proteína de fusión MBP-ELA-1 soluble o enzimáticamente activa en el material periplásmico obtenido por choque osmótico de *E. coli* que contiene pPROT3 inducida. En el caso de pPROT5, bajos niveles de proteína MBP-proELA-1 recombinante soluble podrían detectarse en el material periplásmico obtenido por choque osmótico de *E. coli* que contiene pPROT5 inducida a través del uso de SDS-PAGE y tinción con Coomassie o por uso de anticuerpos anti-MBP en una transferencia Western (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA). La proteína MBP-proELA-1 recombinante soluble podría digerirse con tripsina para dar tanto MBP como ELA-1 humana madura. ELA-1 humana madura obtenida de inducciones de pPROT5 se ensayó posteriormente para actividad de elastasa con sustrato de péptido de SLAP. La actividad de elastasa se observó en extractos periplásmicos de pPROT5. Esta actividad enzimática de elastasa dependía de la activación de tripsina (es decir, no se observó actividad en ausencia de tripsina y la cantidad de actividad es elevada, aumentando el periodo de tiempo de activación de tripsina). Además, la actividad de elastasa dependía de pPROT5 en nada menos que no se observó actividad en los extractos de control del vector pMAL-p2G tratados en paralelo con tripsina. Finalmente, la actividad de elastasa de pPROT5 se inhibió por PMSF (un inhibidor de serina proteasa conocido).

La proteína de fusión MBP-proELA-1 recombinante se purificó posteriormente y se escindió con tripsina para obtener una ELA-1 humana madura derivada de pPROT5 enzimáticamente activa. La proteína de fusión se purificó primero sobre cromatografía de afinidad por amilosa, seguido de elución con maltosa. La MBP-proELA-1 purificada se trató entonces con tripsina inmovilizada. Siguiendo la etapa de activación de tripsina, la MBP-proELA-1 escindida se purificó por cromatografía catiónica en SP Sepharose. Sin embargo, experimentos posteriores con ELA-1 humana madura derivada de pPROT5 purificada por afinidad indicaron que solo podrían obtenerse cantidades muy limitadas de elastasa soluble y enzimáticamente activa a partir de *E. coli* que contiene pPROT5. Además, la actividad específica de ELA-1 humana madura derivada de pPROT5 purificada por afinidad fue muy baja, oscilando de 0,27 a 0,38 U/mg (U = micromol de sustrato SLAP hidrolizado por min).

También se siguió una estrategia alternativa de obtención de ELA-1 soluble y enzimáticamente activa en *E. coli*. En resumen, se construyó el vector pPROT8 que codifica una fusión de proteínas que comprende los 8 primeros residuos de aminoácidos de la subunidad alfa de lacZ de *E. coli* más 5 aminoácidos de residuos codificados por el poli ligador, seguido de la proenzima del extremo N de ELA-1 humana. Este vector se construyó ligando un fragmento de BamHI/NcoI que contiene la secuencia codificante humana de ELA-1 a partir de pPROT1 (es decir, un vector que contiene la secuencia de ELA-1.2A; SEC ID N°: 81) en pUC de pBlueHeron (Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA, EE.UU.) que se digirió con BamHI/NcoI.

La cepa EC100 de *E. coli* (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI) se transformó con pPROT8 y posteriormente se indujo con IPTG para determinar si podría producirse tanto la proteína de fusión como ELA-1 humana enzimáticamente activa. En el caso de células transformadas con EC100, toda la proteína de fusión LacZ-proELA-1 derivada de pPROT8 producida fue insoluble (es decir, se encontró en cuerpos de inclusión). Una cepa de *E. coli* que contiene mutaciones en los genes *trxB* y *gor* (la cepa Origami™, Takara Mirus Bio, Inc., Madison, WI) se transformó posteriormente con pPROT8, ya que se sabe que las cepas de *E. coli* con mutaciones en estas secuencias codificantes promueven la recuperación de proteínas recombinantes solubles y enzimáticamente activas. Aunque alguna proteína de fusión LacZ-proELA-1 derivada de pPROT8 soluble en la cepa de *E. coli trxB / gor* se recuperó tras la inducción con IPTG, no podría convertirse en ELA-1 humana enzimáticamente activa con tripsina.

6.4 EJEMPLO 3: EXPRESIÓN de PRT-201 EN LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO

Se intentaron varias estrategias de expresión en un esfuerzo por obtener elastasa pancreática tipo I humana soluble y enzimáticamente activa (ELA-1) en líneas celulares de mamífero. El vector de expresión de mamífero de alta copia pcDNA3.1 (Invitrogen) que contiene el promotor del CMV se usó como esqueleto para dos vectores de expresión de elastasa ELA-1 humana, pPROT30 y pPROT31. Para construir pPROT30, la secuencia de proenzima ELA-1

humana se amplificó por PCR y se fusionó con una secuencia señal de elastasa pancreática porcina incorporada en el cebador de PCR directo. Usando sitios de restricción incorporados en los cebadores de PCR, el producto de PCR se digirió y se ligó usando los sitios de restricción correspondientes en el vector pcDNA3.1. pPROT31 se construyó de un modo similar, excepto que se usó la secuencia codificante de ELA-1 humana madura en lugar de la secuencia codificante de proenzima en un intento de expresión directa de la enzima madura. *E. coli* se transformó con las reacciones de ligación y los clones se seleccionaron por selección de minipreparaciones. Se seleccionó un clon para cada vector de expresión basándose en patrones de digestión con restricción esperados para el inserto correcto. El ADN de plásmido se preparó para cada clon y las secuencias codificantes del vector de expresión se confirmaron por secuenciación de ADN.

Las líneas celulares de mamífero CHO, COS, HEK293 y HEK293T se transfectaron transitoriamente por separado con pPROT30 y pPROT31. Después de varios días, los sobrenadantes de cultivo celular se recogieron y se analizaron para expresión de proproteína de ELA-1 humana (pPROT30) o de proteína madura (pPROT31) por transferencia Western. Un anticuerpo policlonal anti-elastasa pancreática porcina reaccionó de forma cruzada con una banda del peso molecular esperado para la proproteína de ELA-1 humana en sobrenadantes de pPROT30 y para la proteína de ELA-1 humana madura en sobrenadantes de pPROT31.

Los sobrenadantes de pPROT30 y pPROT31 se analizaron para actividad de elastasa por ensayo de SLAP. Para pPROT30, los sobrenadantes se trataron primero con tripsina para convertir la proenzima en PRT-201 madura. No se detectó actividad de elastasa en ninguno de los sobrenadantes para cualquier vector usando el ensayo de SLAP.

6.5 EJEMPLO 4: EXPRESIÓN DE PRT-201 ACTIVADA POR TRIPSINA EN *P. PASTORIS*

El vector para la expresión secretada de *P. pastoris*, PV-1, se sintetizó por Blue Heron y se usó para clonar primero la secuencia codificante de ELA-1 humana natural. El vector PV-1 se diseñó por simple clonación, selección y expresión de alto nivel de la proteína recombinante. El vector contiene el gen de resistencia Zeocin™ para la elección directa de integrantes de múltiples copias. La fusión del extremo N del propéptido de elastasa con una secuencia tipo apareamiento α de levadura que comprende las secuencias señal de secreción de levadura, de propéptido y de espaciador como se muestra en la Figura 1B permite la secreción de la proteína expresada en los medios de cultivo. La proproteína elastasa secretada puede separarse fácilmente del sedimento de células, una primera etapa sustancial hacia la purificación. Adicionalmente, la forma de proenzima de ELA-1 humana que contiene el sitio de escisión de tripsina se seleccionó para la expresión para prevenir que expresara directamente la enzima activada madura que puede conducir a plegamiento erróneo de proteínas o toxicidad a las células que expresan la enzima recombinante.

La clonación de la construcción de expresión pPROT24-V para dirigir la expresión de la proenzima ELA-1 se llevó a cabo del siguiente modo. La región codificante de ELA-1 humana (SEC ID N°: 81) se amplificó a partir de ELA-1 de pUC de Blue Heron por PCR (Expand High Fidelity PCR System, Roche, Indianápolis, IN). El cebador directo 20F incorporó un sitio XhoI (5'-ggctcgagaaaagagaggctgaagctactcaggacctccggaaaccaatgcccg-3; SEC ID N°: 35). El cebador 24R incorporó un sitio SacII (5'-ggcgccgcttatcagttggaggcgatgacat-3'; SEC ID N°: 36). El producto de PCR resultante se purificó en gel y se clonó en pCR2.1-TOPO (Invitrogen). La secuencia codificante de ELA-1 se aisló usando XhoI y SacII, se purificó en gel y se clonó en el vector PV-1 en aquellos sitios para dar pPROT24-V (Figura 3).

El producto ligado en pPROT24-V se amplificó en la cepa TOP10 de *E. coli*. La mezcla de células se sembró en placa sobre placas de LB de baja sal complementadas con 25 microgramos/ml de Zeocin. Se preparó plásmido de ADN (Qiagen, Valencia, CA) y el inserto de ELA-1 humana se identificó por digestión con restricción. La secuencia codificante de pPROT24 se verificó por secuenciación de ambas hebras de ADN Maxiprep purificado con múltiples reacciones de solapamiento. Los datos de secuenciación de alta calidad permitieron las asignaciones de bases inequívocas y confirmaron la correcta secuencia codificante. Se prepararon disoluciones madre en glicerol de pPROT24-V/TOP 10 y se guardaron a -80 °C.

La cepa de *P. pastoris* NRRL Y-11430 natural obtenida del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, Peoria, IL, EE.UU.) se usó para la transformación. Se linealizó ADN de plásmido de pPROT24-V con SacI y la digestión completa se confirmó ejecutando una pequeña alícuota de la reacción sobre un gel de agarosa. Se usó electroporación para transformar *P. pastoris* con ADN de plásmido de pPROT24-V. Se sembraron mezclas de células sobre placas de YPDS que contenían 100 microgramos/ml de Zeocin. Después de tres días, las colonias empezaron a formarse y se seleccionaron durante varios días más para volver a extenderse sobre placas nuevas.

En general, los transformantes resistentes a fármaco se seleccionaron para la expresión en un matraz con deflectores de 1 l. Se usó una única colonia para inocular 200 ml de medio BKG Y. La composición de la disolución de BKG Y fue la siguiente: 10 g/l de glicerol, 13,4 g/l de base de nitrógeno de levadura con sulfato de amonio y sin aminoácidos (Invitrogen), 20 g/l de peptona de soja, 10 g/l de extracto de levadura, 0,4 mg/l de biotina en tampón fosfato de potasio 0,1 M (pH 5,0). El cultivo se cultivó durante dos días a 28 °C con agitación a 275 rpm. Los cultivos se sedimentaron por centrifugación a 650xg durante 10 min a temperatura ambiente. Los sedimentos de células se resuspendieron con medio de inducción de BKME, pH 5,0, resuspendiendo los sedimentos a una relación de 1 g de

células húmedas con respecto a 5 ml de medio de inducción. Una suspensión de células de 50 ml se colocó en un matraz sin deflector de 500 ml para obtener una relación 1:10 de suspensión de células con respecto a volumen de matraz. Las células se incubaron a 22 °C con agitación a 275 rpm durante 1-3 días. El metanol en el medio de inducción se repuso a una concentración final del 0,5% dos veces al día durante el transcurso de la inducción.

5 Para seleccionar para la expresión, se tomaron alícuotas de 1 ml, se transfirieron a tubos Microfuge de 1,5 ml y se centrifugaron durante 5 min a 20.000 x g en una microcentrífuga. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos y se guardaron a -80 °C. Para el análisis de SDS-PAGE, las alícuotas de sobrenadante se descongelaron y se mezclaron con 4X tampón Laemmli complementado al 5% en volumen con el agente reductor beta-mercaptoetanol. 10 Las muestras se hirvieron durante 5 min, se centrifugaron suavemente y se cargaron sobre un gel pre-colado de Tris-HCl al 8-16% de gradiente en un sistema de electroforesis Criterion (Bio-Rad). Después de la electroforesis, el gel se tiñó con Coomassie y se analizó para la expresión de la proenzima ELA-1 humana. El clon 201-24-266-VU se seleccionó como un clon de alto rendimiento para la posterior evaluación. Se preparó un banco de células de desarrollo que consiste en disolución madre en glicerol de 201-24-266-VU y se guardó a -80 °C.

15 Para la producción de ampliación a escala de proenzima ELA-1 humana usando el clon 201-24-266-VU se realizaron múltiples ejecuciones de producción que generalmente siguieron los procedimientos descritos más adelante. Si procede, se anotan las variaciones ejecución a ejecución en los procedimientos.

20 Para el cultivo celular, una serie de matraces de agitación con deflectores de 2 l (normalmente que oscilan de 20 a 40 matraces) que contienen 500 ml de medio de crecimiento BKG Y se inocularon con 250 microlitros de disolución madre en glicerol de 201-24-266-VU descongelada. Los cultivos se cultivaron a 28 °C durante 2 días en una estufa de incubación con agitación a 250 - 300 rpm. Después de 2 días, las células se sedimentaron por centrifugación y el sobrenadante se desechó. Las células se resuspendieron en medio de inducción BKME, pH 5,0, a una relación de 1 25 g de peso de células con respecto a 5 ml de medio. Se dispuso un volumen de 200-400 ml de suspensión de células en matraces sin deflectores de 2 l y se cultivaron durante 3 días en una estufa de incubación con agitación (250-300 rpm) a 22 °C. El metanol en los medios se repuso al 0,5% en volumen dos veces al día durante el transcurso de la inducción. Al final de la inducción, los cultivos de los matraces de agitación se centrifugaron para sedimentar las células. El sobrenadante se eliminó y se filtró inmediatamente a temperatura ambiente a través de una membrana de poliétersulfona de 0,22 um usando unidades de filtración a vacío de 1 l para eliminar cualquier residuo celular restante. El filtrado se almacenó a 2-8 °C durante hasta 1,5 meses. Basándose en el análisis de HIC-HPLC, el rendimiento de la proenzima ELA-1 humana a partir del clon pro-PRT-201-24-266-VU en el sobrenadante clarificado fue normalmente 200 a 250 mg/l.

35 La captura de pro-PRT-201-24-266-VU del sobrenadante se efectuó del siguiente modo. Primero, el sobrenadante de múltiples rondas de cultivos en matraz de agitación (normalmente 4 a 10 rondas) se combinó (normalmente 8 a 25 l totales), se diluyó 8 veces con agua y se ajustó a pH 5,0 con HCl 1 M. El sobrenadante diluido se cargó entonces sobre una columna de captura de intercambio iónico Macro-Prep High S de 2 l de volumen de lecho equilibrada a 2-8 °C a una tasa de 100 ml/min (velocidad de flujo lineal 76 cm/h). El programa de cromatografía comprendió las siguientes etapas: 1. Lavar la columna con 10 l (5 volúmenes de columna [VC]) de Tampón A (citrato de sodio 20 mM, pH 5,0) a 100 ml/min (76 cm/h); 2. Lavar la columna con 4 l (2 VC) de una mezcla de 90% de Tampón A y 10% de Tampón B (cloruro sódico 500 mM; citrato de sodio 20 mM, pH 5,0) para una composición de tampón final de cloruro sódico 50 mM; citrato de sodio 20 mM, pH 5,0 a 100 ml/min (76 cm/h); 3. Lavar la columna con 6 l (3 VC) de una mezcla de 80% de Tampón A y 20% de Tampón B para una composición de tampón final de cloruro sódico 100 mM; citrato de sodio 20 mM, pH 5,0 a 100 ml/min (76 cm/h); 4. Lavar la columna con 6 l (3 VC) de un gradiente lineal, a partir de 75% de Tampón A y 25% de Tampón B a 68% de Tampón A y 32% de Tampón B, a 100 ml/min (153 cm/h); 5. Eluir con un gradiente lineal de 30 l (15 VC) a partir de 68% de Tampón A y 32% de Tampón B a 0% de Tampón A y 100% de Tampón B, a 100 ml/min (76 cm/h). El eluato se recogió en fracciones de 500 - 1000 ml cada una.

50 Normalmente, se observaron dos especies de proteína predominantes por SDS-PAGE, seguido de tinción con Coomassie: la proenzima ELA-1 humana glucosilada y la proenzima ELA-1 humana no glucosilada, como se ha determinado por análisis de EM/CL posterior, eluyendo normalmente en cloruro sódico aproximadamente 320 mM, mostrado en la Figura 4. En algunas ejecuciones de producción, una proteína ligeramente más pequeña que la proenzima ELA-1 humana se observó como una especie secundaria. El posterior análisis de EM/CL de estas fracciones mostró que la mayoría de la proteína no fue proenzima de longitud completa, sino que en su lugar carecía de varios aminoácidos en el extremo N. Estas variantes del extremo N se purificaron y se sometieron a análisis de actividad de elastasa, que reveló que tenían menor actividad de elastasa que la PRT-201 de longitud completa. Las variantes del extremo N podrían producirse a partir de la proenzima ELA-1 humana que presenta un bajo nivel de actividad de elastasa durante el cultivo celular y operaciones de cromatografía de captura y tanto escindiéndose a sí mismas a través de una reacción intramolecular como escindiendo otra molécula de proenzima ELA-1 humana a través de una reacción intermolecular. Condiciones de escisión inferiores a las óptimas durante estas operaciones podrían conducir a un alto nivel de escisión errónea de la proenzima (denominado algunas veces conversión espontánea o sin controlar), produciendo principalmente variantes del extremo N, en vez de PRT-201 de longitud completa intacta.

65

Después de la inspección de los resultados de SDS-PAGE, un subconjunto de fracciones se reunió para obtener pro-PRT-201 no glucosilada purificada para posterior procesamiento. Las fracciones que contienen proenzima glucosilada o PRT-201 de longitud completa y/o variantes del extremo N (que co-migran sobre SDS-PAGE) normalmente se excluyeron del conjunto. La pro-PRT-201 reunida se guardó normalmente en un vaso de precipitados de plástico de 5 l a 2-8 °C durante varias horas hasta toda la noche antes de la conversión de proenzima a enzima madura.

La conversión de pro-PRT-201 a PRT-201 madura por tripsina inmovilizada se efectuó del siguiente modo. Las fracciones de pro-PRT-201 reunidas se dializaron en fosfato de sodio 20 mM, pH 5,0, durante la noche a 2-8 °C. Esta etapa proporciona la eliminación de citrato, que inhibe la tripsina. Tras la diálisis, la pro-PRT-201 se pasó sobre una columna de tripsina recombinante (TrypZean) inmovilizada a perlas de agarosa pre-equilibrada con fosfato de sodio 20 mM, pH 5,0. Normalmente, el tiempo de contacto entre pro-PRT-201 y TrypZean inmovilizado fue entre 3,5 y 5 min. El material de post-conversión resultante se analizó por SDS-PAGE para confirmar la conversión y posteriormente se cargó sobre una columna de pulimento Macro-Prep High S. La columna se lavó secuencialmente con 5 VC de citrato de sodio 20 mM, pH 5,0; 2 VC de citrato de sodio 20 mM, cloruro sódico 50 mM, pH 5,0; y 3 VC de citrato de sodio 20 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 5,0. La columna se lavó adicionalmente con un gradiente lineal de cloruro sódico 125 mM a cloruro sódico 160 mM en citrato de sodio 20 mM, pH 5,0. La PRT-201 se eluyó en un gradiente lineal de cloruro sódico 165 mM a 500 mM en citrato de sodio 20 mM, pH 5,0 y se recogió en fracciones. Las fracciones se analizaron para proteína por SDS-PAGE, seguido de tinción con Coomassie y para actividad de elastasa por ensayo de SLAP. Normalmente se reunieron las fracciones que tienen una actividad específica del 90% o más de la de la fracción con la mayor actividad específica. En posteriores análisis de EM/CL se encontró que las fracciones de elución tardía que tenían menor actividad específica estaban enriquecidas en variantes del extremo N de PRT-201.

Las fracciones reunidas con alta actividad específica se diafiltraron en tampón de formulación compuesto por 0,1X PBS (cloruro sódico 13,7 mM, fosfato de sodio 1 mM, fosfato de potasio 0,27 mM) a pH 5,0. Después de la concentración de PRT-201 a 1 mg/ml, el pH se ajustó a 7,4. Entonces, la disolución se tomó en alícuotas en viales de suero de vidrio con un tapón de elastómero y se liofilizaron. La liofilización se realizó normalmente con un ciclo de secado primario a -30 a -50 °C y un ciclo de secado secundario a -15 °C. Después de la liofilización, los viales se taparon a vacío y se cerraron por plegado con un sello de aluminio. Entonces, los viales se guardaron normalmente a 2-8 °C o -80 °C.

Para evaluar la estabilidad de PRT-201 liofilizada en viales, dos lotes que se fabricaron en medicamento GMP estéril se han puesto en un programa de estabilidad. El programa de estabilidad consiste en el almacenamiento del fármaco a -15 °C y extracción periódica de un subconjunto de viales para probar por los siguientes procedimientos analíticos que indican estabilidad (las especificaciones están entre paréntesis): aspecto de material liofilizado (polvo de blanco a blanquecino), aspecto después de la reconstitución (disolución incolora clara libre de partículas), actividad específica por ensayo de SLAP (25-45 U/mg), pureza por RP-HPLC (pureza total: no menos del 93%; impureza individual: no más del 2%), pureza por SDS-PAGE reducida (no menos del 93%), pureza por SDS-PAGE no reducida (no menos del 93%), inyecciones de materia particulada (conforme a la USP), agregados por SEC-HPLC (no más del 3%), contenido por vial (4,5 - 5,5 mg), pH (6,5-8,5), humedad (no supera el 5%) y esterilidad (conforme a la USP). Hasta la fecha, ambos lotes han cumplido las especificaciones indicadas en todos los momentos de tiempo probados (lote C0807117 hasta 12 meses y lote C1007132 hasta 9 meses). Estos resultados indican que PRT-201 es estable durante al menos 12 meses cuando se guardó liofilizada en viales a -15 °C.

El uso de citrato de sodio, pH 5,0, durante tanto la cromatografía de captura de pro-PRT-201 como la cromatografía de pulimento de PRT-201 convertida se basó en los datos que muestran que el citrato de sodio inhibió la actividad de elastasa de PRT-201 purificada y, por tanto, también podría inhibir la actividad de elastasa de pro-PRT-201 y PRT-201 durante las operaciones de procesamiento. Tal inhibición podría minimizar la conversión espontánea de pro-PRT-201 en variantes del extremo N y minimizar la auto-degradación de PRT-201. En un experimento en el que el tampón de ensayo de SLAP contuvo citrato de sodio 115 mM, pH 5,0, la actividad específica de PRT-201 se inhibió el 91%.

Ocasionalmente, material eluido de la columna de captura de pro-PRT-201 no se sometió a conversión por tripsina como se ha descrito anteriormente, sino que en su lugar se usó para obtener preparaciones enriquecidas en diversas especies de proteína. Por ejemplo, los conjuntos de fracciones que contenían principalmente pro-PRT-201 glucosilada, pro-PRT-201 no glucosilada o proteínas que se producen de la conversión espontánea se prepararon a partir del eluato de la columna de captura. Normalmente, estos conjuntos de fracciones se diafiltraron en fosfato de sodio 10 mM, pH 5,0, se liofilizaron y se guardaron a -80 °C.

Se realizó un estudio para determinar el efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad de pro-PRT-201 purificada con el tiempo. pro-PRT-201 liofilizada se reconstituyó en fosfato de sodio 10 mM a pH que oscilan de 3,0 a 8,4, seguido de incubación a 4 °C o 25 °C durante 7 días. Después de 7 días, las muestras de pro-PRT-201 en condiciones de pH 4,0 - 8,0 y 25 °C mostraron un enriquecimiento en PRT-201 madura que aumentó con pH reciente como se muestra por SDS-PAGE y tinción con Coomassie. Bajo las condiciones de pH 8,4 y 25 °C se observó la conversión completa de pro-PRT-201 a PRT-201 madura. Las muestras a 4 °C, de pH 4,0 a 8,4,

mostraron de poca a ninguna conversión. A pH 3,0, no se observó conversión a tanto 4 °C como 25 °C. Se ha informado en la bibliografía (Hartley y Shotton, 1971, Pancreatic Elastase. Enzymes 3:323-373) que la elastasa pancreática porcina se inactiva irreversiblemente después de almacenamiento prolongado a pH inferiores a 3,0. Así, basándose en estos resultados de este estudio y para evitar inactivar irreversiblemente PRT-201, condiciones útiles para minimizar la conversión de pro-PRT-201 purificada son almacenamiento a 4 °C entre pH 3,0 - 4,0.

6.6 EJEMPLO 5: EXPRESIÓN DE PRT-201 AUTO-ACTIVADA EN P. PASTORIS

Para obtener una proenzima de variante capaz de auto-activación, eliminando así la necesidad de activación por tripsina, se construyó una variedad de vectores de variantes de dominios de escisión de elastasa y se analizaron en cultivo a pequeña escala y experimentos de conversión. Los vectores de variantes se crearon por mutagénesis por PCR dirigida a sitio del vector pPROT24-V y posteriores vectores derivados. La mutagénesis dirigida a sitio se realizó usando ADN polimerasa Pfu Turbo (Stratagene). La cepa XL10-Gold de *E. coli* se transformó con los plásmidos resultantes. Las mezclas de células transformadas se sembraron sobre placas de LB de baja sal complementadas con 25 microgramos/ml de Zeocin. Se escogieron los clones resistentes a fármaco y se preparó ADN de plásmido (Qiagen, Valencia, CA). Los clones se confirmaron para los cambios de codón esperados por secuenciación de ambas hebras de ADN de plásmido en la región de propéptido con múltiples reacciones solapantes. *P. pastoris* se transformó con los vectores de variante y los clones se seleccionaron como se describe en el ejemplo precedente.

Un resumen de las variantes de dominios de escisión de elastasa que se crearon se proporciona en la Tabla 4 más adelante:

Nombre de la Secuencia de Propéptido	Enlace Escindido							
	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3
24	Glu	Thr	Asn	Ala	Arg	Val	Val	Gly
40	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Gly
41	Glu	Thr	Asn	Ala	Ala	Ala	Val	Gly
42	Glu	Thr	Asn	Ala	Ala	Val	Val	Gly
43	Glu	Thr	Asn	Ala	Pro	Val	Val	Gly
44	Glu	Thr	Gly	Ala	Gly	Ile	Val	Gly
45	Glu	Thr	Val	Pro	Gly	Val	Val	Gly
46	Glu	Thr	Ala	Pro	Gly	Val	Val	Gly
47	Glu	Thr	Asn	Pro	Gly	Val	Val	Gly
48	Glu	Thr	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Gly
49	Glu	Thr	Asn	His	Ala	Val	Val	Gly
52	Glu	Thr	Lys	Pro	Ala	Val	Val	Gly
53	Glu	Thr	His	Pro	Ala	Val	Val	Gly
54	Glu	His	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Gly
55	His	Thr	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Gly
56	Pro	Thr	His	Pro	Ala	Val	Val	Gly
57	Pro	Thr	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Gly
58	His	Thr	His	Pro	Ala	Val	Val	Gly
59	Glu	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Val	Gly
60	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Val	Gly
61	Gly	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Val	Gly
62	His	Thr	Gly	Pro	Ala	Val	Val	Gly
63	His	Thr	Lys	Pro	Ala	Val	Val	Gly

Tabla 4: Variantes de dominios de escisión de elastasa

Para la Tabla 4 anterior, la primera columna que enumera "Nombre de secuencias de pro-péptidos" se corresponde con la SEC ID N° para el dominio de escisión de elastasa indicado. Así, 24 se corresponde con el dominio de escisión de tripsina natural de SEC ID N°: 24. Los números 40-49, 52-63 se corresponden respectivamente con los dominios de escisión de elastasa de variantes de SEC ID N°: 40-49 y 52-63.

Para cultivar los clones de variante generalmente se siguieron las condiciones de cultivo en matraz de agitación desarrolladas para el clon 201-24-266-VU activado con tripsina descrito en el ejemplo precedente. Se probaron varios procedimientos de conversión de las proproteínas de variante secretadas en el sobrenadante de matraz de agitación en PRT-201 madura. La primera estrategia de conversión consistió en purificar primero cromatográficamente la proenzima de variante, seguido de escisión controlada en un tampón de conversión específico. Debido a que los cambios de aminoácidos en las proproteínas de variante produjeron solo pequeños cambios en los puntos isoeléctricos teóricos en comparación con la proenzima natural, se llevó a cabo cromatografía

de intercambio catiónico generalmente como se describe en el ejemplo precedente. Los sobrenadantes de los cultivos de clones de variante se prepararon para cromatografía tanto por dilución con agua generalmente como se describe en el ejemplo precedente como por concentración, seguido de diafiltración del sobrenadante, usando filtración de flujo tangencial en el tampón de carga de la columna. Después de la purificación cromatográfica, las fracciones eluidas se analizaron por SDS-PAGE, seguido de tinción con Coomassie. El análisis en gel demostró mayores cantidades de proteína madura convertida en proproteína en las fracciones en comparación con el sobrenadante de partida, que indica que se había producido una cantidad considerable de conversión de proproteína espontánea. Tras la posterior purificación, se determinó por EM/CL que la proteína espontáneamente convertida consistía principalmente en variantes del extremo N que se demostró que tenían poca o ninguna actividad de elastasa en el ensayo de SLAP.

La segunda estrategia de conversión consistió en convertir la proproteína de variante antes de purificar a partir del sobrenadante de cultivo, seguido de purificación cromatográfica de la enzima madura. Esta estrategia de conversión se probó primero en un ensayo a pequeña escala y posteriormente se amplió la escala hasta acomodar mayores volúmenes de conversión. Para la conversión a pequeña escala, el sobrenadante clarificado de cultivos de clones de variante se concentró normalmente 5 veces por centrifugación a 2-8 °C en un dispositivo de filtro ultracentrífugo. Después de la concentración, el concentrado se diluyó 5 veces con tampón Tris a una concentración final de 100 mM de Tris-HCl normalmente en un intervalo de pH de 8,0 a 9,0. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente sobre una plataforma con agitación por balanceo. La actividad de elastasa se monitorizó por ensayo de SLAP normalmente hasta que la velocidad de la reacción de actividad alcanzó una meseta. En algunos casos, la velocidad de reacción aumentó tan lentamente que la monitorización de SLAP se detuvo antes de lograrse una meseta. Las muestras convertidas se analizaron para especies de proteína (por ejemplo, proproteína y PRT-201 / variantes del extremo N) por SDS-PAGE. Para ampliar a escala esta estrategia de conversión, el sobrenadante que contenía proproteína de variante se concentró 10 veces usando filtración de flujo tangencial, seguido de diafiltración con Tris-HCl 100 mM que oscila en pH de 6,0 a 9,0. El progreso de la reacción de conversión se monitorizó con el tiempo por análisis de HIC-HPLC en el que se cuantificaron la proproteína, PRT-201 y las especies de variante del extremo N. Generalmente hubo mayores tasas de conversión cuando el pH del tampón de diafiltración estuvo entre 8,0 y 9,0.

Las proproteínas elastasas enumeradas en la Tabla 5 se expresaron en *P. pastoris* como se describe y se prueba para su capacidad para experimentar auto-conversión en ensayos de conversión a pequeña escala como se describe en la segunda estrategia de conversión anteriormente. Los resultados de aquellos estudios se resumen en la Tabla 5 más adelante:

Tabla 5: Resultados de expresión de proproteínas elastasas en *P. pastoris*.

Nombre de la Secuencia de Propéptido	Rendimiento del Frasco Agitador	Estabilidad del Frasco Agitador	Tasa de Conversión	% de Variantes N-Terminales	Tripsina Usada en el Procesamiento
24	Alta	Alta	Rápida	20%	Sí
40	Ninguna	No Aplicable	No Aplicable	No Aplicable	No
41	Intermedia	Alta	Lenta	No Probada	No
42	Baja	Baja	Intermedia	25%	No
43	Intermedia	Alta	Lenta	No Probada	No
44	Intermedia-Alta	Alta	No Detectada Conversión	No Aplicable	No
45	Intermedia	Alta	No Detectada Conversión	No Aplicable	No
46	Intermedia	Alta	No Detectada Conversión	No Aplicable	No
47	Intermedia	Alta	No Detectada Conversión	No Aplicable	No
48	Intermedia	Baja	Rápida	15%	No
49	Alta	Alta	Lenta	35%	No
52	Intermedia	Baja	Rápida	No Probada	No

(continuada)

	Nombre de la Secuencia de Propéptido	Rendimiento del Frasco Agitador	Estabilidad del Frasco Agitador	Tasa de Conversión	% de Variantes N-Terminales	Tripsina Usada en el Procesamiento
5	53	Intermedia	Intermedia	Rápida	25%	No
10	54	Intermedia	Baja	Rápida	No Probada	No
	55	Intermedia -Alta	Intermedia	Rápida	15%	No
15	56	Baja	Baja	No Probada	No Probada	No
	57	Baja	Baja	No Probada	No Probada	No
	58	Intermedia -Hip	Intermedia	Lenta	No Probada	No
20	59	Intermedia -Alta	Intermedia	Lenta	No Probada	No
	60	Intermedia -Alta	Alta	Lenta	No Probada	No
25	61	Ninguna	No Aplicable	No Aplicable	No Aplicable	No
	62	Alta	Alta	No Detectada Conversión	No Aplicable	No
30	63	Ninguna	No Aplicable	No Aplicable	No Aplicable	No

En la Tabla 5 anterior, la primera columna que enumera "Nombre de la secuencia de pro-peptidos" se corresponde con la SEC ID N° para el dominio de escisión de elastasa indicado. Así, 24 se corresponde con el dominio de escisión de elastasa activada por tripsina natural de SEC ID N°: 24. Los números 40-49 y 52-63 se corresponden respectivamente con los dominios de escisión de elastasa de variantes de SEC ID N°: 40-49 y 52-63. La columna marcada "Rendimiento en matraz de agitación" se corresponde con la cantidad de la proproteína correspondiente en el sobrenadante de cultivo durante 3 días de inducción como se ha determinado por análisis de SDS-PAGE. La columna marcada "Estabilidad en matraz de agitación" se corresponde con la estabilidad de la proproteína correspondiente en el sobrenadante del medio de cultivo del matraz de agitación durante 3 días de inducción como se ha determinado por la cantidad de PRT-201 / variantes del extremo N observadas en análisis de SDS-PAGE. La columna marcada "Velocidad de conversión" se corresponde con la velocidad relativa de conversión de proproteína para PRT-201, como se indica por el tiempo para lograr la velocidad de reacción de SLAP máxima (rápida: menos de 60 minutos; intermedia: 60 a 120 minutos; y lenta: más de 120 minutos). Los transcurros de tiempo de conversión de las proproteínas de variante se determinaron usando el ensayo de conversión a pequeña escala descrito anteriormente y en comparación con el transcurso de tiempo de conversión de la proproteína 24 determinado por activación usando tripsina inmovilizada. La columna marcada "% de variantes del extremo N" se refiere al porcentaje de proteína convertida que comprendió variantes del extremo N de la proteína elastasa madura (es decir, variantes que comprenden escisión en el extremo C del enlace para cualquier sitio distinto de P1). Para ilustrar el sistema de clasificación relativo usado en la Tabla 5, ejemplos de SDS-PAGE, velocidad de conversión y análisis de variantes del extremo N para un subconjunto de variantes auto-activadas se muestran en la Figura 5.

Los análisis de las diversas variantes revelaron que las proproteínas elastasas que comprenden tanto el dominio de escisión de elastasa de variante de SEC ID N°: 48 como de SEC ID N°: 55 proporcionaron elastasas auto-activadas con cualidades superiores que incluyen rendimientos en matraz de agitación de intermedios a altos y bajos porcentajes de variantes tras la conversión. Más análisis de proproteínas elastasas que comprenden tanto el dominio de escisión de elastasa de variante de SEC ID N°: 48 como SEC ID N°: 55 revelaron que la auto-activación de las proproteínas correspondientes (es decir, las proenzimas de elastasa de SEC ID N°: 64 y SEC ID N°: 69, respectivamente) produjeron solo una clase de variante del extremo N con una escisión en el extremo C del enlace peptídico para el residuo P'2. Más análisis de proproteínas elastasas revelaron que la proproteína que comprende el dominio de escisión de la elastasa de variante de SEC ID N°: 55 era más estable que la proproteína que comprende el dominio de escisión de la elastasa de variante de SEC ID N°: 48.

Experimentos iniciales para optimizar condiciones para la escisión controlada de pro-PRT-201 purificada se realizaron usando la proproteína con la secuencia de pro-peptidos 42 (SEC ID N°: 6). Esta proproteína purificada se sometió a conversión en una matriz de condiciones que incluyen pH (7,7 a 8,9), composición de tampón (citrato de

sodio 0,4 a 10 mM), concentración de proteína (0,14 a 0,23 mg/ml) y tiempo de reacción (5 a 24 horas). Al final del periodo de conversión, las reacciones se inactivaron añadiendo ácido fórmico para reducir el pH a 3,0. Las cantidades relativas de especies de proteína en cada reacción se determinaron por espectrometría de masas. Basándose en estos resultados, las condiciones de conversión que produjeron el menor porcentaje de variantes del extremo N incluyeron un pH de 8,3, una composición de tampón de Tris 100 mM y menos de 1 mM de citrato de sodio, una concentración de proteína de 0,2 mg/ml y un tiempo de reacción de 5 a 24 horas. En este estudio solo se analizaron los puntos finales de la reacción. Así, los datos en tiempo real de la calidad de la conversión no se obtuvieron, y el resultado final puede haber reflejado tanto la producción inicial de variantes del extremo N como una cantidad sustancial de tiempo para que aquellas variantes se hubieran degradado. Posteriormente se desarrolló un ensayo de HIC-HPLC para permitir monitorizar en tiempo real la reacción de conversión. Más estudios de optimización de la conversión, que incluyen aquellos usando monitorización de HIC-HPLC en tiempo real, se describen en el Ejemplo 6.

6.7 EJEMPLO 6: EXPRESIÓN DE PRT-201 AUTO-ACTIVADA EN *P. PASTORIS* USANDO UN VECTOR DE VARIANTE DE MÚLTIPLES COPIAS

La integración de múltiples copias de genes recombinantes en *P. pastoris* se ha utilizado para aumentar la expresión de la proteína deseada (véase, por ejemplo, Sreekrishna y col., 1989, *Biochemistry* 28:4117-4125; Clare y col., 1991, *Bio/Technology* 9:455-460; Romanos y col., 1991, *Vaccine* 9:901-906). Sin embargo, en ciertos casos, niveles de expresión obtenidos de integrantes de vector de una única copia fueron eficaces y no se mejoró por los integrantes de vector de múltiples copias (Cregg y col., 1987, *Bio/Technology* 5:479-485). Los eventos de integración de plásmidos de múltiples copias espontáneos se producen *in vivo* a una baja frecuencia en *P. pastoris*. Para obtener integración genómica de múltiples copias de un gen y posiblemente aumentar la expresión de proteínas, puede usarse un procedimiento de ligación *in vitro* para producir insertos en tándem del gen en un vector de expresión, seguido de transformación de *P. pastoris*.

Para obtener un integrante de múltiples copias de la variante pPROT55-V se usó un procedimiento de ligación *in vitro* para construir un vector que contiene múltiples copias de pPROT55-V que posteriormente se usó para transformación de *P. pastoris*. Para preparar el vector de múltiples copias, el vector pPROT55-V se digirió con BglII y BamHI para liberar el casete de expresión de 2,3 kb que codifica el gen pro-PRT-201, el promotor AOX1 y la secuencia de terminación de la transcripción AOX1. El casete de expresión se ligó entonces con una preparación del vector pPROT55-V que se había linealizado con BamHI y se trató con fosfatasa alcalina intestinal bovina (New England Biolabs, MA, EE.UU.) para prevenir la auto-ligación. La mezcla de ligación se incubó durante la noche a 16 °C. La cepa TOP 10 de *E. coli* (Invitrogen, CA, EE.UU.) se transformó con la reacción de ligación. La mezcla de transformación se sembró en placa sobre LB de baja sal en presencia de 25 microgramos/ml de Zeocin. Los transformantes resistentes a fármaco se recogieron y se preparó ADN de plásmido.

Para determinar el número de casetes de expresión en los clones resultantes, el ADN de plásmido se digirió con BglII y BamHI y se analizó por electroforesis en gel de agarosa con un marcador patrón de tamaño de ADN. Se identificó un clon que contenía una única banda de inserto definida con el tamaño de acuerdo con tres casetes de expresión de 2,3 kb y se llamó pPROT55M3-V. El mapeo de la enzima de restricción se usó para confirmar la orientación de una formación de multímero lineal de cabeza a cola para el vector pPROT55M3-V. La Figura 6 representa el esquema de clonación de pPROT55M3-V.

La cepa NRRL Y-11430 de *P. pastoris* natural se usó para transformación, que se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 4, excepto que el vector pPROT55M3-V se linealizó con BglII en lugar de SacI antes de la transformación. Los transformantes resistentes a fármaco se cultivaron y se seleccionaron para la expresión de la proproteína pPROT55M3 como se describe en el Ejemplo 4.

La optimización de condiciones en matraz de cultivo de agitación se realizó para minimizar la escisión espontánea durante la inducción. La optimización en matraz de agitación se basó en dos variables, temperatura de inducción y composición del medio de inducción. Primero, se encontró que realizar la inducción a 22 °C en comparación con 25 °C produjo una mayor relación de proenzima con respecto a enzima madura en el sobrenadante de cultivo para todas las composiciones de medio probadas. Segundo, la adición de citrato de sodio para aumentar la concentración de tamponamiento del medio de inducción se produjo en ausencia de enzima madura espontáneamente convertida en el sobrenadante de cultivo a través de todas las concentraciones de citrato de sodio probadas (12,5 a 50 mM). Los efectos de estas variables sobre el rendimiento de la expresión de proproteínas y la estabilidad en sobrenadante de matraz de agitación con el tiempo se ilustran en la Figura 7.

El clon de tres copias de alta expresión 201-55M3-003-VU se seleccionó para análisis de fermentación con ampliación a escala usando procedimientos de fermentación establecidos para el clon 201-55-001-VU descritos del siguiente modo. La fermentación del clon 201-55-001-VU se efectuó descongelando un vial del banco de células y usándolo para inocular un matraz de agitación que contenía 500 ml de medio de crecimiento BKGy a pH 5,7. El cultivo de siembra se cultivó durante 24 horas con agitación a 28 °C hasta que el peso de células húmedas fue de aproximadamente 40 g/l. El fermentador que contenía medio de crecimiento BKGy a pH 5,7 se esterilizó en el autoclave. Después de enfriar los medios a 28 °C se añadieron los suplementos que incluyen base de nitrógeno de

levadura y biotina. El fermentador se inoculó a una relación de 1:33 de cultivo de siembra con respecto a medio de crecimiento BKG Y.

El procedimiento de fermentación empezó con un lote de alimentación de glicerol y glicerol alimentado a pH 5,7 a 28 °C. El pH se controló por disoluciones al 10% de ácido fosfórico y al 30% de sulfato de amonio. El cultivo se agitó de 300-1000 rpm con aireación para controlar el oxígeno disuelto al 40%. Después de agotarse el lote de glicerol inicial y disolverse el oxígeno enriquecido, que indica el agotamiento del glicerol del sistema, se alimentó 50% de glicerol adicional a 131 g/h hasta que el peso de células húmedas alcanzó preferentemente entre 200 g/l y 300 g/l. Después de alcanzar el peso de células húmedas 200 g/l-300 g/l, la inducción se inició inmediatamente con un bolo de metanol de 0,025 ml por gramo de biomasa húmeda. Después del agotamiento del bolo de metanol y el aumento del oxígeno disuelto, la inducción continuó mediante la adición de cantidades limitantes de metanol con una tasa de alimentación constante de 0,0034 g de metanol/g de peso de células húmedas/h. Al empezar la alimentación de metanol constante, el pH del caldo de fermentación se cambió de 5,7 a 5,5 y la temperatura se cambió de 28 °C a 22 °C. La fermentación se recogió después de 70 horas de inducción.

Para determinar los rendimientos relativos de clones de una única copia y de 3 copias, el clon 201-55-001-VU, que contiene un integrante genómico del vector pPROT55-V de una única copia, se fermentó en paralelo con el clon 201-55M3-003-VU, que contiene un integrante genómico del vector pPROT55M3-V de 3 copias. Las fermentaciones se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente, excepto que el pH del cultivo se mantuvo a 5,7 durante toda la inducción. Los sobrenadantes recogidos de las fermentaciones de 201-55-001-VU y 201-55M3-003-VU se analizaron por SDS-PAGE en gradiente, seguido de tinción con azul coloidal (Figura 8), que mostró que la mayor expresión de proproteínas se obtuvo del clon 201-55M3-003-VU de múltiples copias en comparación con el clon 201-55-001-VU de una única copia. Los resultados de SDS-PAGE se confirmaron con análisis de HIC-HPLC de concentración de proproteína en los sobrenadantes de fermentación, demostrando que el clon 201-55M3-003-VU produjo aproximadamente 600 mg/l de la proproteína secretada, mientras que el clon 201-55-001-VU produjo aproximadamente 400 mg/l. Así, el clon 201-55M3-003-VU de múltiples copias que contiene tres casetes de expresión produjo aproximadamente un 50% más de proproteína en comparación con el clon 201-55-001-VU de una única copia que contiene un único casete de expresión.

Se probaron dos estrategias de conversión usando el sobrenadante de 201-55M3-003-VU producido a partir de la fermentación. Estas estrategias generalmente siguen las estrategias descritas para otras variantes de proproteína en el Ejemplo 5, excepto que se realizaron a mayor escala. En la primera estrategia, la proproteína se capturó del sobrenadante por cromatografía de intercambio catiónico, seguido de conversión en la proteína madura y cromatografía de pulimento. En la segunda estrategia, la proproteína se convirtió en la proteína madura antes de la purificación, seguido de captura usando cromatografía de intercambio catiónico, una amplia conversión para eliminar las variantes del extremo N, y adicionalmente cromatografía de pulimento. Ambas estrategias también incluyeron una amplia etapa de incubación en un tampón a pH 8,0 después de la conversión para efectuar la degradación selectiva de las variantes del extremo N.

Usando la primera estrategia, la captura de la proproteína, seguida de la conversión y purificación por pulimento de PRT-201, se efectuaron del siguiente modo. El sobrenadante de 201-55M3-003-VU se recogió del cultivo de fermentación y se congeló a -80 °C. Aproximadamente 7 l de sobrenadante clarificado congelado (3,5 l de la fermentación de 201-55M3-003-VU descrita anteriormente y 3,5 l de los cultivos en matraz de agitación 201-55M3-003-VU preparados generalmente como se describe en Ejemplos 4 y 5) se descongelaron y se diluyeron 8 veces con agua desionizada y citrato de sodio 1 M, pH 4,3, a 2-8 °C para obtener una concentración final de citrato de sodio 25 mM. El pH de la disolución se ajustó a 4,7. La disolución se cargó sobre una columna de intercambio catiónico Macroprep High S de 2,3 l de lecho a 76 cm/h a 2-8 °C. La columna se lavó con 5 VC de citrato de sodio 25 mM, pH 4,7, seguido de 5 VC de cloruro sódico 160 mM, citrato de sodio 25 mM, pH 4,7. La proproteína se eluyó con 15 VC de un gradiente lineal a partir de cloruro sódico 160 mM a cloruro sódico 500 mM en citrato de sodio 25 mM, pH 4,7, a 87 ml/min (67 cm/h). El eluato se recogió en fracciones. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE para el contenido de proteína (Figura 9). Se observó una pequeña cantidad de proteína espontáneamente convertida por SDS-PAGE. Las fracciones que contienen la proproteína se reunieron para posterior procesamiento. El material reunido se sometió a análisis de HIC-HPLC, que mostró que consistió en 92% de proproteína y 8% de PRT-201 madura.

Para iniciar la conversión, el material reunido se intercambió por tampón usando filtración de flujo tangencial en cloruro sódico 100 mM, Tris 20 mM, pH 4,0, usando diafiltración de volumen constante a 10-12 °C. La filtración de flujo tangencial se realizó con membranas de celulosa regenerada, una presión transmembrana de 15 psi, una velocidad de flujo cruzado de 20 l/min y un flujo de 800 ml/min. Se añadieron tres diavólúmenes de tampón a 2-8 °C a la misma velocidad que el flujo. Posteriormente, se añadieron tres volúmenes adicionales de tampón a temperatura ambiente a la misma velocidad que el flujo para elevar la temperatura de la disolución de conversión a la diana de 26 °C. La filtración de flujo tangencial se usó para concentrar la disolución de conversión a la diana de 1,5 mg/ml usando las condiciones de 15 psi de presión transmembrana, 1,2 l/min de velocidad de flujo cruzado y 76 ml/min de flujo. Sin embargo, después de aproximadamente 2 minutos desde el inicio del procedimiento de concentración, se observó precipitación inesperada y se detuvo el procedimiento de concentración. La concentración de proteína de la disolución de conversión se determinó que era 1,1 mg/ml por absorbancia de UV a 280 nm en un volumen de 570

ml. Para minimizar la precipitación adicional, la disolución de conversión se diluyó a 1 mg/ml con cloruro sódico 100 mM, Tris 20 mM, pH 4,0, y se filtró a través de una membrana de 0,22 micrómetros. Se añadieron dieciséis ml de Tris 3 M, pH 9,0 a la disolución de conversión. La disolución de conversión se dispuso en un baño de agua a 26 °C. La reacción de conversión se monitorizó por análisis de HIC-HPLC. Después de 30 minutos, la HIC-HPLC mostró que la mayoría de la proproteína se había convertido en PRT-201 y algunas de las variantes del extremo N (Figura 10). Después de 1 hora, la reacción de conversión consistió en 0% de proproteína, 86% de PRT-201 de longitud completa y 14% de variantes del extremo N. El material de conversión se incubó adicionalmente durante 4 horas más, momento en el que el análisis de HIC-HPLC mostró que el material de conversión consistió en 98% de PRT-201 de longitud completa y 2% de variantes del extremo N.

El material de conversión se diluyó 4 veces con agua desionizada y citrato de sodio 1 M, pH 4,3, a una concentración final de citrato de sodio 25 mM. El pH de la disolución se ajustó a 5,0 en la preparación para cargar sobre la columna de pulimento. La disolución se cargó sobre una columna de intercambio catiónico Macrorep High S de 600 ml de lecho a 27 ml/min (83 cm/h). La columna se lavó con 5 VC de citrato de sodio 20 mM, pH 5,0 seguido de 5 VC de cloruro sódico 160 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 5,0. La PRT-201 se eluyó con 15 VC de un gradiente lineal a partir de cloruro sódico 160 mM a 500 mM en citrato de sodio 25 mM, pH 5,0, a 87 ml/min (67 cm/h). El eluato se recogió en fracciones. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE para contenido de proteína y por ensayo de SLAP para actividad específica. Las fracciones que contienen PRT-201 con una actividad específica de 30 U/mg se reunieron. Las fracciones de PRT-201 reunidas se diafiltraron por filtración de flujo tangencial en formulación tampón (0,1X PBS, pH 5,0). El pH de PRT-201 diafiltrada se ajustó a pH 7,4 y la concentración de proteína se ajustó a 1 mg/ml por filtración de flujo tangencial. Los viales se llenaron y se liofilizaron como se describe para PRT-201 producida a partir del clon 201-24-266-VU en el Ejemplo 4.

Usando la segunda estrategia, la conversión de proproteína seguida de purificación de PRT-201 se efectuó del siguiente modo. Se descongelaron aproximadamente 7 l del sobrenadante clarificado congelado de la fermentación de 201-55M3-003-VU descrita anteriormente y la reacción de conversión se inició por filtración de flujo tangencial con un tampón de conversión que contenía Tris 100 mM, pH 8,0, usando diafiltración de volumen constante a temperatura ambiente con membranas de celulosa regenerada. Dos diavolumenes de Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 fueron suficientes para cambiar el pH del concentrado de pH 5,0 a 8,0 y efectuar la conversión. También se realizó un experimento ajustando directamente el pH del sobrenadante clarificado a 8,0 añadiendo una base Tris a una concentración final de 100 mM y ajustando el pH a 8,0 con hidróxido sódico 1 N. Esto produjo la formación de precipitados y un sobrenadante turbio, posiblemente debido a la precipitación de ambos componentes, que eran no deseables. El procedimiento preferido de conversión usando filtración de flujo tangencial no produjo precipitación.

La reacción de conversión se monitorizó por análisis de HIC-HPLC en tiempo real. Después de la iniciación de la conversión, la pro-PRT-201 se convirtió en PRT-201 madura lentamente durante las dos primeras horas, seguido de una aceleración de la conversión (Figura 11). A las 4,5 horas, la reacción de conversión consistió en aproximadamente 4% de pro-PRT-201, 75% de PRT-201 madura y 21% de variantes del extremo N. A las 6,5 horas, la reacción de conversión consistió en aproximadamente 1% de pro-PRT-201, 83% de PRT-201 madura y 16% de variantes del extremo N. La reducción en variantes del extremo N del 21% al 16% de 4,5 h a 6,5 h pueden ser debida a la degradación de variantes del extremo N por PRT-201 activa de longitud completa, pero ésta no se completó y no tan rápidamente como la reducción en variantes del extremo N observada durante la conversión de pro-PRT 201 purificada. En esta segunda estrategia, prolongar la reacción de conversión puede no eliminar completamente las variantes del extremo N debido a las proteínas que compiten en el sobrenadante que compiten por el sitio activo de elastasa. Para mejorar la reacción de conversión, el material de post-conversión se capturó y posteriormente se diafiltró en un tampón apropiado para iniciar una amplia conversión a pH 8,0 para la degradación selectiva de variantes del extremo N como se describe más adelante.

La captura de PRT-201 a partir del material de conversión se efectuó del siguiente modo. El material de conversión se intercambió por tampón en citrato de sodio 20 mM, pH 5,0, y se cargó sobre una columna de cromatografía de intercambio catiónico Macro-Prep High S. La columna se lavó con 5 VC de citrato de sodio 20 mM, pH 5,0 seguido de 5 VC de citrato de sodio 20 mM, cloruro sódico 160 mM, pH 5,0. La PRT-201 se eluyó con un gradiente lineal de cloruro sódico 160 mM a 500 mM en citrato de sodio 20 mM, pH 5,0. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE para contenido de proteína, HIC-HPLC para variantes del extremo N, absorbancia de UV a 280 nm para concentración de proteína y ensayo de SLAP para actividad de elastasa. Se detectaron dos bandas de proteínas predominantes por SDS-PAGE, correspondientes a las glucoformas PRT-201 y PRT-201, como se muestra en la Figura 12. Las fracciones que contuvieron las glucoformas de PRT-201 como se ha determinado por SDS-PAGE o variantes del extremo N como se ha determinado por HIC-HPLC se excluyeron de la reunión. Las fracciones que presentaron actividad específica relativamente baja (menos de 30 U/mg) como se ha determinado por ensayo de SLAP también se excluyeron de la reunión. Las fracciones restantes que contienen PRT-201 se reunieron para procesamiento adicional. El análisis de HIC-HPLC de las fracciones reunidas reveló que este material consistió en aproximadamente 98% de PRT-201 de longitud completa y 1-2% de variantes del extremo N. El material reunido se almacenó a 2-8 °C durante 12-16 h.

Dada la observación anterior de que pareció que las variantes del extremo N disminuyeron durante un periodo de conversión prolongado como se ha descrito anteriormente, el material de PRT-201 reunido se sometió a una amplia

etapa de incubación a pH 8,0. La amplia incubación se realizó por diafiltración y filtración de flujo tangencial con Tris 100 mM, cloruro sódico 300 mM, pH 8,0 durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Después de 2,5 horas, el material de conversión consistió en 100% de PRT-201 madura como se muestra por análisis de HIC-HPLC. El material de conversión se sometió a diafiltración y filtración de flujo tangencial en citrato de sodio 20 mM, pH 5,0 para suprimir la actividad de elastasa y preparar para la cromatografía en columna. El material de PRT-201 diafiltrado se almacenó durante aproximadamente 64 horas a 2-8 °C.

La purificación cromatográfica por pulimento de PRT-201 se efectuó del siguiente modo. El material de PRT-201 diafiltrado se cargó sobre una columna de intercambio catiónico Macro-Prep High S y se lavó con 5 VC de Tampón C (citrato de sodio 20 mM, pH 5,0) seguido de 5 VC de cloruro sódico 160 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 5,0. La elución de PRT-201 se realizó con un gradiente lineal de 15 VC a partir de 68% de Tampón C y 32% de Tampón D (cloruro sódico 160 mM, citrato de sodio 25 mM, pH 5,0) a 0% de Tampón C y 100% de Tampón D (cloruro sódico 500 mM, citrato de sodio 25 mM, pH 5,0), a 50 ml/min (153 cm/h). El eluato se recogió en fracciones. La PRT-201 se eluyó como un pico simétrico a 37 mS/cm (cloruro sódico 330 mM). Las fracciones se analizaron por análisis de SDS-PAGE para contenido de proteína, absorbancia de UV a 280 nm para concentración de proteína y ensayo de SLAP para actividad específica. Se reunieron las fracciones que contenían PRT-201 que tuvieron una actividad específica de 30,1-38,8 U/mg. Las fracciones de PRT-201 se diafiltraron por filtración de flujo tangencial en tampón de formulación (0,1X PBS, pH 5,0). El pH de PRT-201 diafiltrada se ajustó a pH 7,4 y la concentración de proteína se ajustó a 1 mg/ml por filtración de flujo tangencial. Los viales se llenaron y se liofilizaron como se describe para PRT-201 producida a partir del clon 201-24-266-VU en el Ejemplo 4.

Las condiciones para los procedimientos de conversión descritos anteriormente se eligieron basándose en estudios de optimización de la conversión que examinaron la concentración de proteína, temperatura, composición del tampón, diavolumen y variables de pH. En el primer estudio se analizó el efecto de la concentración de proproteína sobre la producción de variantes del extremo N durante la conversión. La pro-PRT-201 purificada a partir del clon 201-55M3-003-VU (pro-PRT-201-55M3-003-VU) a una concentración inicial de 0,2 mg/ml en fosfato de sodio 20 mM, pH 5,0 se tomó en alícuotas y se concentró a 1,0, 1,6 y 1,8 mg/ml usando dispositivos de concentración centrífuga como se ha determinado por absorbancia de UV a 280 nm. La conversión de la proproteína se efectuó añadiendo Tris y cloruro sódico a 100 mM a cada una de las cuatro muestras de concentración, ajustando el pH de 5,0 a 8,0 e incubando las muestras a temperatura ambiente. La reacción de conversión se monitorizó por HIC-HPLC en tiempo real hasta que la proproteína fue 1% de la proteína total (Figura 13). En este momento, la muestra de 0,2 mg/ml consistió en aproximadamente 8% de variantes del extremo N, mientras que las muestras de 1,0 mg/ml, 1,6 y 2,0 mg/ml consistieron en aproximadamente el 14%, 19% y el 29% de variantes del extremo N, respectivamente. El resto de la proteína en cada muestra consistió en PRT-201 de longitud completa. Estos resultados demuestran que concentraciones crecientes de pro-PRT-201-55-003-VU durante la conversión conducen a la formación de más variantes del extremo N y menos PRT-201 de longitud completa. Otros estudios han sugerido que la conversión de pro-PRT-201-55M3-003-VU se produce a través de reacciones tanto intramoleculares como intermoleculares. Así, para esta proproteína de variante, es probable que las reacciones intramoleculares, que se favorecen en disoluciones de proproteína más diluidas, den lugar a conversión más precisa, mientras que reacciones intermoleculares, favorecidas en disoluciones de proproteína más concentradas, produzcan conversión menos precisa, es decir, formación de un mayor porcentaje de variantes del extremo N con respecto a PRT-201 de longitud completa.

En el segundo estudio se analizó el efecto de la temperatura sobre la producción de variantes del extremo N durante la conversión. Se produjo pro-PRT-201 purificada del clon 201-55M3-VU (llamada pro-PRT-201-55M3-003-VU) a una concentración de 1,6 mg/ml, se sometió a conversión como se ha descrito anteriormente a tanto 15 °C como a 26 °C. Las reacciones de conversión se monitorizaron en tiempo real por HIC-HPLC y se permitió el progreso hasta que la proproteína comprendió <1% de proteína total. El tiempo requerido para alcanzar esta reducción en proproteína fue aproximadamente 30 minutos a 26 °C y aproximadamente 90 minutos a 15 °C. En estos momentos se observó un porcentaje similar de variantes del extremo N (aproximadamente 20% de proteína total) para ambas temperaturas. Así, la mayor temperatura de 26 °C produjo una reacción de conversión más rápida en comparación con la menor temperatura de 15 °C, aunque produjo un perfil de producto de reacción esencialmente idéntico.

El tercer estudio examinó el efecto de la composición del tampón sobre la solubilidad de proproteínas durante la reacción de conversión. Pro-PRT-201 purificada (pro-PRT-201-55M3-003-VU) a una concentración de 1,0 mg/ml se sometió a conversión en las condiciones enumeradas en la Tabla 6. Las reacciones de conversión se realizaron a temperatura ambiente, excepto una que se realizó a 2 a 8 °C (composición del tampón Tris-HCl 20 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 4,0). Las reacciones de conversión se inspeccionaron visualmente para precipitación. Como se observa en la Tabla 6, las composiciones de tampón que no produjeron precipitación incluyeron Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; Tris-HCl 100 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 5,0; y Tris-HCl 100 mM, cloruro sódico 300 mM, pH 8,0. Las composiciones de tampón con menores concentraciones de Tris o sin cloruro sódico a menor pH (es decir, pH 5,0) presentaron precipitación.

Tabla 6: Efecto de la composición del tampón sobre la precipitación durante la conversión.

	Composición Tampón	Temperatura	Precipitación Observada	Soluble (No Observada Precipitación)
5	1 mM Tris-HCl, pH 5.0	Ambiente	+	
	25 mM Tris-HCl, pH 5.0	Ambiente	+	
10	100 mM Tris-HCl, pH 5.0	Ambiente	+	
	100 mM Tris-HCl, pH 8.0	Ambiente		+
15	20 mM Tris-HCl, 100 mM cloruro sódico, pH 4.0	2-8°C	+	
	100 mM Tris-HCl, 100 mM cloruro sódico, pH 5.0	Ambiente		+
20	100 mM Tris-HCl, 300 mM cloruro sódico, pH 8.0	Ambiente		+

En el cuarto estudio se analizó el efecto del número de diavolumenes de la filtración de flujo tangencial sobre la precipitación durante la conversión de sobrenadante que contiene proproteína (pro-PRT-201-55M3-003-VU). La disolución usada para el intercambio de tampón fue Tris-HCl 100 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 8,0. Adicionalmente se probó un ajuste directo del pH del sobrenadante de pH 5,0 a 8,0 sin filtración de flujo tangencial. Como se ha observado en la Tabla 7, el ajuste directo del pH del sobrenadante produjo una gran cantidad de precipitación. Con 1 diavolumen de intercambio se observó alguna precipitación. No se observó precipitación cuando se usaron 2 a 5 diavolumenes.

Tabla 7: Efecto del número de diavolumenes sobre la precipitación durante el intercambio de tampón.

	Diavolumenes	Precipitación Observada
35	0	Precipitación mayor
	1	Precipitación menor
	2	No precipitación
40	3	No precipitación
	5	No precipitación

En el quinto estudio se analizó el efecto del pH sobre la actividad de elastasa de PRT-201 madura. Este estudio se diseñó para identificar un intervalo de pH útil para conversión que no produjera una pérdida irreversible de actividad de elastasa del producto de conversión de PRT-201 madura. Se prepararon disoluciones de 1 mg/ml de PRT-201 en Tris-HCl 20 mM, fosfato de potasio 20 mM a partir de pH 1 a 14. Las disoluciones se mantuvieron a temperatura ambiente durante 0,5, 2, 24 y 48 horas. En los momentos de tiempo indicados, las disoluciones se probaron para actividad de elastasa en el ensayo de SLAP. La actividad de elastasa fue ampliamente estable de pH 3 a 8 en todos los momentos de tiempo. A pH inferiores a 3 y superiores a 8, la actividad de elastasa se redujo en todos los momentos de tiempo, con una correlación entre momentos de tiempo prolongados y menor actividad de elastasa. Estos resultados indicaron que una reacción de conversión realizada fuera de un intervalo de pH de 3 a 8 podría afectar negativamente la actividad de elastasa del producto de conversión de PRT-201.

6.8 EJEMPLO 7: PRODUCCIÓN DE ELASTASA PANCREÁTICA TIPO I PORCINA RECOMBINANTE AUTO-ACTIVADA

Un vector que codifica proenzima ELA-1 porcina auto-activada se expresó en *P. pastoris*. La ELA-1 porcina auto-activada resultante se comparó con una proteína ELA-1 porcina expresada como una proproteína natural activada por tripsina.

Para construir el vector de ELA-1 porcina activada por tripsina, la región codificante de ELA-1 porcina se sintetizó por Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA) usando una técnica de "oligo largo" de no PCR bajo licencia de Amgen (Thousand Oaks, CA). El gen recombinante se clonó en el vector pUC de Blue Heron, un derivado de pUC119. El gen de ELA-1 porcina se secuenció en ambas cadenas para confirmar la secuencia correcta. Los sitios de restricción SacII y XbaI se incorporaron como posibles sitios de clonación que flanquean el gen de ELA-1 porcina como se muestra en la Figura 14. Un segundo codón de terminación también se añadió inmediatamente después del codón

de terminación nativo para minimizar la posible ultralectura de ribosomas. La Figura 15 muestra la secuencia de aminoácidos idéntica en la naturaleza de proenzima ELA-1 porcina, que contiene el sitio activado por tripsina.

La región codificante de ELA-1 porcina se amplificó por PCR usando un par de oligonucleótidos que contienen sitios de restricción XhoI y SacII para facilitar la clonación. El producto de PCR se digirió con XhoI y SacII y se purificó por electroforesis en gel de agarosa. El fragmento de ELA-1 porcina se clonó en el vector PV-1 en los sitios de restricción XhoI y SacII. La cepa TOP 10 de *E. coli* se transformó con la mezcla de ligación. La mezcla de células se sembró sobre placas de LB de baja sal complementado con 25 mg/ml de Zeocin. Se escogieron los clones resistentes a fármaco y se preparó ADN de plásmido (Qiagen, CA). Basándose en análisis de restricción se identificó un clon que contenía el inserto del gen de ELA-1 porcina y el vector se llamó pPROT101-24-V. La secuencia codificante de este vector se confirmó por secuenciación de ADN. El esquema de clonación para pPROT101-24-V se representa en la Figura 16.

Usando el vector pPROT101-24-V activado por tripsina se manipularon tres clones auto-activados diferentes cambiando el sitio de escisión de tripsina en la región de pro-peptido de ELA-1 porcina a sitios de escisión de elastasa. La mutagénesis dirigida a sitio se realizó generalmente como se describe en el Ejemplo 4 usando cebadores de oligonucleótidos sintéticos que contienen las mutaciones deseadas como se describe en la Tabla 8. Todas las mutaciones en la región de pro-peptido se confirmaron por secuenciación de ADN bicatenario.

Nombre del Constructo	Secuencia de Pro-peptido							Secuencia Madura			SEQ ID NO.
	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	
pPROT101-24-V activada por Tripsina	Phe	Pro	Glu	Thr	Asn	Ala	Arg	Val	Val	Gly	115
pPROT101-42-V auto-activada	Phe	Pro	Glu	Thr	Asn	Ala	Ala	Val	Val	Gly	116
Auto-activada										Gly	117

Nombre del constructo	Secuencia de Pro-peptido							Secuencia madura			SEQ ID NO.
	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	
pPROT101-49-V	Phe	Pro	Glu	Thr	Asn	His	Ala	Val	Val		
pPROT101-55L-V Auto-activada	Leu	Pro	His	Thr	Asn	Pro	Ala	Val	Val	Gly	118

Tabla 8. Secuencias del dominio de escisión de los vectores ELA-1 porcinos activados por tripsina y auto-activados. Los codones mutagenizados están compartidos. El enlace escindido está entre P1 y P'1

La cepa NRRL Y-11430 de *P. pastoris* natural se transformó y los transformantes resistentes a fármaco se cultivaron y se seleccionaron para la expresión de las proproteínas ELA-1 porcinas como se describe en el Ejemplo 3. Basándose en el análisis por SDS-PAGE y la tinción con Coomassie (véase la Figura 17 y la Figura 18), los clones de pPROT101-24-V activados por tripsina naturales tuvieron los mayores niveles de expresión en comparación con los clones auto-activados. De los clones auto-activados, los clones de pPROT101-49-V tuvieron el mayor nivel de expresión, seguido de los clones de pPROT101-55L-V y luego los clones de pPROT101-49-V. Las proproteínas pPROT101-42-V y pPROT101-55L-V auto-activadas presentaron conversión espontánea sustancial durante la inducción, mientras que las proproteínas pPROT101-24-V activadas por tripsina y pPROT101-49-V auto-activadas mostraron mayor estabilidad en el medio de inducción.

Los estudios de la actividad de elastasa de PRT-102 producida por activación de tripsina de proteína proelastasa expresada a partir de pPROT101-24-V mostraron mayor actividad específica que PRT-201 como se muestra en la Tabla 9 a continuación:

Tabla 9: Actividad de elastasa de tres muestras diferentes de elastasa pancreática tipo I madura porcina (activada por tripsina) con respecto a elastasa pancreática tipo I humana madura.

Nombre de la Muestra	PRT-201	PRT-102	PRT-102	PRT-102
Actividad medida por SLAP (U/mg de proteína) (Réplicas)	34.6	91.8	99.4	100.7
	32.9	88.3	91.3	88.6
Media de Réplicas	33.6	88.5	93.5	92.9
Desviación estándar	0.9	3.2	5.2	6.7

Se usó un experimento de conversión a pequeña escala para determinar si proproteínas pPROT101-55L-V y pPROT101-49-V podrían convertirse en enzimas maduras que presentaran actividad de elastasa. Se concentraron 10 veces sobrenadantes de matraz de agitación de pPROT101-55L-V y pPROT101-49-V con una unidad de filtro centrífugo y se diluyeron 5 veces con Tris-HCl 100 mM, pH 9,0. La conversión se dejó avanzar a temperatura ambiente y la actividad de elastasa se monitorizó con el tiempo por ensayo de SLAP. El cambio promedio en absorbancia por minuto se determinó a partir de cada momento de tiempo y se informó como velocidad de reacción no normalizada (Figura 19). La conversión de sobrenadantes de tanto pPROT101-49-V como pPROT101-55L-V produjo un aumento en la actividad de elastasa. Las muestras del momento de tiempo final de cada clon se analizaron por SDS-PAGE, seguido de tinción con Coomassie, y se compararon con muestras de pre-conversión (Figura 20). Los resultados de SDS-PAGE confirmaron que casi toda la proproteína pPROT101-49-V se convirtió en proteína madura al final del ensayo de conversión. Los resultados de SDS-PAGE también mostraron que casi toda la pPROT101-55L-V se había convertido espontáneamente en proteína madura antes del ensayo de conversión.

Preparaciones purificadas de proproteínas pPROT101-24-V y pPROT101-49-V y enzimas maduras se enviaron al Centro de investigaciones científicas para plantas Danforth, MO, para el análisis de peso molecular intacto. Las proproteínas se purificaron por cromatografía de intercambio catiónico (Macroprep High S, Bio-Rad). Para análisis de enzimas maduras, las proproteínas de ambos clones se trataron primero para producir enzimas maduras y luego se purificaron por cromatografía de intercambio catiónico. La proproteína activada por tripsina se trató con tripsina, mientras que la proproteína auto-activada se convirtió en presencia de Tris-HCl 100 mM, pH 9,0, seguido de cromatografía de intercambio catiónico. Los picos principales obtenidos del análisis de espectrometría de masas se enumeran en la Tabla 10.

Tabla 10: Pesos moleculares esperados y observados para proteínas ELA-1 porcinas.

Proteína	MW Esperada	MW Observada
Proproteína pPROT101-24-V Activada por Tripsina	27068	27064
Enzima maduro pPROT101-24-V activado por Tripsina	25908	25898
Proproteína pPROT101-49-V auto-activada	27049	27047
Enzima maduro pPROT101-49-V auto-activado	25908	25910

Los resultados de SDS-PAGE, actividad de elastasa y espectrometría de masas demostraron que las formas auto-activadas de elastasa pancreática porcina tipo I pueden producirse manipulando la secuencia de propéptidos para sustituir el sitio de escisión de tripsina con un sitio de escisión de elastasa. Los niveles de expresión de estas formas auto-activadas de elastasa pancreática porcina tipo I son inferiores a los de la forma activada por tripsina natural. De los clones autoactivados probados, aquellos con la secuencia de pro-péptidos de pPROT101-49-V mostraron el mayor nivel de expresión y la menor conversión espontánea. La conversión de los clones de pPROT101-49-V y pPROT101-55L-V produjo la producción de proteínas maduras con sustancial actividad de elastasa. Los análisis de espectrometría de masas revelaron que los pesos moleculares de proproteína pPROT101-49-V y porcina madura tipo I se correspondieron con las masas esperadas.

6.9 EJEMPLO 8: ANÁLISIS DE ACTIVIDAD DE TRIPSINA DE ELASTASA-1 HUMANA RECOMBINANTE MADURA POR ENSAYO DE SUSTRATO DE PÉPTIDO COLORIMÉTRICO DE BENZ

Se realizó un ensayo de hidrólisis colorimétrico usando el sustrato de péptidos pequeños N-benzoil-Phe-Val-Arg-p-Nitroanilida (BENZ) para determinar si proteína elastasa madura purificada producida por el clon auto-activado 201-55M3-003-VU posee actividad de tripsina. Se recuperaron tres viales de PRT-201 purificada liofilizada del clon 201-55M3-003-VU del almacenamiento a -80 °C y se reconstituyeron con agua para obtener 1 mg/ml de PRT-201 en 0,1 X PBS, pH 7,4. Las concentraciones de proteína se confirmaron midiendo absorbancia de UV a 280 nm. Se usó una disolución madre de TrypZean (10 mg/ml) para generar una curva patrón para actividad de tripsina. Se incluyó una muestra de PRT-201 activada por tripsina previamente probada como control positivo. Además, algunas muestras experimentales y de control se concentraron con TrypZean para determinar la recuperación de actividad de tripsina en presencia de PRT-201. Se trató un subconjunto de las muestras concentradas y sin concentrar con inhibidor de tripsina de soja (SBTI) para determinar la capacidad de SBTI para inhibir cualquier actividad de tripsina intrínseca o concentrada. También se trataron patrones de TrypZean con SBTI para confirmar la eficacia del inhibidor. Véase la Tabla 11 más adelante para un resumen de las muestras incluidas en este estudio.

Tabla 11: Diluciones de TrypZean para la curva patrón se prepararon usando el tampón de ensayo (Tris 0,1 M, pH 8,3). La curva patrón para disoluciones de TrypZean se muestra en la Figura 21.

Descripción	No adición	Más concentración de TrypZean (a 100 ng/mL)	Más SBTI (a 10 ug/mL)	Más concentración de TrypZean y SBTI
PRT-201 del clon 55M3 Frasco #1				
PRT-201 del clon 55M3 Frasco #2				
PRT-201 del clon 55M3 Frasco #3				
PRT-201 del clon activado por tripsina				
Sólo Tampón (0.1 M Tris, pH 8.3)		No realizada		No realizada
TrypZean estándar, 1.56 ng/mL		No realizada		No realizada
TrypZean estándar, 3.13 ng/mL		No realizada		No realizada
TrypZean estándar, 6.25 ng/mL		No realizada		No realizada
TrypZean estándar, 12.5 ng/mL		No realizada		No realizada
TrypZean estándar, 25 ng/mL		No realizada		No realizada
TrypZean estándar, 50 ng/mL		No realizada		No realizada
TrypZean estándar, 100 ng/mL		No realizada		No realizada

Se preparó la disolución de sustrato (0,4 mg/ml de N-benzoil-Phe-Val-Arg-p-Nitroanilida lote 7733 en Tris 0,1 M, pH 8,3) y se precalentó a 30 °C en un baño de agua. Por triplicado, se pipetearon 100 microlitros de cada muestra en una microplaca de 96 pocillos. Usando un pipeteador multicanal, 200 microlitros de disolución de sustrato se pipetearon en cada pocillo y la microplaca se dispuso inmediatamente en un lector de microplacas precalentado a 30 °C. El lector de microplacas registró la absorbancia a 405 nm para cada pocillo una vez por minuto durante 60 minutos.

Las muestras de PRT-201 también se probaron para actividad de elastasa en el ensayo de SLAP. Se preparó disolución de sustrato de SLAP (4,5 mg/ml de SLAP en Tris 0,1 M, pH 8,3) y se precalentó a 30 °C en un baño de agua. Las muestras de 1 mg/ml de PRT-201 se diluyeron 20X con agua a 0,05 mg/ml. Por triplicado, 10 microlitros

de cada dilución de muestra se pipetearon en una placa de 96 pocillos. Usando un pipeteador multicanal, 300 microlitros de la disolución de sustrato de SLAP se pipetearon en cada pocillo y la microplaca se dispuso inmediatamente en un lector de microplacas precalentado a 30 °C. El lector de microplacas registró la absorbancia a 405 nm para cada pocillo una vez por minuto durante 5 minutos.

5 Los resultados de los ensayos de actividad de BENZ y SLAP se presentan respectivamente en las Tablas 12 y 13 a continuación.

10 **Tabla 12.** Actividad de tripsina media, informada como concentración de TrypZean equivalente (ng/ml). [a] Coeficiente de regresión < 0,8.

15	Descripción	No adición	Más concentración de TrypZean (a 100 ng/mL)	Más SBTI (a 10 ug/mL)	Más concentración de TrypZeane y SBTI
20	PRT-201 del clon 55M3 Frasco #1	<1.56 [a]	118.7	<1.56 [a]	<1.56 [a]
25	PRT-201 del clon 55M3 Frasco #2	<1.56 [a]	122.4	<1.56 [a]	<1.56 [a]
30	PRT-201 del clon 55M3 Frasco #3	<1.56 [a]	122.8	<1.56 [a]	<1.56 [a]
35	PRT-201 del clon activado por tripsina	8.7	130.0	<1.56 [a]	<1.56 [a]
40	Tampón sólo (0.1 M Tris, pH 8.3)	1.3	No realizada	<1.56 [a]	No realizada
45	TrypZean estándar, 1.56 ng/mL	2.7	No realizada	<1.56 [a]	No realizada
50	TrypZean estándar, 3.13 ng/mL	3.7	No realizada	<1.56 [a]	No realizada
	TrypZean estándar, 6.25 ng/mL	6.5	No realizada	<1.56 [a]	No realizada
	TrypZean estándar, 12.5 ng/mL	11.2	No realizada	<1.56 [a]	No realizada
	TrypZean estándar, 25 ng/ml	23.5	No realizada	<1.56 [a]	No realizada
	TrypZean estándar, 50 ng/mL	49.4	No realizada	<1.56 [a]	No realizada
	TrypZean estándar, 100 ng/mL	102.4	No realizada	<1.56 [a]	No realizada

55 **Tabla 13.** Actividad de SLAP media, informada como U/mg

60	Descripción	No adición
	PRT-201 del clon 55M3 Frasco #1	34.9
	PRT-201 del clon 55M3 Frasco #2	36.6
	PRT-201 del clon 55M3 Frasco #3	35.7
	PRT-201 del clon activado por tripsina	32.1

65

El nivel de actividad de tripsina de PRT-201 del clon 201-55M3-003-VU estuvo por debajo del intervalo de la curva patrón en el ensayo de actividad de tripsina (<1,56 ng/ml). Adicionalmente, los coeficientes de regresión para las reacciones de hidrólisis por triplicado fueron malos (<0,8), respaldando adicionalmente la ausencia de actividad de tripsina en esta proteína elastasa madura auto-activada. A diferencia, se determinó que el nivel de actividad de tripsina de la muestra activada por tripsina de control era 8,7 ng/ml.

7. LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO.	Descripción	Tipo de Secuencia	Secuencia
1	Elastasa I humana madura, Incluyendo la primera "valina"	Aminoácido, Formato de una sola letra, en donde: X = V o L	VVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTRFVAVAGDHNLSDNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNVDNAAGYDIALRLAQS VTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQLTQQAYLPSVDYAISSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGKYSXHGV TSFVSSRGCNVS RKPTVFTQVSAYISWINNVIASN
2	Elastasa I humana madura, menos primera "valina"	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	VGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTRFVAVAGDHNLSDNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNVDNAAGYDIALRLAQS VTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQLTQQAYLPSVDYAISSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGKYSXHGV TSFVSSRGCNVS RKPTVFTQVSAYISWINNVIASN
3	Elastasa I humana madura, menos las primeras dos "valinas"	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	GGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTRFVAVAGDHNLSDNDGTE QYVSVQKIVVHPYWNVDNAAGYDIALRLAQS VTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQLTQQAYLPSVDYAISSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGKYSXHGV TSFVSSRGCNVS RKPTVFTQVSAYISWINNVIASN
4	Elastasa I humana madura, con la primera "valina" sustituida por "alanina"	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	AVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTRFVAVAGDHNLSDNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNVDNAAGYDIALRLAQS VTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQLTQQAYLPSVDYAISSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGKYSXHGV TSFVSSRGCNVS RKPTVFTQVSAYISWINNVIASN
5	Elastasa I humana madura (isotipo 2), incluyendo la primera "valina"	Aminoácido, formato de una sola letra	VVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTRFVAVAGDHNLSDNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNVDNAAGYDIALRLAQS VTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQLTQQAYLPSVDYAISSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGSSSLWMPG
6	Proteína de elastasa manipulada no. 1 (variante pPROT42)	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde X = V o L	TQDLPETNAAVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTRFVAVAG DHNLSDNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNVDNAAGY DIALRLAQS VTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYI TGWGKTKTN GQLAQLTQQAYLPSVDYAISSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVS RKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
7	Proteína de elastasa manipulada no. 2	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	TQDLPETNAAVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTRFVAVAG DHNLSDNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNVDNAAGY DIALRLAQS VTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYI TGWGKTKTN GQLAQLTQQAYLPSVDYAISSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVS RKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
8	Proteína de elastasa manipulada no. 3	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	TQDLPETNAAVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTRFVAVAG DHNLSDNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNVDNAAGY DIALRLAQS VTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYI TGWGKTKTN GQLAQLTQQAYLPSVDYAISSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVS RKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN

5	9	Proteína de elastasa manipulada no. 4	Aminoácido, Formato de una sola letra, en donde: X = V o L	TQDLPETNNAPVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDNVAAGY DIALRLAQSRTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVS RKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
10	10	Elastasa del tipo salvaje no. 5 (producida de la secuencia de tripsina activada por pPROT24)	Aminoácido, Formato de una sola letra, en donde: X = V o L	TQDLPETNARVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDNVAAGY DIALRLAQSRTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVS RKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
15	11	Secuencia de reconocimiento de elastasa de consenso 1 (Posiciones Xaa ₁ =P3, Xaa ₂ =P2, Xaa ₃ =P1)	Aminoácido, formato de tres letras	Xaa ₁ Xaa ₂ Xaa ₃ Xaa ₁ = alanina, leucina, isoleucina, metionina, lisina, asparagina o valina Xaa ₂ = prolina, alanina, leucina, isoleucina, glicina, valina, o treonina Xaa ₃ = alanina, leucina, valina, isoleucina, o serina
20	12	Secuencia de reconocimiento de elastasa de consenso 2 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido, formato de tres letras	Xaa ₁ Pro Xaa ₂ Xaa ₁ = alanina, leucina, isoleucina, metionina, lisina, o valina Xaa ₂ = alanina, leucina, valina, isoleucina, o serina
25	13	Secuencia de reconocimiento de elastasa de consenso 3 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido, formato de tres letras	Xaa ₁ Xaa ₂ Xaa ₃ Xaa ₁ = asparagina or alanina Xaa ₂ = prolina or alanina Xaa ₃ = alanina o leucina o valina
30	14	Secuencia de reconocimiento de elastasa 1 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido, formato de tres letras	Ala Ala Ala
35	15	Secuencia de reconocimiento de elastasa 2 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido, formato de tres letras	Asn Ala Ala
40	16	Secuencia de reconocimiento de elastasa 3 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido, formato de tres letras	Asn Ala Pro
45				
50				
55				
60				
65				

ES 2 627 066 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

17	Secuencia de reconocimiento de la tripsina del tipo salvaje (pPROT24) (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido, formato de tres letras	Asn Ala Arg
18	Secuencia de reconocimiento de elastasa 5 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido, formato de tres letras	Ala Pro Ala
19	Secuencia de reconocimiento de elastasa 6 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido, formato de tres letras	Ala Ala Pro
20	Secuencia de reconocimiento de elastasa 7 (Posiciones P3-P2-P1 de las Variantes 48 y 55)	Aminoácido, formato de tres letras	Asn Pro Ala
21	Secuencia de reconocimiento de elastasa 8	Aminoácido, formato de tres letras	Leu Pro Ala
22	Secuencia de activación de la elastasa humana 1 (Tipo salvaje)	Aminoácido, formato de tres letras	Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Ala Arg
23	Secuencia de activación de la elastasa humana 2	Aminoácido, formato de tres letras	Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Ala Ala
24	sitio de escisión pro-PROT-201	Aminoácido, formato de tres letras	Thr Asn Ala Arg Val Val Gly Gly
25	sitio de escisión pPROT40	Aminoácido, formato de tres letras	Thr Ala Ala Ala Val Val Gly Gly
26	sitio de escisión pPROT41	Aminoácido, formato de tres letras	Thr Asn Ala Ala Ala Val Gly Gly
27	sitio de escisión pPROT42	Aminoácido, formato de tres letras	Thr Asn Ala Ala Val Val Gly Gly
28	sitio de escisión pPROT43	Aminoácido, formato de tres letras	Thr Asn Ala Pro Val Val Gly Gly

5	29	sitio de escisión pPROT44	Aminoácido, formato de tres letras	Thr Gly Ala Gly Ile Val Gly Gly
10	30	sitio de escisión pPROT45	Aminoácido, formato de tres letras	Thr Val Pro Gly Val Val Gly Gly
15	31	sitio de escisión pPROT46	Aminoácido, formato de tres letras	Thr Ala Pro Gly Val Val Gly Gly
20	32	sitio de escisión pPROT47	Aminoácido, formato de tres letras	Thr Asn Pro Gly Val Val Gly Gly
25	33	Región codificante de una elastasa-1 humana (Nº de Entrada NCBI No. N_001971)	Nucleotido	<p> ACCCAGGACCTTCCGGAAACCAATGCCCGCGTA GTCGGAGGGACTGAGGCCGGGAGGAATTCCTG GCCCTCTCAGATTTCCCTCCAGTACCGGTCTGG AGGTTCCCGGTATCACACCTGTGGAGGGACCC TATCAGACAGAAGTGGGTGATGACAGCTGCTCA CTGCGTGGATTACCAGAAGACTTCCGCGTGGT GGCTGGAGACCATAACCTGAGCCAGAATGATGG CACTGAGCAGTACGTGAGTGTGCAGAAGATCGT GGTGCATCCATACTGGAACAGCGATAACGTGGC TGCCGGCTATGACATCGCCCTGCTGCCCTGGC CCAGAGCGTTACCCCTCAATAGCTATGTCCAGCTG GGTGTTCTGCCCCAGGAGGGAGCCATCCTGGCT AACAAACAGTCCCTGCTACATCACAGGCTGGGGC AAGACCAAGACCAATGGGCAGCTGGCCAGACC CTGCAGCAGGCTTACCTGCCCTCTGTGGACTAC GCCATCTGCTCCAGCTCCTCCTACTGGGGCTCC ACTGTGAAGAACACCATGGTGTGTGCTGGTGGGA GATGGAGTTCGCTCTGGATGCCAGGGTGACTCT GGGGGCCCCCTCCATTGCTTGGTGAATGGCAAG TATTCTGTCCATGGAGTGACCAGCTTTGTGCCA GCCGGGGCTGTAATGTCTCCAGGAAGCCTACAG TCTTACCCAGGTCTCTGCTTACATCTCCTGGAT AAATAATGTCATCGCCTCCAACCTGA </p>
45	34	Péptido señal del factor alfa de levadura	Aminoácido, formato de tres letras	Met-Arg-Phe-Pro-Ser-Ile-Phe-Thr-Ala-Val-Leu-Phe-Ala-Ala-Ser-Ser-Ala-Leu-Ala-Ala-Pro-Val-Asn-Thr-
50	35	Cebador 20F	Nucleotido	ggctogagaaaagagaggctgaagctactcaggacctccggaaac caatgcccg
55	36	Cebador 24R	Nucleotido	gggccgcggttatcagttggaggcgtatgacat
60	37	Elastasa variante del sitio de escisión pPROT42 P3	Aminoácido, format de una sola letra, en donde: X -V o L	<p> AAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCG GTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQN DGTEQYVSVQKIVVHPYWNDSNVAAGYDIALRLA QSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKT KTNGLAQLLQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVK NTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGLHCLVNGKYSX HGVTSFVSSRGCNVSARKPTVFTQVSAYISWINNVIA SN </p>

60

65

5	38	Elastasa variante del sitio de escisión pPROT42 P2	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	AVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRHYHTCGGT LIRQNWVMTAAHCVDYQKTRFRVVGADHNLSDNDG TEQYVSVQKIVVHPYWNVDNVAAGYDIALLRLAQS VTLNSYVQLGVLPQEGAILANNPCYITGWGKTKT NGQLAQLTQQAYLPSVDYAI C S S S S Y W G S T V K N T MVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGKYSXHG VTSFVSSRGCNVSRKPTVFTQVSAYISWINNVIASN
10				
15	39	Elastasa I pancreática porcina madura (del N° de Entrada GenBank P00772.1)	Aminoácido, formato de una sola letra	VVGGTEAQRNSWPSQISLQYRSGSSWAHTCGGTL IRQNWVMTAAHCVDREL TFRVVVGEHNLNQNDDGT EQYVGVQKIVVHPYWNDDVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLP RAGTILANNPCYITGWGLTRTN GQLAQLTQQAYLPTVDYAI C S S S S Y W G S T V K N S M VCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGQYAVHGV TSFVSR LGCNVTRKPTVFRV SAYISWINNVIASN
20	40	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 40	Aminoácido, formato de tres letras	Glu Thr Ala Ala Ala Val Val Gly
25	41	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 41	Aminoácido, formato de tres letras	Glu Thr Asn Ala Ala Ala Val Gly
30	42	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 42	Aminoácido, formato de tres letras	Glu Thr Asn Ala Ala Val Val Gly
35	43	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 43	Aminoácido, formato de tres letras	Glu Thr Asn Ala Pro Val Val Gly
40	44	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 44	Aminoácido, formato de tres letras	Glu Thr Gly Ala Gly Ile Val Gly
45	45	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 45	Aminoácido, formato de tres letras	Glu Thr Val Pro Gly Val Val Gly
50	46	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 46	Aminoácido, formato de tres letras	Glu Thr Ala Pro Gly Val Val Gly
55	47	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 47	Aminoácido, formato de tres letras	Glu Thr Asn Pro Gly Val Val Gly
60	48	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 48	Aminoácido, formato de tres letras	Glu Thr Asn Pro Ala Val Val Gly
65				

5	49	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 49	Aminoácido, formato de tres letras	Glu Thr Asn His Ala Val Val Gly
10	50	Péptido señal, propéptido y secuencia espaciadora 1 del factor de acoplamiento alfa de levadura	Aminoácido, formato de tres letras	Met-Arg-Phe-Pro-Ser-Ile-Phe-Thr-Ala-Val-Leu-Phe-Ala-Ala-Ser-Ser-Ala-Leu-Ala-Ala-Pro-Val-Asn-Thr-Thr-Thr-Glu-Asp-Glu-Thr-Ala-Gln-Ile-Pro-Ala-Glu-Ala-Val-Ile-Gly-Tyr-Leu-Asp-Leu-Glu-Gly-Asp-Phe-Asp-Val-Ala-Val-Leu-Pro-Phe-Ser-Asn-Ser-Thr-Asn-Asn-Asn-Gly-Leu-Leu-Phe-Ile-Asn-Thr-Thr-Ile-Ala-Ser-Ile-Ala-Ala-Lys-Glu-Glu-Gly-Val-Ser-Leu-Asp-Lys-Arg-Glu-Ala-Glu-Ala
15	51	Péptido señal y secuencia propéptida 2 del factor de acoplamiento alfa de levadura	Aminoácido, formato de tres letras	Met-Arg-Phe-Pro-Ser-Ile-Phe-Thr-Ala-Val-Leu-Phe-Ala-Ala-Ser-Ser-Ala-Leu-Ala-Ala-Pro-Val-Asn-Thr-Thr-Thr-Glu-Asp-Glu-Thr-Ala-Gln-Ile-Pro-Ala-Glu-Ala-Val-Ile-Gly-Tyr-Leu-Asp-Leu-Glu-Gly-Asp-Phe-Asp-Val-Ala-Val-Leu-Pro-Phe-Ser-Asn-Ser-Thr-Asn-Asn-Asn-Gly-Leu-Leu-Phe-Ile-Asn-Thr-Thr-Ile-Ala-Ser-Ile-Ala-Ala-Lys-Glu-Glu-Gly-Val-Ser-Leu-Asp-
20	52	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 52	Aminoácido, formato de tres letras	Glu Thr Lys Pro Ala Val Val Gly
25	53	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 53	Aminoácido, formato de tres letras	Glu Thr His Pro Ala Val Val Gly
30	54	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 54	Aminoácido, formato de tres letras	Glu His Asn Pro Ala Val Val Gly
35	55	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 55	Aminoácido, formato de tres letras	His Thr Asn Pro Ala Val Val Gly
40	56	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 56	Aminoácido, formato de tres letras	Pro Thr His Pro Ala Val Val Gly
45	57	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 57	Aminoácido, formato de tres letras	Pro Thr Asn Pro Ala Val Val Gly
50	58	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 58	Aminoácido, formato de tres letras	His Thr His Pro Ala Val Val Gly

5	59	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 59	Aminoácido, formato de tres letras	Glu Thr Phe Pro Ala Val Val Gly
10	60	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 60	Aminoácido, formato de tres letras	His Thr Phe Pro Ala Val Val Gly
15	61	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 61	Aminoácido, formato de tres letras	Gly Thr Phe Pro Ala Val Val Gly
20	62	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 62	Aminoácido, formato de tres letras	His Thr Gly Pro Ala Val Val Gly
25	63	Dominio de escisión del propéptido variante de elastasa 63	Aminoácido, formato de tres letras	His Thr Lys Pro Ala Val Val Gly
30	64	Proenzima de elastasa con dominio de escisión variante 48	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	TQDLPETNPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTRVWAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSEFVSSRGCNVSARKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
35	65	Proenzima de elastasa con dominio de escisión variante 49	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	TQDLPETNHAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTRVWAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSEFVSSRGCNVSARKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
40	66	Proenzima de elastasa con dominio de escisión variante 52	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	TQDLPETKPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTRVWAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSEFVSSRGCNVSARKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
45	67	Proenzima de elastasa con dominio de escisión variante 53	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	TQDLPETHPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDYQKTRVWAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSEFVSSRGCNVSARKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
50				
55				
60				
65				

5	68	Proenzima de elastasa con dominio de escisión variante 54	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	TQDLPEHNPAVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWWMTAAHCVDYQKTRVWAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPEGAILANNPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAISSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGLHCLV NGKYSXHGVTSEFVSSRGCNVSARKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
10				
15	69	Proenzima de elastasa con dominio de escisión variante 55	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	TQDLPHNPAVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SRYHTCGGTLIRQNWWMTAAHCVDYQKTRVWAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPEGAILANNPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAISSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGLHCLV NGKYSXHGVTSEFVSSRGCNVSARKPTVFTQVSAYIS WINNVIASN
20				
25	70	Elastasa del tipo salvaje + variante de escisión AlaArg	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	ARVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCG GTLIRQNWWMTAAHCVDYQKTRVWAGDHNLSQND GTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGYDIALLRLA QSVTLNSYVQLGVLPEGAILANNPCYITGWGKTK TNGQLAQLTQQAYLPSVDYAISSSSYWGSTVK NTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGLHCLVNGKYSX HGVTSEFVSSRGCNVSARKPTVFTQVSAYISWINNVI ASN
30				
35	71	Elastasa del tipo salvaje + variante de escisión Arg	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: X = V o L	RVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGG TLIRQNWWMTAAHCVDYQKTRVWAGDHNLSQND GTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGYDIALLRLAQ SVTLNSYVQLGVLPEGAILANNPCYITGWGKTK TNGQLAQLTQQAYLPSVDYAISSSSYWGSTVKNT MVCAGGDGVRSGCQGDSSGGLHCLVNGKYSXHG VTSFVSSRGCNVSARKPTVFTQVSAYISWINNVIASN
40	72	Péptido de activación de elastasa humana Variante 48	Aminoácido, formato de tres letras	Thr Gln Asp Leu Pro Glu Thr Asn Pro Ala
45	73	Péptido de activación de elastasa humana Variante 55	Aminoácido, formato de tres letras	Thr Gln Asp Leu Pro His Thr Asn Pro Ala
50				
55	74	Secuencia de consenso del dominio de escisión de elastasa humana; corresponde a residuos P5, P4, P3, P2, P1, P'1, P'2, yd P'3 de un dominio de escisión de elastasa	Aminoácido, formato de tres letras	Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa1 = glutamato, histidina, prolina, glicina, asparagina, lisina, o alanina Xaa2 = treonina, alanina, prolina o histidina Xaa3 = alanina, leucina, isoleucina, methionine, lisina, asparagina o valina Xaa4 = prolina, alanina, leucina, isoleucina, glicina, valina, o treonina Xaa5 = alanina, leucina, valina, isoleucina, o serina Xaa6 = alanina, leucina, valina, isoleucina o serina Xaa7 = glicina, alanina, o valina Xaa8 = valina, treonina, phenylalanina, tyrosine, o tryptophan
60				
65				

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

75	Cebador de la mutagénesis de PCR	Ácido nucleico	ATC TAC GTA GTC GGA GGG ACT GAG GCC
76	Cebador de la mutagénesis de PCR	Ácido nucleico	gtc gac aag ctt atc agt tgg agg cga t
77	Variante C-terminal de ELA1 Madura de Talas y otros	Proteína, formato de una sola letra	VVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSRYHTCGGTL IRQNWVMTAAHCVDYQKTFRVVAGDHNLSQNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQTQQAYLPSVDYAICSSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGVRSGCQGDSSGPPPLLGEWQVFSWP SDQLCVQPGL
78	Variantes de ELA1 maduras	Proteína, formato de una sola letra, en donde: B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	VVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTL IRQNWVJTAAHCVYQKTFRVVAGDHNLSQNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTN GQLAQTQQAYLPSVDYAICSSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDGVRSGCQGDSSGPLHCLVNGKYSXHGV TSFVSSRGCNVS RKPTVFTZVSAYISWINNVIASN
79	Variantes del péptido de activación (tipo salvaje, escindible por tripsina)	Proteína, formato de una sola letra, en donde U = Q o H	TUDLPETNAR
80	Consenso de variantes del péptido de activación	Proteína, formato de tres letras	Thr Xaa1 Asp Leu Pro Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa1 = glutamina o histidina Xaa2 = glutamato, histidina, prolina, glicina, asparagina, lisina, o alanina Xaa3 = treonina, alanina, prolina o histidina Xaa4 = alanina, leucina, isoleucina, metionina, lisina, asparagina o valine Xaa5= prolina, alanina, leucina, isoleucina, glicina, valina, o treonina Xaa6 = alanina, leucina, valina, isoleucina, o serina
81	Región codificante de ELA-1.2A	Nucleotido	ACTCAGGACCTTCCGGAAACCAATGCCCGGGTA GTCCGAGGGACTGAGGCCGGGAGGAACCTCCTG GCCCTCTCAGATTTCCCTCCAGTACCGGTCTGG AGGTTCCCTGGTATCACACCTGTGGAGGGACCC TATCAGACAGAAGCTGGGTGATGACAGCTGCACA CTGCGTGGATTACCAGAAGACTTCCGCGTGGT GGCTGGAGACCATAACCTGAGCCAGAATGATGG CACTGAGCAGTACGTGAGTGTGCAGAAGATCGT GGTGCATCCATACTGGAACAGCGATAACGTGGC TGCAGGCTATGACATCGCCCTGCTGCGCCTGGC CCAGAGCGTTACCCTCAATAGCTATGTCCAGCTG GGTGTCTGCCCCAGGAGGGAGCCATCCTGGCT AACACAGTCCCTGCTACATCACAGGCTGGGGC AAGACCAAGACCAATGGGCAGCTGGCCCAGACC TTGCAGCAGGCTTACCTGCCCTCTGTGGACTAT GCCATCTGCTCCAGCTCCTCCTACTGGGGCTCC ACTGTGAAGAACTATGGTGTGTGCTGGTGGGA GATGGAGTTCGCTCTGGATGTCAGGGTGAICT GGGGGCCCCCTCCATTGCTTGGTGAATGGCAAG TATTCTTTCATGGAGTGACCAGCTTTGTGTCCA GCCGGGGCTGTAATGTCTCTAGAAAGCCTACAG TCTTCACACGGGTCTCTGCTTACATCTCCTGGAT AAATAATGTCATCGCCTCCAACCTGATAA

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

<p>82</p>	<p>Producto de la Traducción de ELA-1.2A (secuencia de pPROT24 activada por tripsina)</p>	<p>Proteína, formato de una sola letra</p>	<p>TQDLPETNARVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SWYHTCGGTLIRQNWWMTAAHCVDYQKTRFVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLLQAYLPSVDYAISSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTFSVSSRGCNVSARKPTVFTFTRVSAYIS WINNVIASN</p>
<p>83</p>	<p>Variantes del producto de la traducción de ELA-1.2A (secuencia de pPROT24 activada por tripsina)</p>	<p>Proteína, formato de una sola letra, en donde: U = Q o H B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R</p>	<p>TUDLPETNARVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWWJTAAHCVYQKTRFVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLLQAYLPSVDYAISSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTFSVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN</p>
<p>84</p>	<p>Elastasa I humana madura, incluyendo la primera "valina"</p>	<p>Aminoácido, format de una sola letra, en donde: B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R</p>	<p>VVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSSBYHTCGGTL IRQNWWJTAAHCVYQKTRFVVAGDHNLSQNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKT GQLAQTLLQAYLPSVDYAISSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGKYSXHG VTSFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYISWINNVIASN</p>
<p>85</p>	<p>Elastasa I humana madura, menos la primera "valina"</p>	<p>Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R</p>	<p>VGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSSBYHTCGGTL RQNWWJTAAHCVYQKTRFVVAGDHNLSQNDGTE EQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKT GQLAQTLLQAYLPSVDYAISSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGKYSXHG VTSFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYISWINNVIASN</p>
<p>86</p>	<p>Elastasa I humana madura, menos las primeras dos "valinas"</p>	<p>Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R</p>	<p>GGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSSBYHTCGGTL RQNWWJTAAHCVYQKTRFVVAGDHNLSQNDGTE EQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKT GQLAQTLLQAYLPSVDYAISSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGKYSXHG VTSFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYISWINNVIASN</p>
<p>87</p>	<p>Elastasa I humana madura, con la primera "valina" sustituida por "alanina"</p>	<p>Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R</p>	<p>AVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSSBYHTCGGTL IRQNWWJTAAHCVYQKTRFVVAGDHNLSQNDGT EQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGYDIALLRLAQSV TLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKT GQLAQTLLQAYLPSVDYAISSSSSYWGSTVKNTM VCAGGDDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGKYSXHG VTSFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYISWINNVIASN</p>

65

5	88	Proteína de elastasa manipulada no. 1 (variante pPROT42)	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: U = Q o H B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	TUDLPETNAAVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWWJTAHCVDYQKTRVWAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALRLAQSVTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLLQAYLPSVDYAISSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGLHCLV NGKYSXHGVTSTFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
10	89	Proteína de elastasa manipulada no. 2	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: U = Q o H B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	TUDLPETNAAVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWWJTAHCVDYQKTRVWAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALRLAQSVTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLLQAYLPSVDYAISSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGLHCLV NGKYSXHGVTSTFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
15	90	Proteína de elastasa manipulada no. 3	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: U = Q o H B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	TUDLPETAADVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWWJTAHCVDYQKTRVWAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALRLAQSVTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLLQAYLPSVDYAISSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGLHCLV NGKYSXHGVTSTFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
20	91	Proteína de elastasa manipulada no. 4	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: U = Q o H B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	TUDLPETNAPVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWWJTAHCVDYQKTRVWAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALRLAQSVTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLLQAYLPSVDYAISSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGLHCLV NGKYSXHGVTSTFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
25	92	Proteína de elastasa manipulada no. 5 (secuencia activada por tripsina de pPROT24)	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: U = Q o H B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	TUDLPETNARVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWWJTAHCVDYQKTRVWAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALRLAQSVTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQTLLQAYLPSVDYAISSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGLHCLV NGKYSXHGVTSTFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
30	93	Secuencia de reconocimiento de elastasa de consenso 2 (Posiciones P3-P2-P1)	Aminoácido, formato de tres letras	Xaa1 Pro Xaa2 Xaa1 = alanina, leucina, isoleucina, metionina, lisina, asparagina o valina Xaa2 = alanina, leucina, valina, isoleucina, o serina
35				
40				
45				
50				
55				
60				

5	94	Elastasa variante del sitio de escisión de pPROT42 P3	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	AAVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCG GTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTRVWAGDHNLSQN DGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGYDIALRLA QSVTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYITGWGKT KTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVK NTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGKYSX HGVTSFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYISWINNVIA SN
10	95	Elastasa variante del sitio de escisión de pPROT42 P2	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	AVVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGT LIRQNWVJTAAHCVDYQKTRVWAGDHNLSQNDG TEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGYDIALRLAQS VTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYITGWGKT KTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSYWGSTVKNT MVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLVNGKYSXHG VTSFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYISWINNVIA SN
15	96	Péptido señal del factor alfa de levadura, propéptido, y secuencia espaciadora	Aminoácido, formato de tres letras	Met-Arg-Phe-Pro-Ser-Ile-Phe-Thr-Ala-Val-Leu-Phe- Ala-Ala-Ser-Ser-Ala-Leu-Ala-Ala-Pro-Val-Asn-Thr- Thr-Thr-Glu-Asp-Glu-Thr-Ala-Gln-Ile-Pro-Ala-Glu- Ala-Val-Ile-Gly-Tyr-Ser-Asp-Leu-Glu-Gly-Asp-Phe- Asp-Val-Ala-Val-Leu-Pro-Phe-Ser-Asn-Ser-Thr-Asn- Asn-Gly-Leu-Leu-Phe-Ile-Asn-Thr-Thr-Ile-Ala-Ser-Ile- Ala-Ala-Lys-Glu-Glu-Gly-Val-Ser-Leu-Glu-Lys-Arg- Glu-Ala-Glu-Ala
20	97	Péptido señal del factor alfa de levadura y secuencia espaciadora	Aminoácido, formato de tres letras	Met-Arg-Phe-Pro-Ser-Ile-Phe-Thr-Ala-Val-Leu-Phe- Ala-Ala-Ser-Ser-Ala-Leu-Ala-Ala-Pro-Val-Asn-Thr- Thr-Thr-Glu-Asp-Glu-Thr-Ala-Gln-Ile-Pro-Ala-Glu- Ala-Val-Ile-Gly-Tyr-Ser-Asp-Leu-Glu-Gly-Asp-Phe- Asp-Val-Ala-Val-Leu-Pro-Phe-Ser-Asn-Ser-Thr-Asn- Asn-Gly-Leu-Leu-Phe-Ile-Asn-Thr-Thr-Ile-Ala-Ser-Ile- Ala-Ala-Lys-Glu-Glu-Gly-Val-Ser-Leu-Glu-
25	98	Proenzima de elastasa con dominio de escisión variante 48	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: U = Q o H B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	TUDLPETNPAVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTRVWAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALRLAQSRTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTFSVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
30	99	Proenzima de elastasa con dominio de escisión variante 49	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: U = Q o H B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	TUDLPETNHAVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTRVWAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNNDVAAGY DIALRLAQSRTLNSYVQLGVLPEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTFSVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN

5	100	Proenzima de elastasa con dominio de escisión variante 52	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: U = Q o H B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	TUDLPETKPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTRFVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSRTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
10	101	Proenzima de elastasa con dominio de escisión variante 53	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: U = Q o H B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	TUDLPETHPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTRFVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSRTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
15	102	Proenzima de elastasa con dominio de escisión variante 54	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: U = Q o H B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	TUDLPEHNPAAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTRFVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSRTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
20	103	Proenzima de elastasa con dominio de escisión variante 55	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: U = Q o H B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	TUDLPHTNPAVVGGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTRFVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSRTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
25	104	Elastasa del tipo salvaje + variante de escisión AlaArg	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	ARVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTRFVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSRTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
30	105	Elastasa del tipo salvaje + variante de escisión Arg	Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R	RVVVGTEAGRNSWPSQISLQYRSGG SBYHTCGGTLIRQNWVJTAAHCVDYQKTRFVVAG DHNLSQNDGTEQYVSVQKIVVHPYWNSDNVAAGY DIALLRLAQSRTLNSYVQLGVLPQEGAILANNSPCYI TGWGKTKTNGQLAQLTQQAYLPSVDYAICSSSSY WGSTVKNTMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGPLHCLV NGKYSXHGVTSFVSSRGCNVSARKPTVFTZVSAYIS WINNVIASN
35				
40				
45				
50				
55				
60				
65				

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

<p>106</p>	<p>Elastasa I humana madura, menos la secuencia "VVG" N terminal</p>	<p>Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R</p>	<p>TEAGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTLIRQN WVJTAAHCVDYQKTRVAVAGDHNLSQNDGTEQYV SVQKIVVHPYWNNDVAAGYDIALLRQAQSVTLNS YVQLGVLPEGAILANNSPCYITGWGKTKTNGQLA QTLQQAAYLPSVDYAISSSSYWGSTVKNTMVCAG GDGVRSGCQGDSSGGLHCLVNGKYSXHGVTSFV SSRGCNVSARKPTVFTZVSAYISWINNVIASN</p>
<p>107</p>	<p>Elastasa I humana madura, menos la secuencia "VVGTE" N terminal</p>	<p>Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R</p>	<p>AGRNSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTLIRQNWV JTAAHCVDYQKTRVAVAGDHNLSQNDGTEQYVSV QKIVVHPYWNNDVAAGYDIALLRQAQSVTLNSYV QLGVLPEGAILANNSPCYITGWGKTKTNGQLAQT LQQAAYLPSVDYAISSSSYWGSTVKNTMVCAGGD GVRSGCQGDSSGGLHCLVNGKYSXHGVTSFVSS RGCNVSARKPTVFTZVSAYISWINNVIASN</p>
<p>108</p>	<p>Elastasa I humana madura, menos la secuencia "VVGTEA GR" N terminal</p>	<p>Aminoácido, formato de una sola letra, en donde: B = W o R J = M o V X = V o L Z = Q o R</p>	<p>NSWPSQISLQYRSGGSBYHTCGGTLIRQNWVJTA AHCVDYQKTRVAVAGDHNLSQNDGTEQYVSVQKI VVHPYWNNDVAAGYDIALLRQAQSVTLNSYVQLG VLPQEGAILANNSPCYITGWGKTKTNGQLAQTLLQ AYLPSVDYAISSSSYWGSTVKNTMVCAGGDGVR SGCQGDSSGGLHCLVNGKYSXHGVTSFVSSRGC NVSARKPTVFTZVSAYISWINNVIASN</p>
<p>109</p>	<p>Secuencia de la Figura 1A</p>	<p>Acido Nucleico</p>	<p>GAATTCAGTACTCAGGACCTTCCGGAAACCAATG CCCAGGTTAGTCCGAGGGACTGAGGCCGGGAGG AACTCCTGCCCCCTCTCAGATTTCCCTCCAGTACC GGTCTGGAGGTTCCCTGGTATCACACCTGTGGAG GGACCCCTTATCAGACAGAAGTGGTGATGACAG CTGCACACTGCGTGGATTACCAGAAGACTTTCC GCGTGGTGGCTGGAGACCATAACCTGAGCCAGA ATGATGGCACTGAGCAGTACGTGAGTGTGCAGA AGATCGTGGTGCATCCATACTGGAACAGCGATA ACGTGGCTGCAGGCTATGACATCGCCCTGCTGC GCCTGGCCAGAGCGTTACCCTCAATAGCTATG TCCAGCTGGGTGTTCTGCCCCAGGAGGGAGCCA TCTTGGCTAACACAGTCCCTGCTACATCACAGG CTGGGGCAAGACCAAGACCAATGGGCAGCTGG CCCAGACCTTGCAGCAGGCTTACCTGCCCTCTG TGGACTATGCCATCTGCTCCAGCTCCTCCTACTG GGGCTCCACTGTGAAGAACAATATGGTGTGTGC TGGTGGAGATGGAGTTCGCTCTGGATGTCAGGG TGAATCTGGGGGGCCCCCTCCATTGCTTGGTGAA TGGCAAGTATTCTTTCATGGAGTGACCAGCTTT GTGTCAGCCGGGGCTGTAATGTCCTAGAAAG CCTACAGTCTTACACGGGTCTCTGCTTACATCT CCTGGATAAATAATGTCATCGCCTCCAATGATA AGCTTGGATCCGTCGAC</p>
<p>110</p>	<p>Secuencia de la Figura 1A</p>	<p>Aminoácido, formato de una sola letra</p>	<p>MKRILAIHQAMEGAPRVTLTSRANSISTSTHHSVLH SGAPVGGAGADGIVHRGQVSLQLQGLQPLIGLGLA PACDVAGTVVVSQDGSLLGQNTQLDIAIEGNALGQA QQGDVIACSHVIAVPVWMHDDLHLLHLLSAILAQ VMVSSHAESELLVIHAVCSCHHPVLSDKGPSTGVI PGTSRPVLEGNLRGPGVPPGLSPSDYPGIGFRKVL S</p>

5	111	Secuencia de la Figura 1B	Acido Nucleico	ACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGG GTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTACT CAGGACCTTCCGGAAACCAATGCCCGGGTAGTC GGGGGG
10	112	Secuencia de la Figura 1B	Aminoácido, formato de tres letras	THR ILE ALA SER ILE ALA ALA LYS GLU GLU GLY VAL SER LEU GLU LYS ARG GLU ALA GLU ALA THR GLN ASP LEU PRO GLU THR ASN ALA ARG VAL VAL GLY GLY
15	113	Secuencia de la Figura 13	Acido Nucleico	CCGCGGACCCAGGACTTTCCAGAAACCAACGCC CGGGTAGTTGGAGGGACCGAGGCTCAGAGGAA TTCTTGGCCATCTCAGATTTCCCTCCAGTACCGG TCTGGAAGTTCGTGGGCTCACACCTGTGGAGGG ACCCTCATCAGGCAGAAGTGGGTGATGACAGCC GCTCACTGCGTGGACAGAGAGTTGACCTTCCGT GTGGTGGTTGGAGAGCACAACCTGAACCAGAAC GATGGCACCGAGCAGTACGTGGGGGTGCAGAA GATCGTGGTGCATCCCTACTGGAACACCGACGA CGTGGCTGCAGGCTATGACATCGCCCTGCTGCG CCTGGCCAGAGTGTAACCCCTCAACAGCTACGT CCAGCTGGGTGTTCTGCCAAGGGCTGGGACCAT CCTGGCTAACAACAGTCCCTGCTACATCACAGG GTGGGGCCTGACCAGGACCAATGGGCAGCTGG CCCAGACCCTGCAGCAGGCTTACCTGCCACCG TGGACTACGCCATCTGCTCCAGCTCCTCGTACT GGGGCTCCACCGTGAAGAACAGCATGGTGTGCG CCGGAGGGGACGGAGTTCGCTCTGGATGTCAG GGTGATTCTGGGGGCCCCCTTCATTGCTTGGTG AATGGTCAGTATGCTGTCCACGGTGTACCAGCT TCGTGTCCCGCCTGGGCTGTAATGTACCAGGA AGCCACAGTCTTACCAGGGTCTCTGCTTACAT CTCTTGGATAAATAACGTCATTGCCAGCAACTGA TAATCTAGA
20				
25				
30				
35	114	Secuencia de la Figura 14	Aminoácido, formato de una sola letra	TQDFPETNARVVGTEAQRNSWPSQISLQYRSGS SWAHTCGGTLIRQNWVMTAAHCVDRELTFRVWVG EHNLNQNDGTEQYVGVQKIVVHPYWNDDVAAGY DIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPRAGTILANNPCYI TGWGLTRTNQLAQTLQAYLPTVDYAICSSSY WGSTVKNSMVCAGGDGVRSGCQGDSSGGLHCLV NGQYAVHGVTSFVSRLLGCNVTRKPTVFRVRSAYIS WINNVIASN
40	115	Secuencia del dominio de escisión de pPROT101-24-V activado por tripsina	Aminoácido, formato de tres letras	Phe Pro Glu Thr Asn Ala Arg Val Val Gly
45	116	Secuencia del dominio de escisión de pPROT101-42-V auto-activado	Aminoácido	Phe Pro Glu Thr Asn Ala Ala Val Val Gly
50	117	Secuencia del dominio de escisión de pPROT101-49-V auto-activada	Aminoácido	Leu Pro His Thr Asn Pro Ala Val Val Gly
55	118	Secuencia del dominio de escisión pPROT101-55L-V auto-activada	Aminoácido	Phe Pro Glu Thr Asn His Ala Val Val Gly
60				
65				

Reivindicaciones

- 5 **1.** Una proteína proelastasa autoactivante que comprende (i) una secuencia de propéptidos que comprende una secuencia de péptidos de activación de elastasa que comprende una secuencia de aminoácidos designada P10-P9-P8-P7-P6-P5-P4-P3-P2-P1, de la que los aminoácidos P3-P2-P1 están diseñados para formar una secuencia de reconocimiento de elastasa operativamente ligada a (ii) una secuencia de aminoácidos de una elastasa tipo I madura cuyos tres aminoácidos N-terminales están designados P1'- P2'- P3', en la que
- 10 (a) la secuencia de propéptidos no es nativa para la elastasa tipo I madura, y
(b) cuando se somete a condiciones de autoactivación, se produce una elastasa tipo I madura.
- 2.** La proteína proelastasa autoactivante de la reivindicación 1, en la que:
- 15 (a) la secuencia de reconocimiento de elastasa tiene un residuo de prolina localizado en la posición P2;
(b) los aminoácidos P3 a P1 consisten de la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°:11, SEC ID N°:12, SEC ID N°:13, SEC ID N°:18, SEC ID N°:20, SEC ID N°:21, o SEC ID N°:93;
(c) los aminoácidos P5 a P3' consisten de los aminoácidos de las SEC ID N°:48, SEC ID N°:49, SEC ID N°:52, SEC ID N°:53, SEC ID N°:54, SEC ID N°:55, SEC ID N°:56, SEC ID N°:57, SEC ID N°: 58, SEC ID N°: 59, o SEC ID N°:60; o
20 (d) los aminoácidos P10 a P1 consisten de la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°:72, SEC ID N°:73, o SEC ID N°:80.
- 3.** La proteína proelastasa autoactivante de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la que:
- 25 (a) la proteína proelastasa autoactivante comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC IS N°:66 o SEC ID N°:68;
(b) la elastasa tipo I madura es una elastasa tipo I humana madura, que comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que tiene:
- 30 (i) al menos un 85% de identidad de secuencia, al menos un 95% de identidad de secuencia, al menos un 98% de identidad de secuencia, al menos un 99% de identidad de secuencia o un 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N° 1, SEC ID N°:78, o SEC ID N°:84; o
(ii) no más de 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones de aminoácidos conservadoras en comparación con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°:1 o SEC ID N°:84 y/o no más de 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones de aminoácidos no conservadoras en comparación con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°:1, SEC ID N°:78 o SEC ID N°:84; o
- 35 (c) la elastasa tipo I madura es una elastasa tipo I porcina madura, que comprende opcionalmente una secuencia de aminoácidos que tiene:
- 40 (i) al menos un 85% de identidad de secuencia, al menos un 95% de identidad de secuencia, al menos un 98% de identidad de secuencia, al menos un 99% de identidad de secuencia o un 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:39; o
(ii) no más de 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones de aminoácidos conservadoras en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:39 y/o no más de 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones de aminoácidos no conservadoras en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:39.
- 45 **4.** La proteína proelastasa autoactivante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que:
- 50 (a) carece de una secuencia señal;
(b) comprende una secuencia señal, que es opcionalmente:
- 55 (i) una secuencia señal que es operable en *Pichia pastoris*, que es opcionalmente una secuencia señal del factor de levadura y/o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:34; o
(ii) una secuencia señal de secreción mamífera, que es opcionalmente una secuencia señal de elastasa tipo I humana o una secuencia señal de elastasa tipo 1 porcina;
- 60 (c) comprende un propéptido del factor alfa de levadura;
(d) comprende una o más secuencias espaciadoras, opcionalmente en el que al menos una secuencia espaciadora es una secuencia Kex2 y/o una secuencia STE13;
(e) carece de un residuo de metionina N-terminal; o
(f) comprende un residuo de metionina N-terminal.
- 65

5. Un sobrenadante de cultivo celular que comprende la proteína proelastasa pancreática tipo I autoactivante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína proelastasa autoactivante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6, opcionalmente en el que:
- (a) la secuencia que codifica la proteína proelastasa autoactivante está multimerizada;
 - (b) la secuencia que codifica la proteína proelastasa autoactivante utiliza codones que se utilizan preferiblemente en *Pichia pastoris*; o
 - (c) el vector comprende un gen marcador seleccionable de resistencia a Zeocina.
8. Una célula huésped que:
- (a) está diseñada genéticamente para expresar la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6, opcionalmente en el que:
 - (i) una copia de dicho ácido nucleico está integrada en el genoma de la célula huésped; o
 - (ii) más de una copia de dicho ácido nucleico está integrada en el genoma de la célula huésped, opcionalmente en el que 2-5 copias, 2 copias o 3 copias del ácido nucleico están integradas en el genoma de la célula huésped; o
 - (b) comprende un vector de la reivindicación 7, opcionalmente en el que:
 - (i) una copia de dicho vector está integrada en el genoma de la célula huésped; o
 - (ii) más de una copia de dicho vector está integrada en el genoma de la célula huésped, opcionalmente en el que 2-5 copias, 2 copias o 3 copias del vector están integradas en el genoma de la célula huésped.
9. La célula huésped de la reivindicación 8, en la que la expresión de la proteína proelastasa autoactivante está bajo el control de un promotor inducible por metanol y/o en la que la célula huésped es una célula huésped de *Pichia pastoris*.
10. Un procedimiento de producir una proteína elastasa autoactivante, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 8 o la reivindicación 9 bajo condiciones que resultan en la producción de la proteína proelastasa autoactivante y recuperar la proteína proelastasa autoactivante, opcionalmente en el que:
- (a) la célula huésped se cultiva en medio complejo, que es opcionalmente medio complejo tamponado con metanol o medio complejo tamponado con glicerol; y/o
 - (b) la expresión de la proteína proelastasa autoactivante está bajo control de un promotor inducible por metanol en el que las condiciones de cultivo incluyen un periodo de inducción con metanol; y/o
 - (c) la célula huésped se cultiva en presencia de un compuesto de citrato, succinato o acetato, opcionalmente en el que
 - (i) el compuesto de citrato, succinato o acetato es citrato de sodio, succinato de sodio o acetato de sodio, respectivamente; y/o
 - (ii) al menos un compuesto de citrato, succinato o acetato está presente en dicho cultivo a una concentración de 5 - 50 mM, 7.5 - 100 mM, 10 - 150 mM, 50 - 200 mM, 100 - 150 mM, 75 - 125 mM, o 90 - 110 mM; y/o
 - (d) la célula huésped es una célula huésped de *Pichia pastoris*, y en el que las condiciones de cultivo comprenden un periodo de crecimiento o inducción:
 - (i) a una temperatura de 22 -28° C; o
 - (ii) a un pH de 2-6; y/o
 - (e) la célula huésped se cultiva en medio complejo y el paso de recuperar la proteína proelastasa autoactivante comprende recuperar el sobrenadante del cultivo de la célula huésped y comprende opcionalmente además recuperar la proteína proelastasa autoactivante del sobrenadante.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende además someter a la proteína de proelastasa autoactivante recuperada a condiciones de activación de tal manera que se produzca la proteína elastasa tipo I madura, opcionalmente en el que:
- (a) las condiciones de activación comprenden ajustar el pH de una solución que contiene la proteína proelastasa autoactivante a un pH básico, un pH de 7-9; o un pH de 8 hasta que se produzca la proteína

elastasa tipo I madura, y opcionalmente:

- 5 (i) mantener el pH durante un periodo de 0,5-8 horas, 2-7 horas, o 6 horas;
 (ii) la exposición a un pH básico se realiza a una temperatura de 22° C - 28° C o una temperatura de 26° C; y/o
 (iii) la concentración de la proteína proelastasa autoactivante en la solución es menor de 10 mg/ml, menos de 5 mg/ml, menos de 2 mg/ml, menos de 1 mg/ml, menos de 0,5 mg/ml, menos de 0,25 mg/ml y/o al menos 0,1 mg/ml o al menos 0,2 mg/ml; y/o

- 10 (b) las condiciones de activación comprenden la adición de una cantidad catalítica de elastasa a la solución que contiene la proteína proelastasa autoactivante; y/o
 (c) la autoactivación se lleva a cabo en presencia de base Tris a una concentración de 50-200 mM, 75-175 mM, 100-150 mM, 75-125 mM; y/o
 15 (d) mantener las condiciones de activación hasta que las variantes N-terminales se reducen a un intervalo del 0-2%.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que:

- 20 (a) el paso de autoactivación se realiza después de la purificación de la proteína proelastasa autoactivante; o
 (b) el paso de autoactivación se realiza en un sobrenadante.

13. El procedimiento de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, que comprende además el paso de aislar la proteína elastasa tipo I madura, opcionalmente en el que:

- 25 (a) la proteína elastasa tipo I madura se aísla por cromatografía en columna, opcionalmente en el que la cromatografía incluye cromatografía de intercambio catiónico; y/o
 (b) se eliminan las formas glicosiladas de la proteína elastasa tipo I madura.

30 14. Un procedimiento para producir una formulación de proteína elastasa tipo I madura, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) someter la proteína proelastasa autoactivante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 a condiciones de activación de tal manera que se produzca proteína elastasa tipo I madura;
 35 (b) opcionalmente, purificar la elastasa tipo I madura; y
 (c) formular la proteína elastasa tipo I madura,

produciendo de este modo una composición farmacéutica que comprende dicha proteína elastasa madura tipo I.

40 15. El procedimiento de la reivindicación 14, que comprende purificar la elastasa tipo I madura a través de cromatografía en columna, opcionalmente cromatografía de intercambio catiónico.

45 16. El procedimiento de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en el que la formulación de la proteína elastasa tipo I madura comprende liofilizar dicha elastasa tipo I madura, opcionalmente comprendiendo además mezclas la proteína elastasa tipo I madura con uno o más ingredientes de tamponamiento antes o después de la liofilización.

17. Una composición farmacéutica que:

- 50 (a) comprende una proteína elastasa tipo I madura que tiene una actividad de 20 a 50 U/mg de proteína como se cuantifica usando un ensayo de hidrólisis de N-succinil-Ala-Ala-p-Nitroanilida (SLAP) colorimétrico, en la que el límite superior de tripsina en dicha composición farmacéutica es menor de 25 ng de tripsina por 1 mg de proteína elastasa tipo I madura, y en la que :

- 55 (i) la elastasa tipo I madura comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 85% de identidad de secuencia, al menos un 95% de identidad de secuencia, al menos un 98% de identidad de secuencia o al menos un 99% de identidad de secuencia, o comprende un 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°:1, SEC ID N°:78, o SEC ID N°:84; o
 (ii) la proteína elastasa tipo I madura comprende una secuencia de aminoácidos que no tiene más de 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o no más de 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones de aminoácidos no conservadoras en comparación con la secuencia de aminoácidos de las
 60 SEC ID N°:1, SEC ID N°:78, o SEC ID N°:84; o

- (b) comprende una proteína elastasa tipo I madura que tiene una actividad de 20 a 100 U/mg de proteína como se cuantifica usando un ensayo de hidrólisis de N-succinil-Ala-Ala-p-Nitroanilida (SLAP) colorimétrico, en la que el límite superior de tripsina en dicha composición farmacéutica es menor de 25 ng de tripsina por 1 mg de proteína elastasa tipo I madura, y opcionalmente en la que:
- 65

(i) la elastasa tipo I madura comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 85% de identidad de secuencia, al menos un 95% de identidad de secuencia, al menos un 98% de identidad de secuencia o al menos un 99% de identidad de secuencia, o comprende un 100% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:39; o

(ii) la proteína elastasa tipo I madura comprende una secuencia de aminoácidos que no tiene más de 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o no más de 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones de aminoácidos no conservadoras en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:39.

10 **18.** La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en la que:

(a) el límite superior de actividad de tripsina en dicha composición es menor de 4, 3, 2, ó 1,56 ng por 1 mg de proteína elastasa tipo I madura, opcionalmente en la que el límite superior de la actividad de tripsina en dicha composición se cuantifica usando un ensayo de actividad de tripsina colorimétrico N-benzoil-Phe-Val-Arg-p-Nitroanilida (BENZ);

(b) la composición farmacéutica está libre de tripsina; y/o

(c) la composición farmacéutica **está caracterizada por** uno o más de los siguientes:

(i) la composición farmacéutica está libre de proteínas bacterianas;

(ii) la composición farmacéutica está libre de proteínas mamíferas distintas de las de dicha proteína elastasa madura;

(iii) la cantidad de endotoxina en dicha composición farmacéutica no excede una cantidad farmacéuticamente aceptable, no excede de 10 EU por gramo de elastasa tipo I o no excede de 5 EU por gramo de elastasa tipo I;

(iv) la composición farmacéutica está en la forma de una dosificación unitaria que comprende 0,0033 mg - 200 mg de dicha proteína elastasa madura;

(v) la composición farmacéutica comprende polisorbato-80;

(vi) la composición farmacéutica comprende dextrano;

(vii) la composición farmacéutica comprende iones de sodio, iones de potasio, iones de fosfato, iones de cloro, y polisorbato 80;

(viii) la composición farmacéutica comprende iones de sodio, iones de potasio, iones de fosfato, iones de cloro, y dextrano;

(ix) la composición farmacéutica comprende iones de sodio, iones de potasio, iones de fosfato, iones de cloro, polisorbato 80 y dextrano;

(x) la composición farmacéutica comprende trehalosa;

(xi) la composición farmacéutica comprende manitol;

(xii) la proteína elastasa madura en la composición farmacéutica mantiene del 60% al 100% de su actividad específica después de al menos un mes de almacenamiento a 4° C, después de al menos tres meses de almacenamiento a 4° C o después de al menos seis meses de almacenamiento a 4° C.

19. La composición farmacéutica de la reivindicación 17(1), que:

(a) contiene menos del 0,5% por peso de una proteína que consiste de la SEC ID N°:2 y/o menos del 0,5% por peso de una proteína que consiste de la SEC ID N°:3, y está opcionalmente libre o sustancialmente libre de una proteína de la SEC ID N°:2 y una proteína que consiste de la SEC ID N°:3; y/o

(b) está libre o sustancialmente libre de cualquier proteína que consiste de las SEC ID N°:70 y 71; y opcionalmente

(c) está libre o sustancialmente libre de una o más proteínas que consisten de cualquiera de las SEC ID N°: 37, 38, 85, 86, 94, 95, 104, 105, 106, 107, y 108, preferiblemente libre o sustancialmente libre de cualquier proteína que consiste de cualquiera de las SEC ID N°: 37, 38, 85, 86, 94, 95, 104, 105, 106, 107, o 108.

20. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, que es una composición farmacéutica liofilizada.

21. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, que es una composición líquida, y opcionalmente:

(a) comprende cloruro sódico;

(b) comprende solución salina tamponada con fosfato;

(c) comprende un tampón de fosfato;

(d) comprende manitol a una concentración de 2-10% en peso por volumen o 2,5-4% en peso por volumen;

(e) comprende polisorbato-80 a una concentración de 0,001 - 5% en peso por volumen o de 0,01% en peso por volumen;

(f) tiene una osmolalidad de 125 -500 mOsm/kg o 275-325 mOsm/kg; o

(g) tiene una concentración de elastasa tipo I madura de 0,1 mg/ml - 50 mg/ml.

22. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, que:

(a) comprende 137 mM de cloruro sódico, 2,7 mM de fosfato potásico, 10 mM de fosfato sódico, tiene un pH de 7.4, opcionalmente donde:

5 (i) la composición farmacéutica comprende 0,01% de polisorbato-80 y opcionalmente donde la concentración de proteína elastasa tipo I madura en dicha composición farmacéutica es de 0,001-50 mg/ml;

10 (ii) la concentración de proteína elastasa tipo I madura en dicha composición farmacéutica es de 0,001-50 mg/ml y la composición farmacéutica comprende del 5-10% o del 6-9% de un excipiente seleccionado de dextrosa, lactosa, manitol, sacarosa, trehalosa, dextrano-70, glicerina, arginina, glicina, dextrano-44 o dextrano-18; o

15 (iii) la concentración de proteína elastasa tipo I madura en dicha composición farmacéutica es de 0,001-50 mg/ml y la composición comprende además un 8% de dextrano-18 y opcionalmente un 0,1% de polisorbato-80; o

(b) comprende uno o más de dextrosa, lactosa, manitol, sacarosa, trehalosa, dextrano-70, glicerina, arginina, glicina, dextrano-44 y dextrano-18 en una concentración agregada del 2-10% p/v, 2,5-8% p/v, o 4-6% p/v.

20 23. Una composición farmacéutica como se define en cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22 para su uso en un método de:

(a) tratar o prevenir una enfermedad en conductos biológicos administrando la composición farmacéutica a un paciente con necesidad de ello, opcionalmente donde:

25 (i) la composición farmacéutica se administra parenteralmente;

(ii) la composición farmacéutica se administra directamente a una pared del vaso sanguíneo;

30 (iii) la composición farmacéutica se administra directamente a la superficie adventicia externa de un vaso quirúrgicamente expuesto; o

(iv) la composición farmacéutica se administra a una pared de un vaso usando un catéter de administración de fármacos:

(b) aumentar terapéuticamente el diámetro de una arteria o vena en un sujeto humano con necesidad de ello administrando localmente la composición farmacéutica a la pared de la arteria o vena en el sujeto humano;

35 (c) prevenir el vasospasmo de una arteria o vena en un sujeto humano con necesidad de ello administrando localmente la composición farmacéutica a la pared de la arteria o vena en el sujeto humano;

(d) tratar una arteria o vena obstruida en un sujeto humano con necesidad de dicho tratamiento administrando localmente la composición farmacéutica a la pared de la arteria o vena en el sujeto humano, en donde dicha administración da lugar a la proteólisis de elastina en la pared de la arteria o vena llevando al agrandamiento del diámetro de la arteria o vena;

40 (e) tratar una arteria o vena conectada a un injerto de hemodiálisis arteriovenosa o fístula arteriovenosa en un sujeto humano con necesidad de dicho tratamiento administrando localmente la composición farmacéutica a la pared de la arteria o vena en el sujeto humano, en donde dicha administración da lugar a la proteólisis de elastina en la pared de la arteria o vena llevando al agrandamiento del diámetro de la arteria o vena; o

45 (f) tratar una vena en un sujeto humano para su uso en hemodiálisis administrando localmente la composición farmacéutica a la pared de la vena en el sujeto humano, en donde dicha administración da lugar a la proteólisis de elastina en la pared de la vena llevando al agrandamiento del diámetro de la vena.

50

55

60

65

- Proteínas y Componentes de elastasa**
- (1) secuencia señal
 - (2) propéptido opcional/secuencia(s) espaciadora(s)
 - (3) propéptido de elastasa
 - (4) péptido de activación
 - (5) secuencia de reconocimiento
 - (6) dominio de escisión
 - (7) sitio de escisión
 - (8) proteína de preproelastasa
 - (9) proteína de proelastasa (careciendo de secuencia señal)
 - (10) proteína de elastasa madura

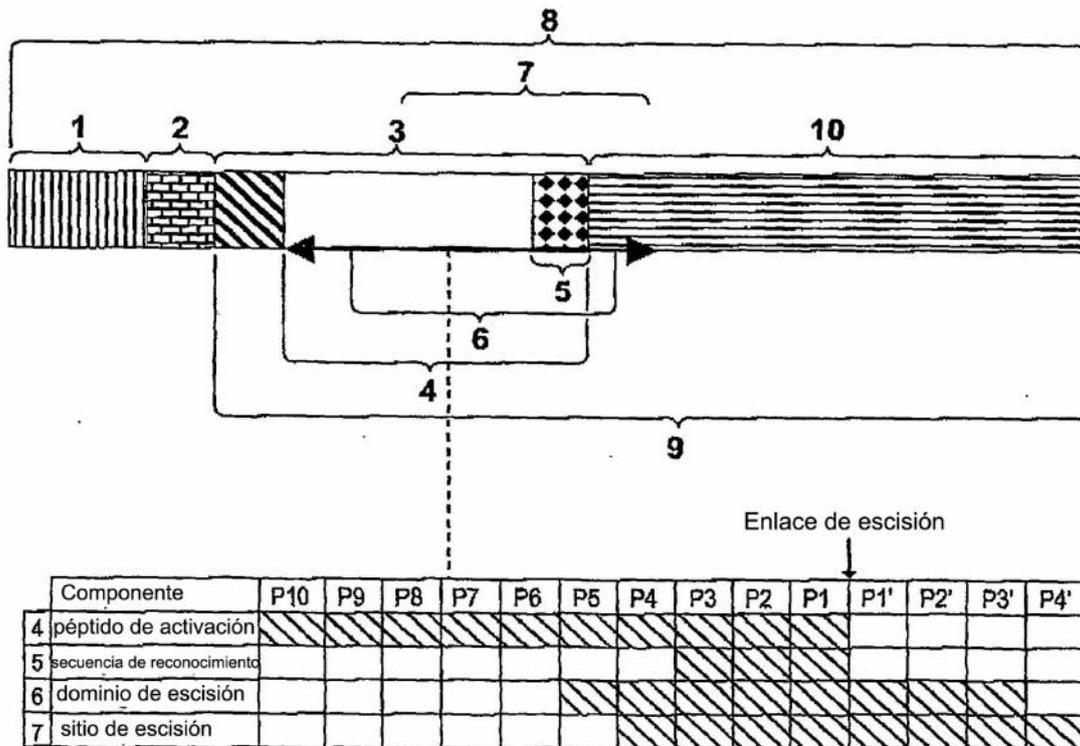


Figura 2

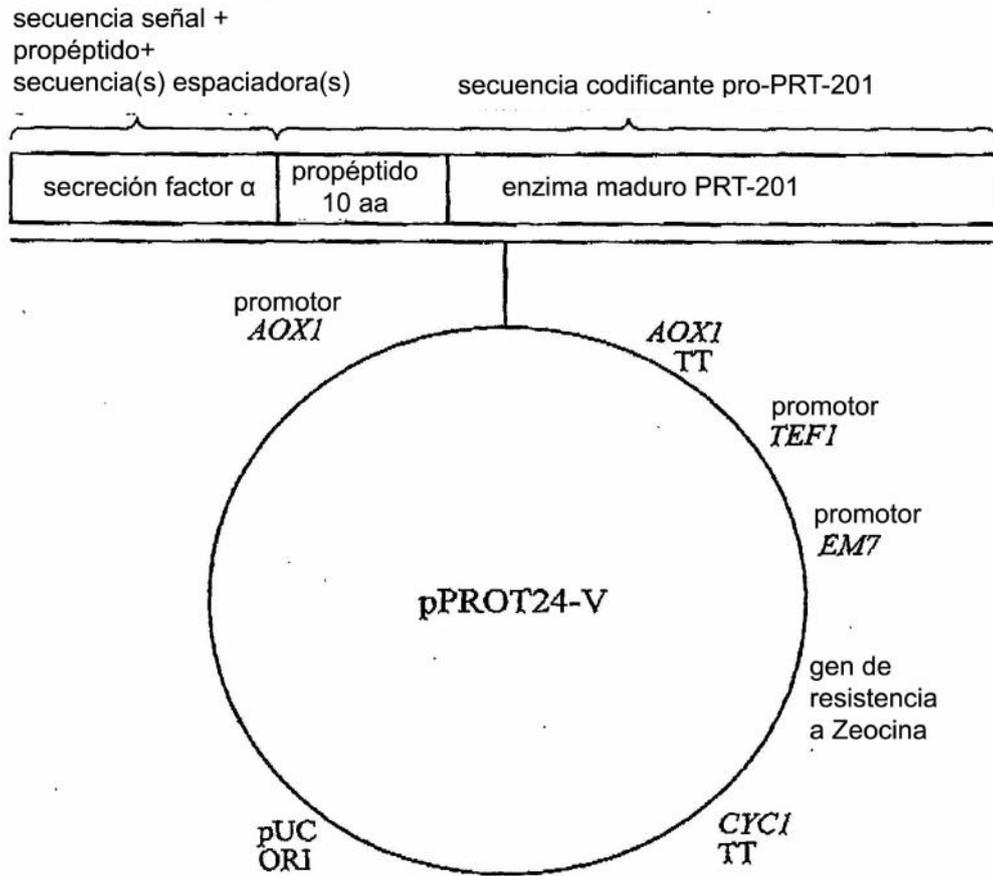


Figura 3

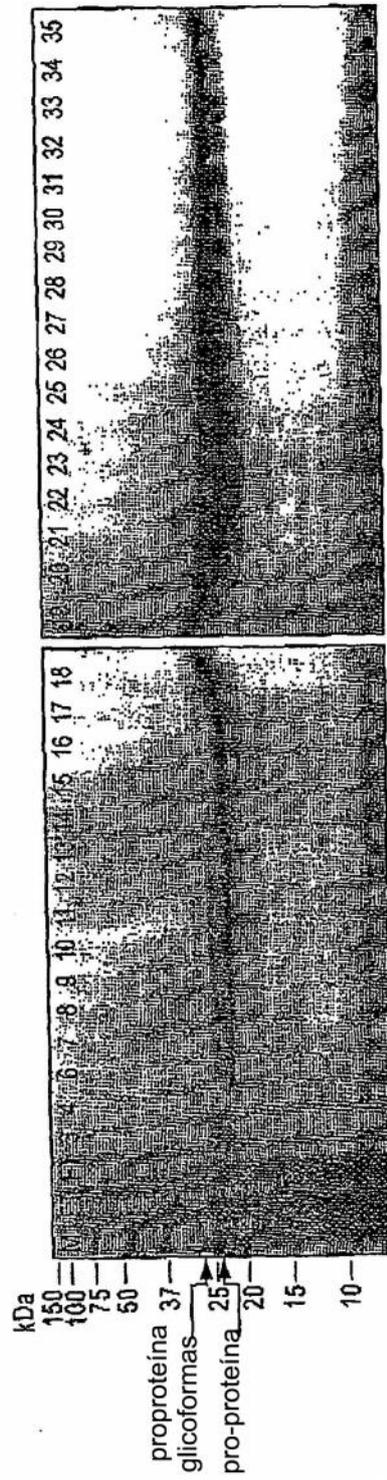


Figura 4

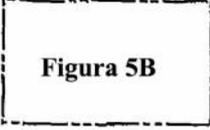
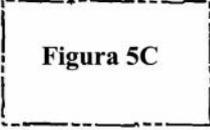
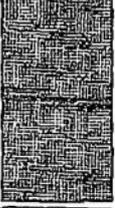
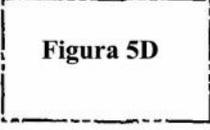
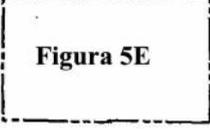
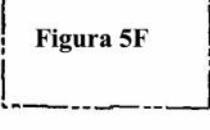
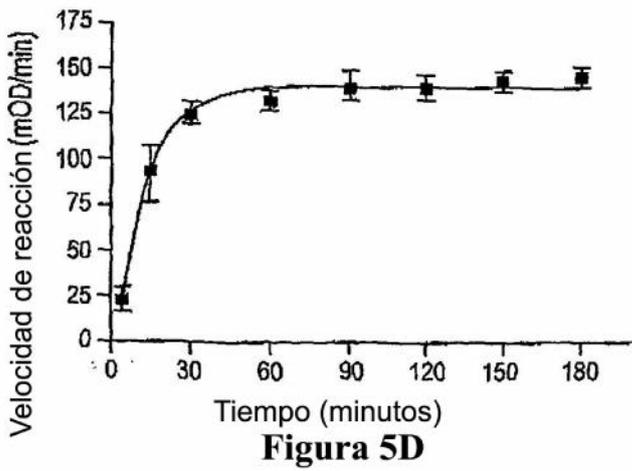
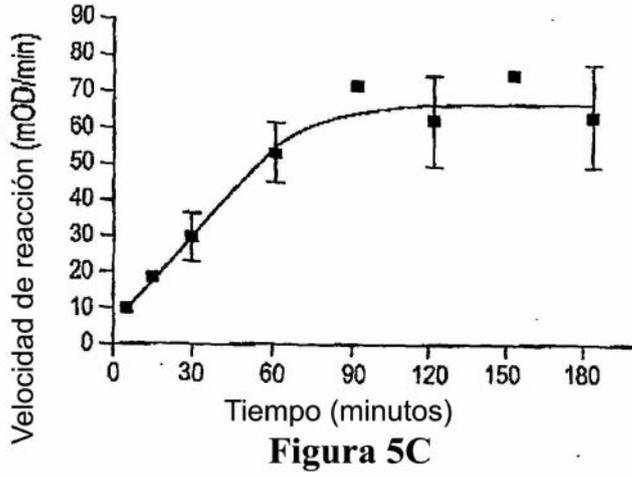
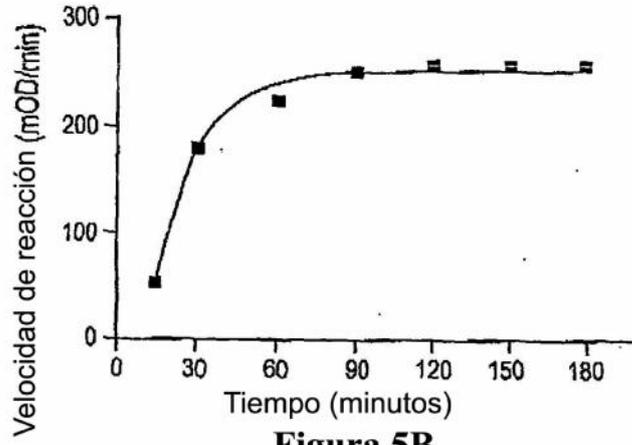
Secuencia del propéptido	Análisis SDS-PAGE	Rendimiento Frasco de Agitación	Estabilidad Frasco de Agitación	Velocidad de conversión	% de Variantes N-terminales
24		Alto	Alta	Rápida 	20%
42		Bajo	Baja	Intermedia 	25%
48		Intermedio	Baja	Rápida 	15%
49		Alto	Alta	Lenta 	35%
55		Intermedio-Alto	Intermedia	Intermedia 	15%

Figura 5A



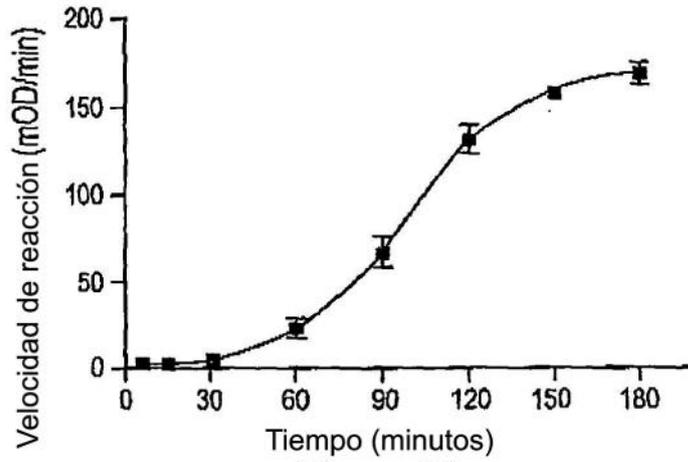


Figura 5E

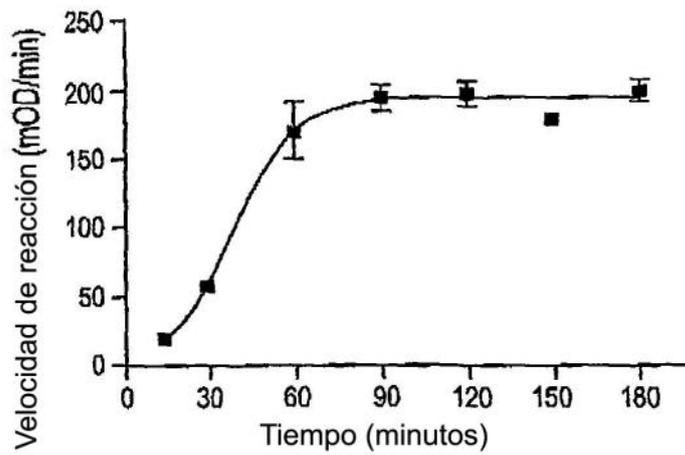


Figura 5F

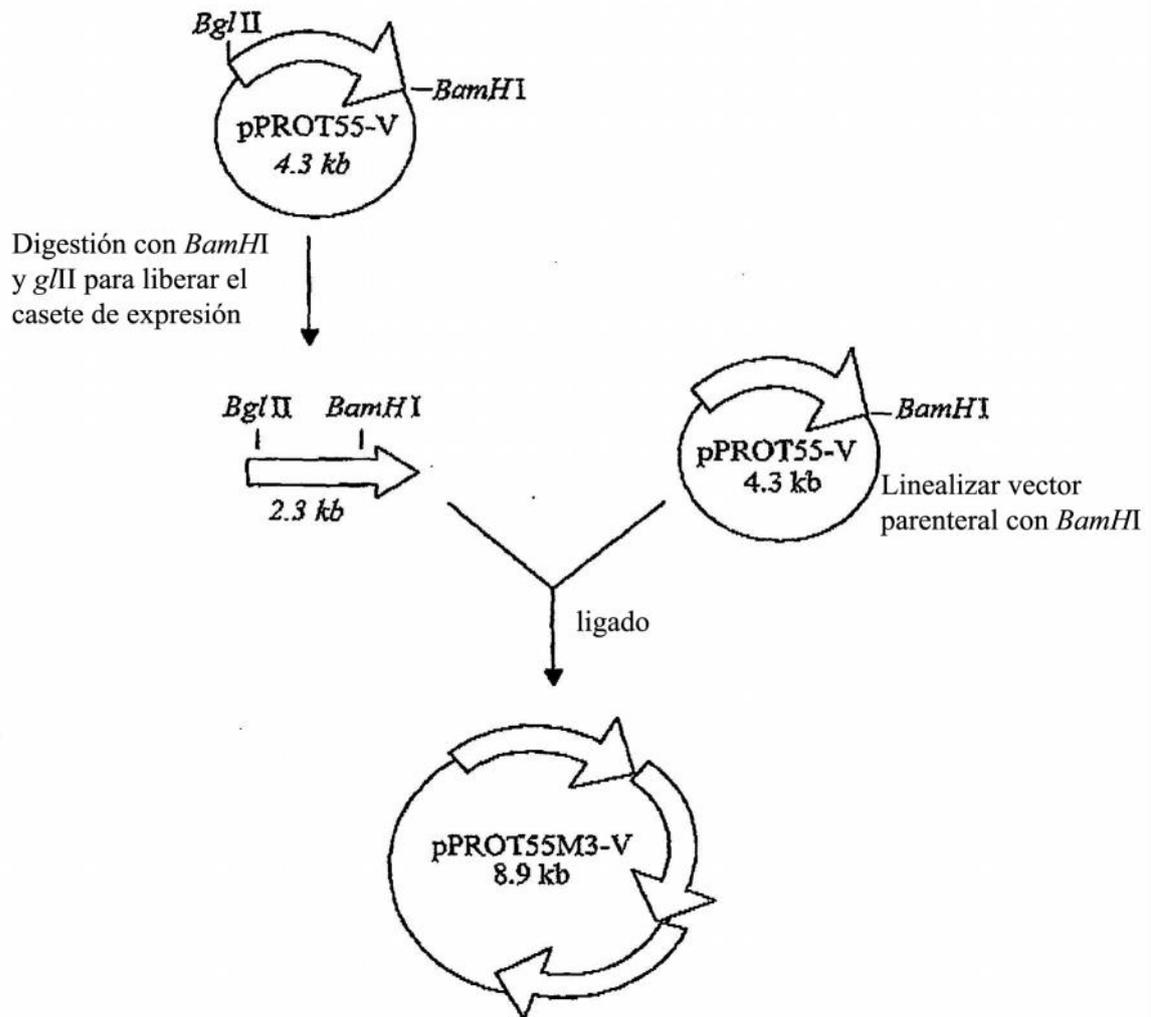


Figura 6

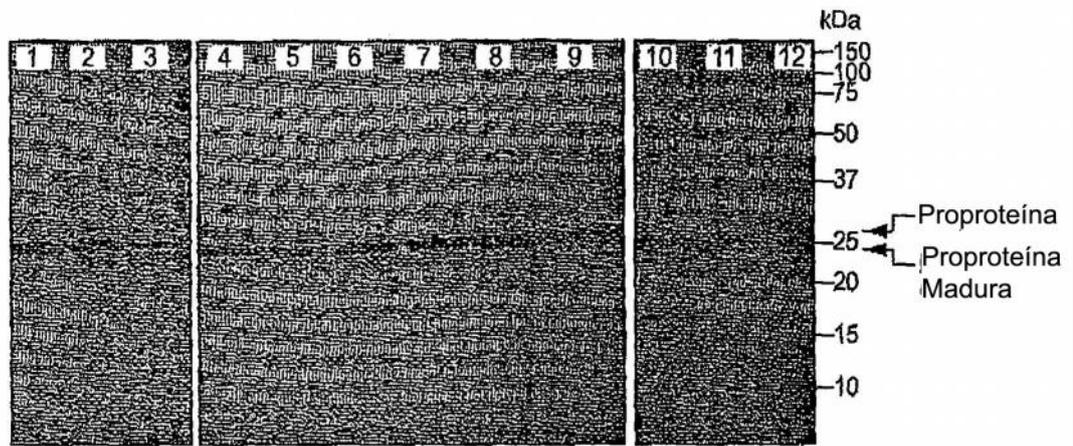


Figura 7A

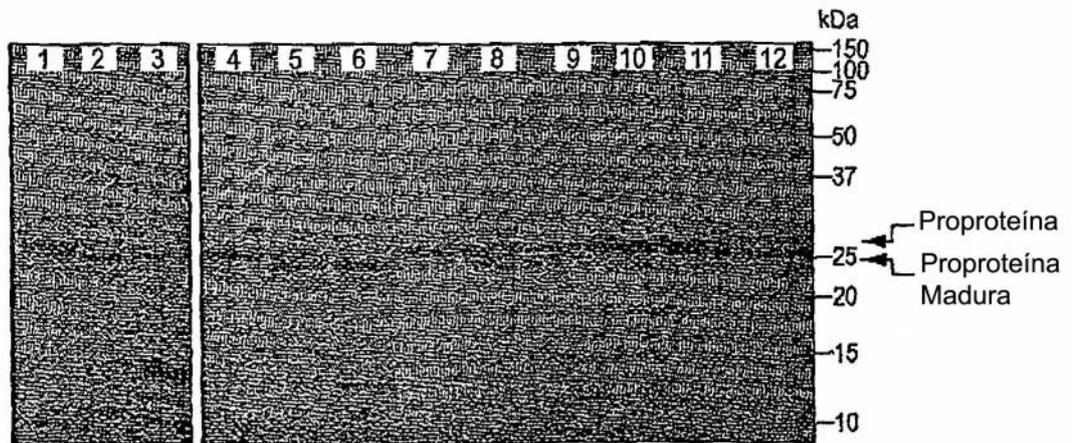


Figura 7B

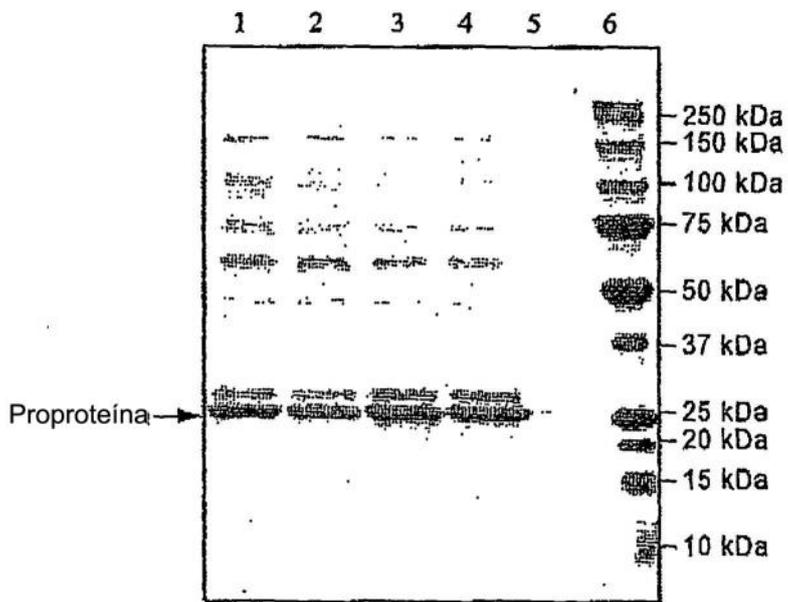


Figura 8

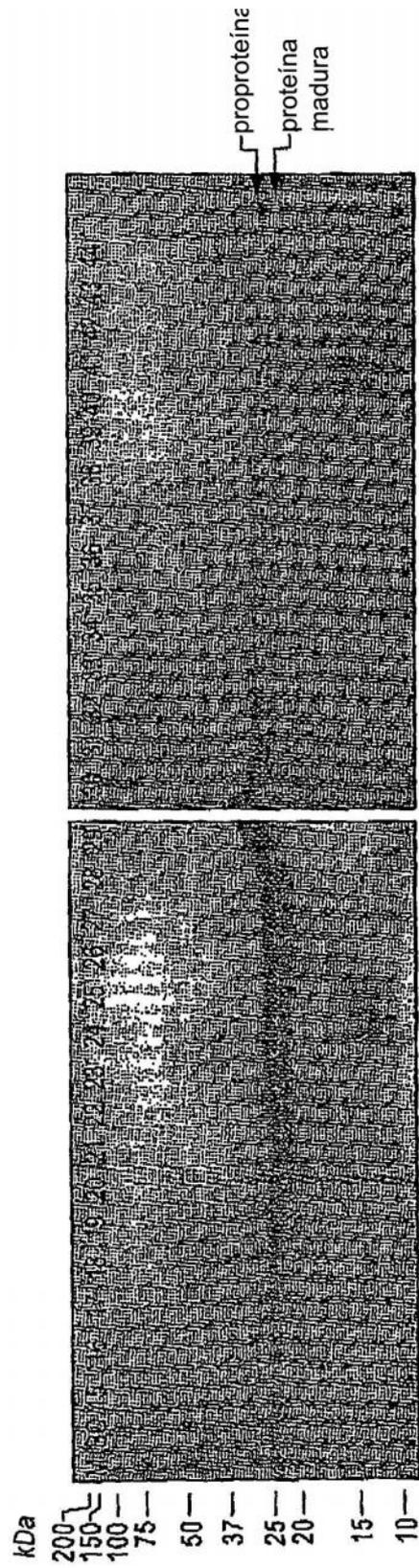


Figura 9

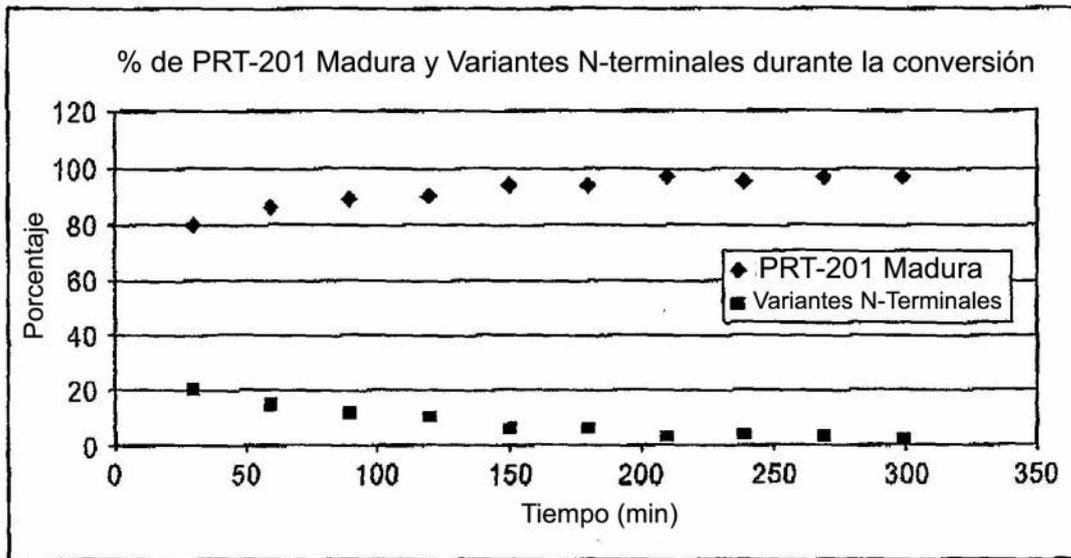


Figura 10

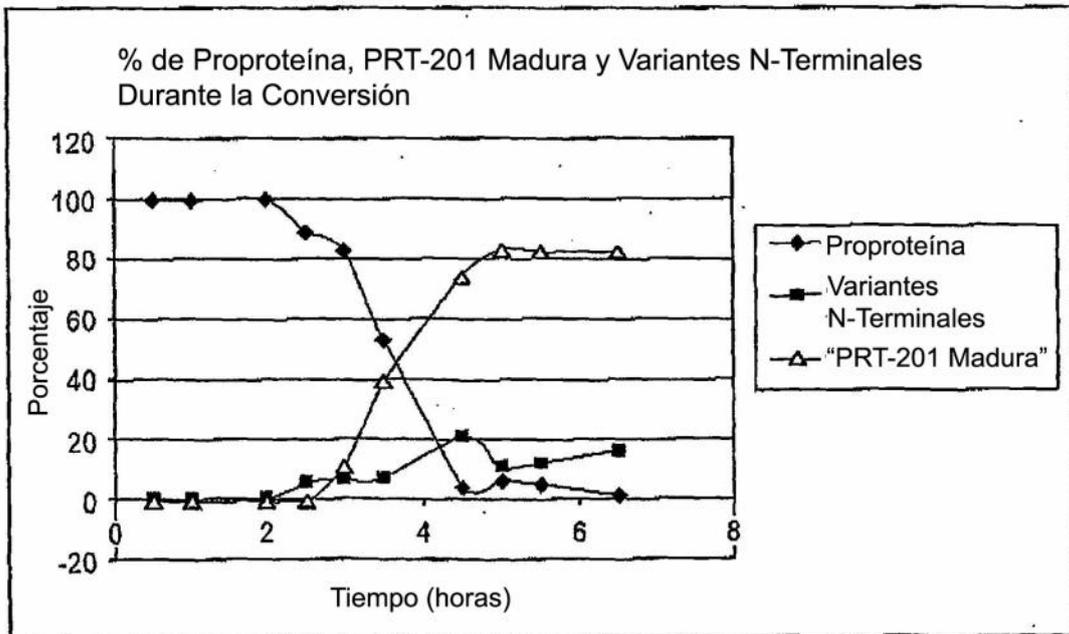


Figura 11

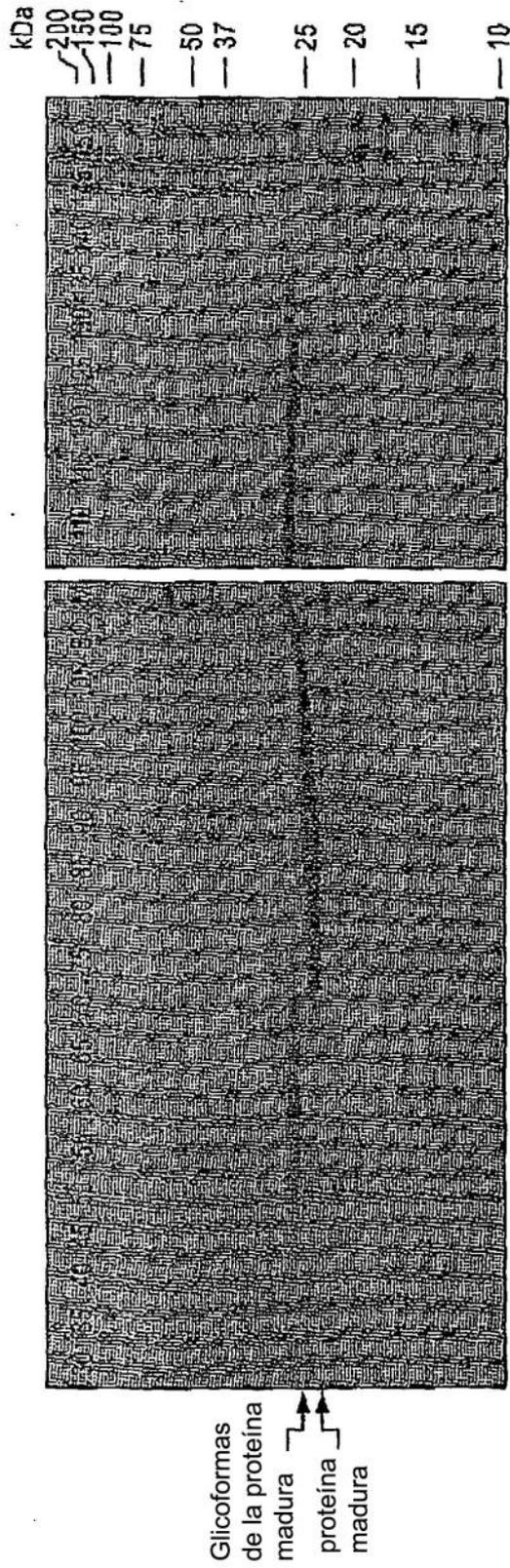


Figura 12

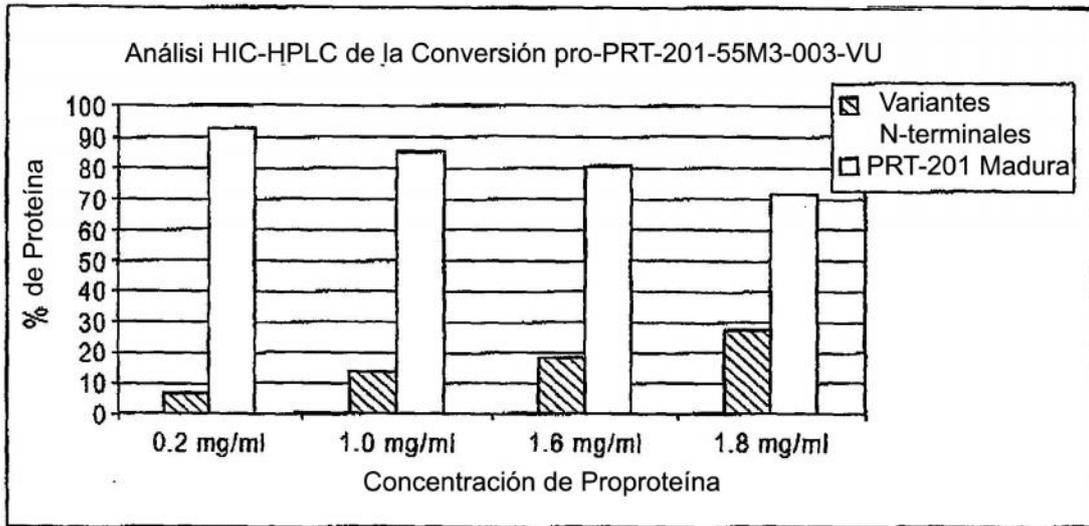


Figura 13

SacII
 cccgggaccaggactttccagaaaccaagccgggtagtgggagggaccgaggctcagaggaattctt
 ggccatctcagatttccctccagtagcgggtctggaagttcgtgggctcacacctgtggagggaccctcat
 caggcagaactgggtgatgacagccgctcactgctggacagagagttgacctccggtggtggttggg
 gagcacaacctgaaccagAACGATGGCAccgagcagtagctgggggtgcagaagatcgtggtgcatccct
 actggaacaccgacgacgtggctgcaggctatgacatcgccctgctgcgctggcccagagtgtaacct
 caacagctacgtccagctgggtgttctgccaagggctgggaccatcctgggtAACCAACAGTCCCTGCTAC
 atcacagggtggggcctgaccaggaccaatgggcagctggcccagaccctgcagcaggcttacctgcca
 ccgtggactacgccatctgctccagctcctcgtactggggctccaccgtgaagaacagcatggtgtgctg
 cggaggggaccggagtctgctctggatgtcagggtgattctgggggccccttcatctgcttggtgaatggt
 cagtatgctgtccacgggtgtaaccagctcctgctcaccgctgggctgtaatgtcaaccaggaagcccacag
 tcttccaccagggtctctgcttaccatctcttgataaataacgtcattgcccagcaacctgataactctaga
 Stop Stop XbaI

Figura 14

<u>TQDFPETNA</u> R	VVGGTEAQRN	SWPSQISLOY	RSRSSWAHTC	GRTLIRQNWV
MTAAHCVDRE	LFRVUVGEH	NLNQNDGTEQ	YGVQKIVVH	PWNTDDVAA
GYDIALLRLLA	QSVTLNSYVQ	LGVLPRAGTI	LANNSPCYIT	GWGLTRTNGQ
LAQTLQQAYL	PTVDYAI CSS	SSYWGSTVKN	SMVCAGGDGV	RSGCQGDSGG
PLHCLVNGQY	AVHGVTSFVS	RLGCNVTRKP	TVFTRVSAYI	SWINNVIASN

Figura 15

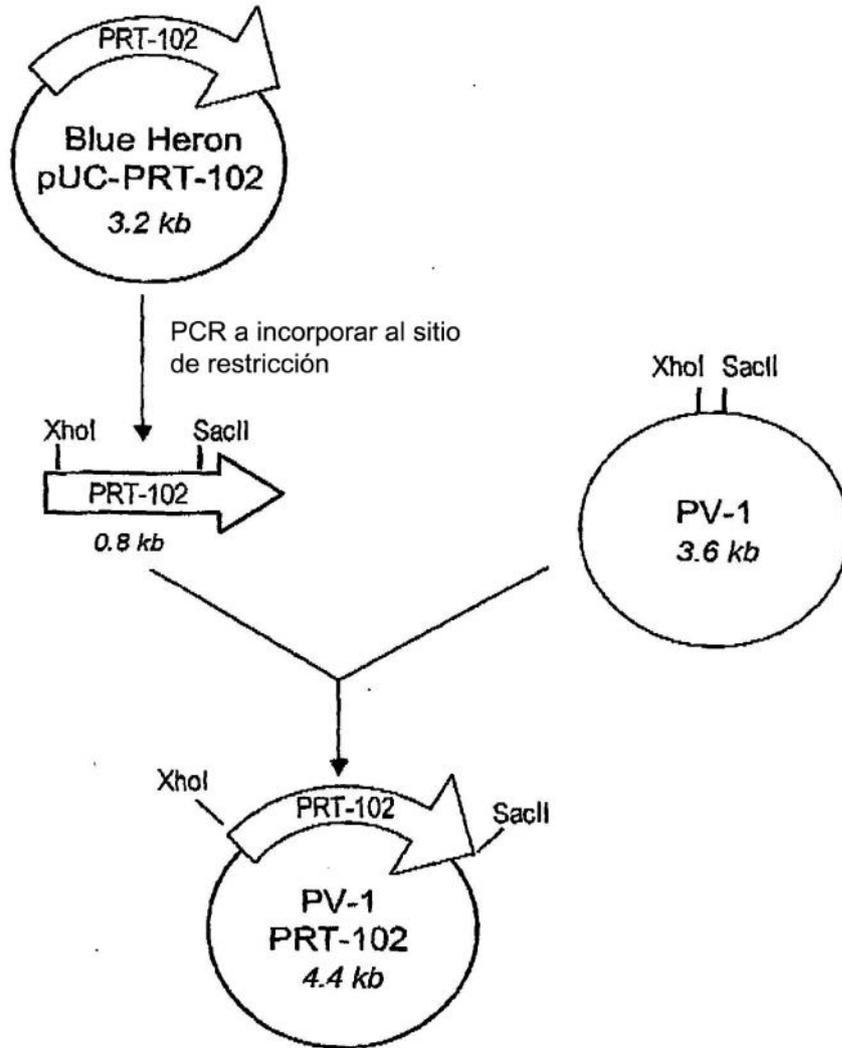


Figura 16

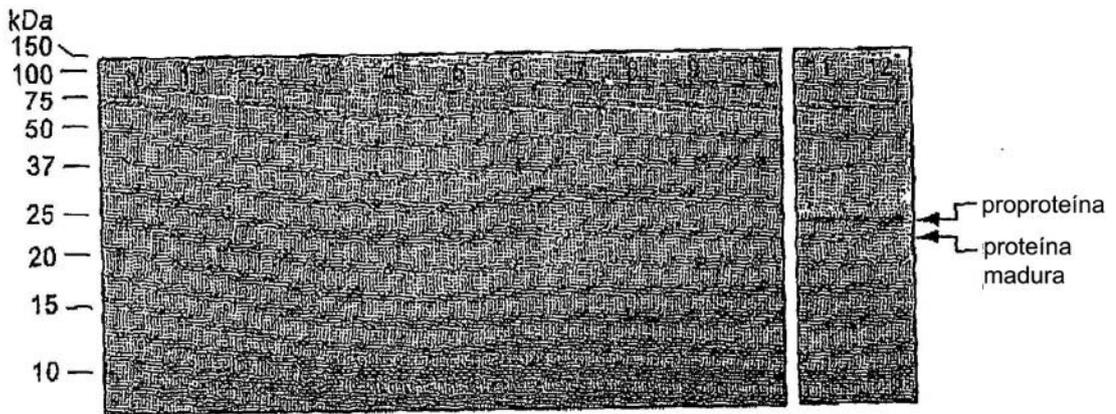


Figura 17

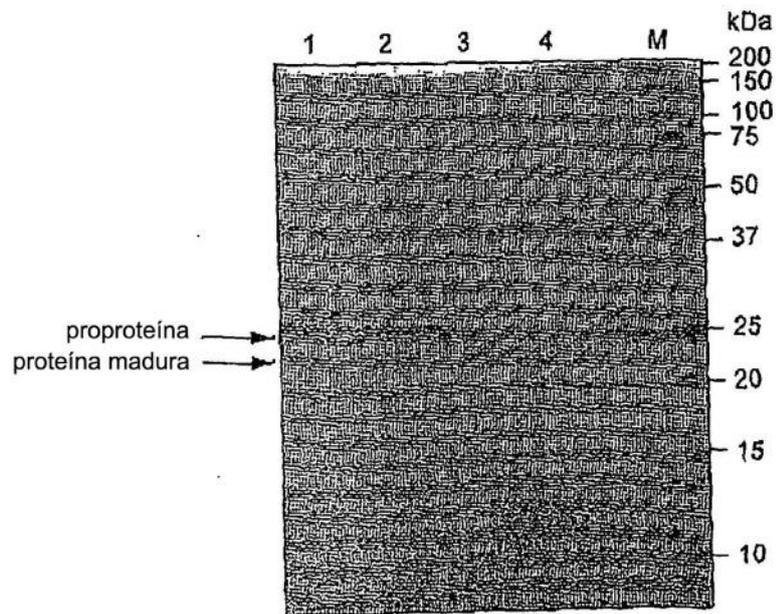


Figura 18

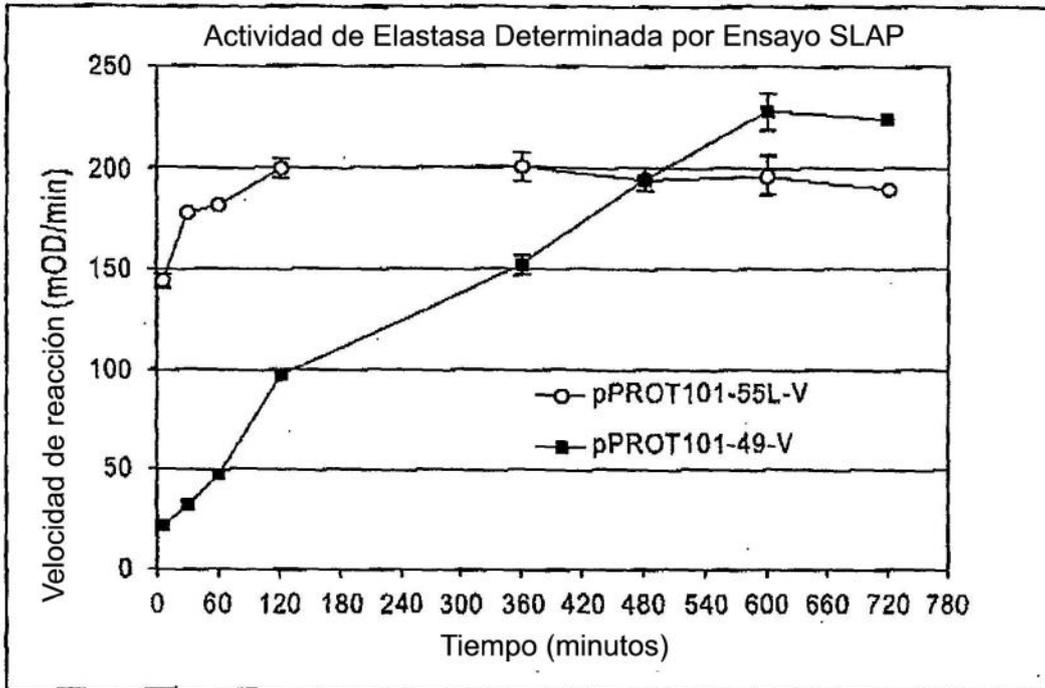


Figura 19

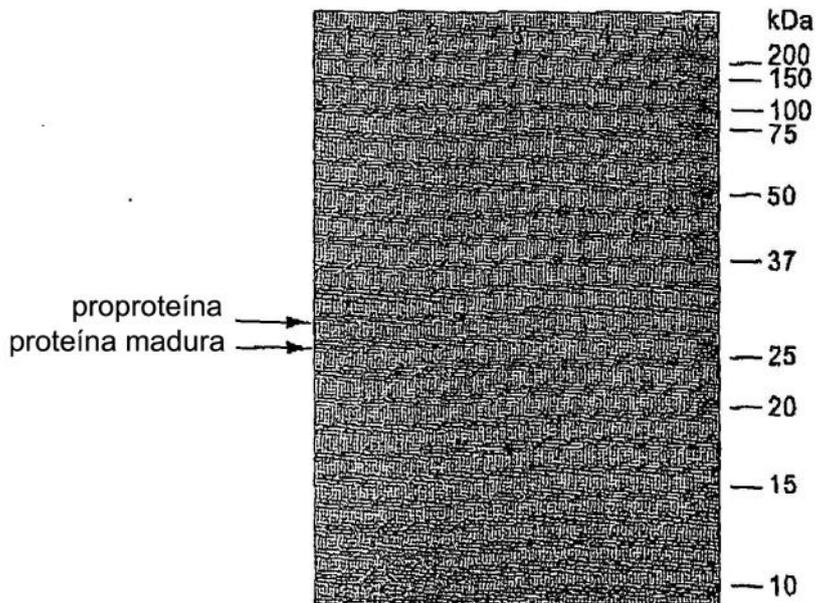


Figura 20

TrypZean Estándar ng/mL	OD/min	Coefficiente de Regresión	TrypZean Calculado ng/mL	% Esperado
0	0.0216	0.75	1.3	
1.56	0.0606	0.94	2.7	175
3.13	0.0871	0.98	3.7	118
6.26	0.1624	0.98	6.5	104
12.5	0.2891	1.00	11.2	90
25	0.6211	1.00	23.5	94
50	1.3219	1.00	49.4	99
100	2.7521	1.00	102.4	102

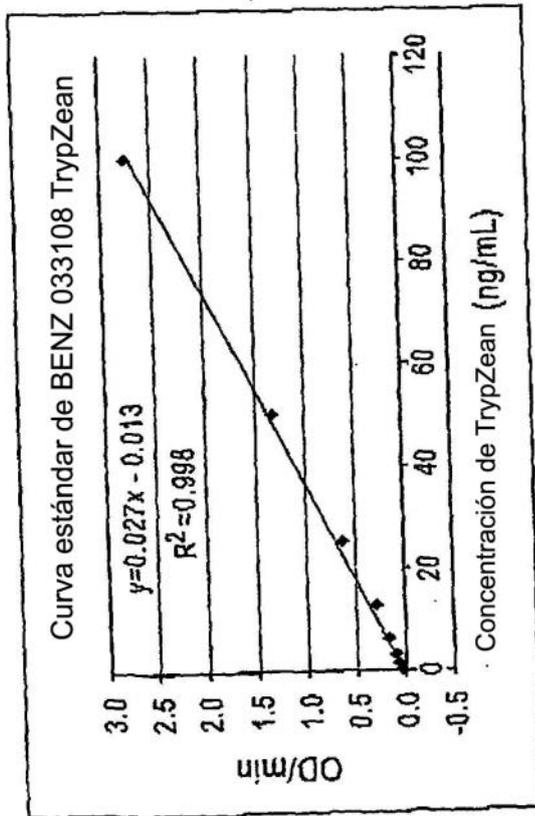


Figura 21

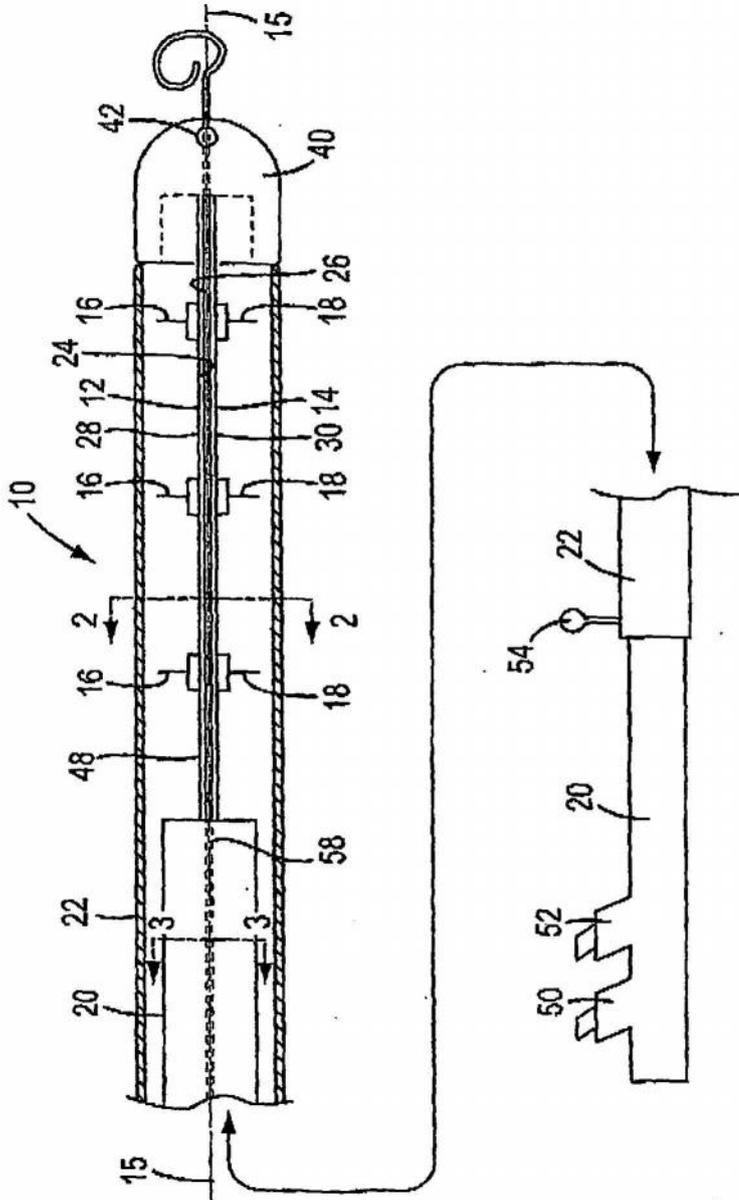


Figura 22

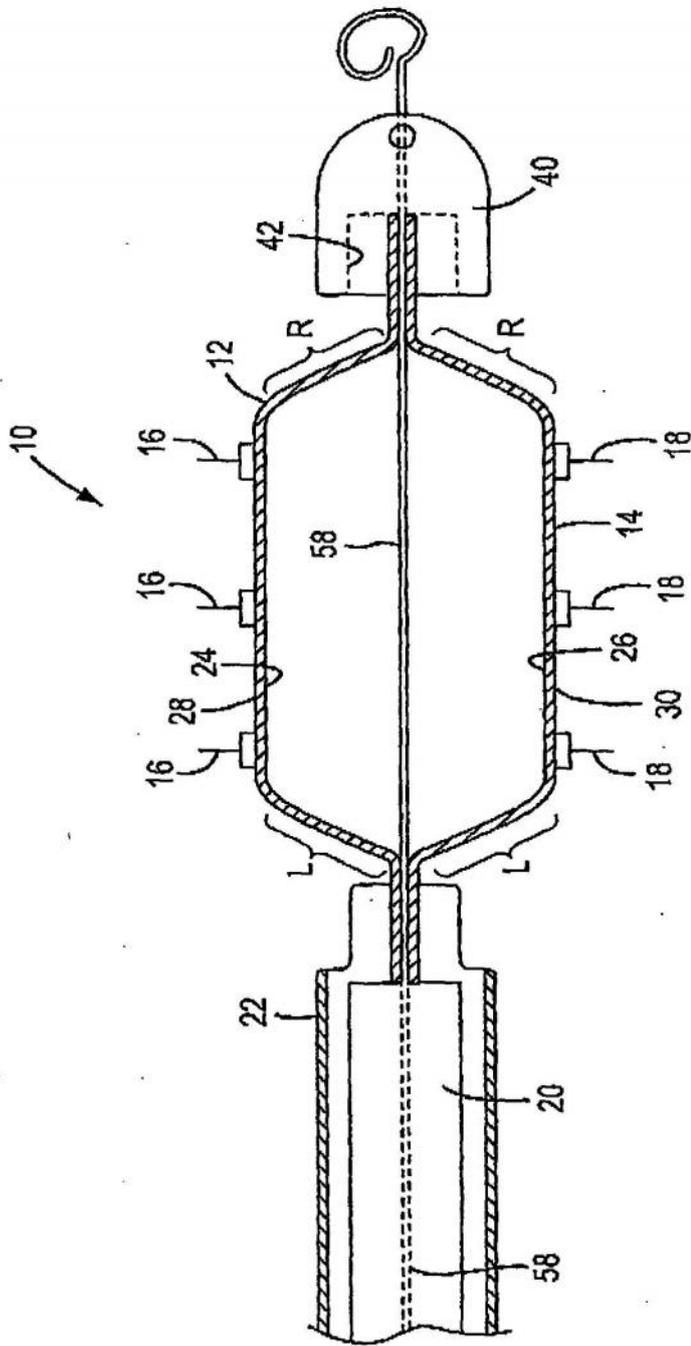


Figura 23

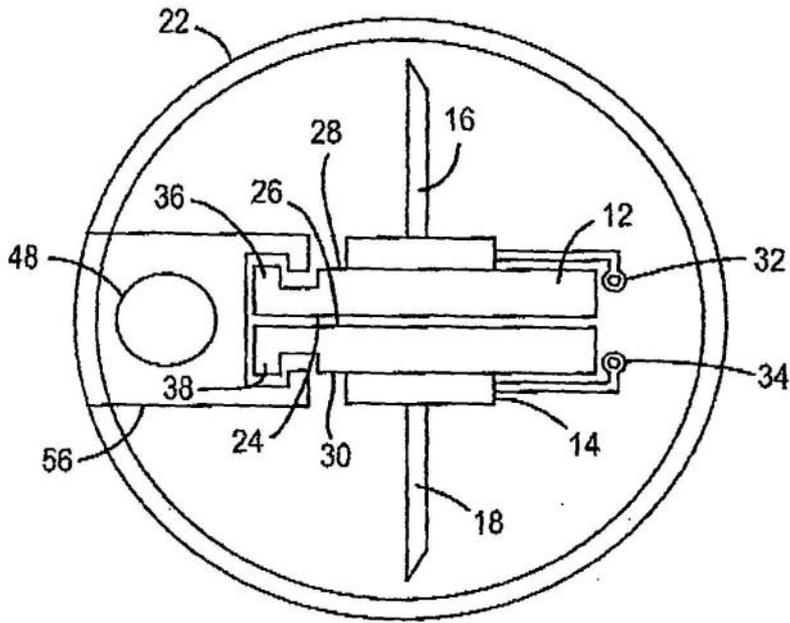


Figura 24

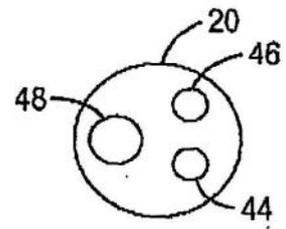


Figura 25

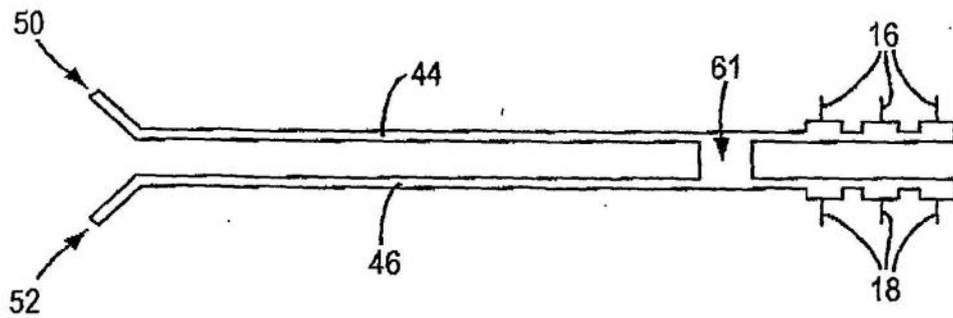


Figura 26

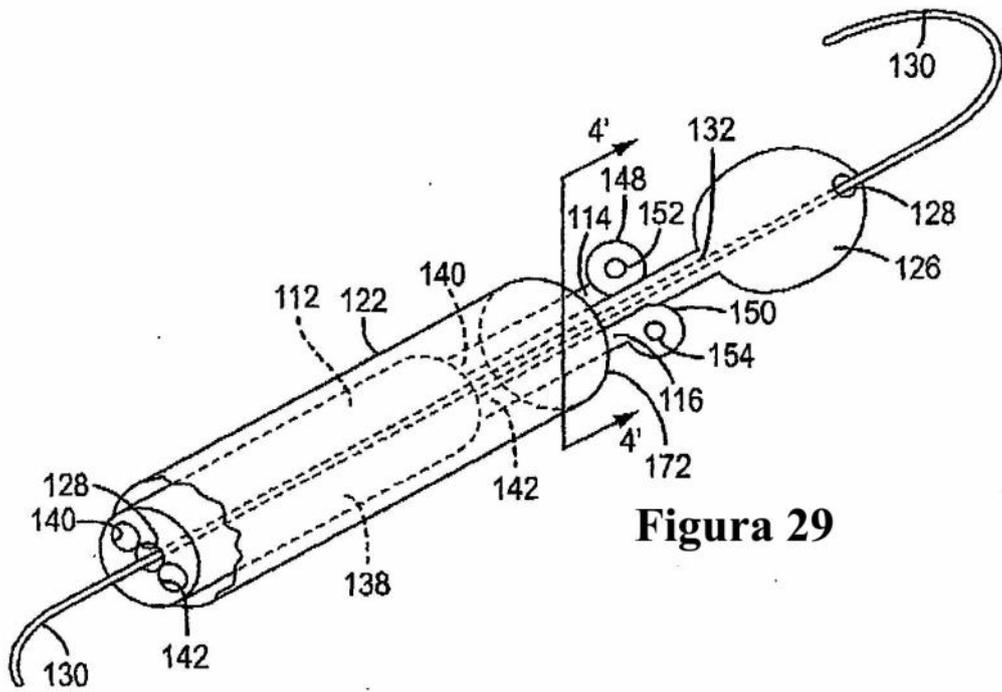


Figura 29

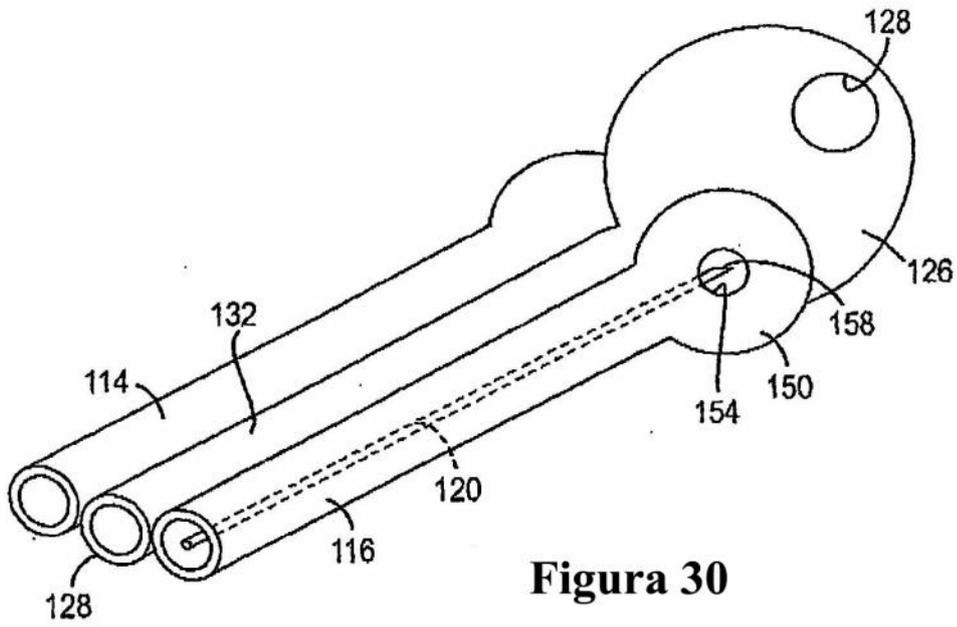


Figura 30

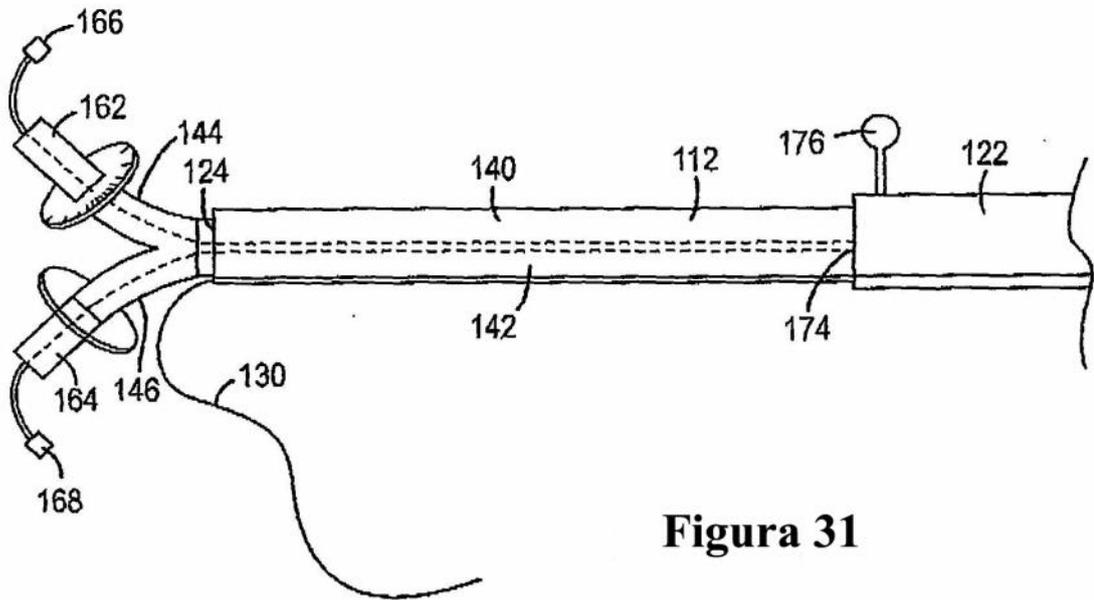


Figura 31

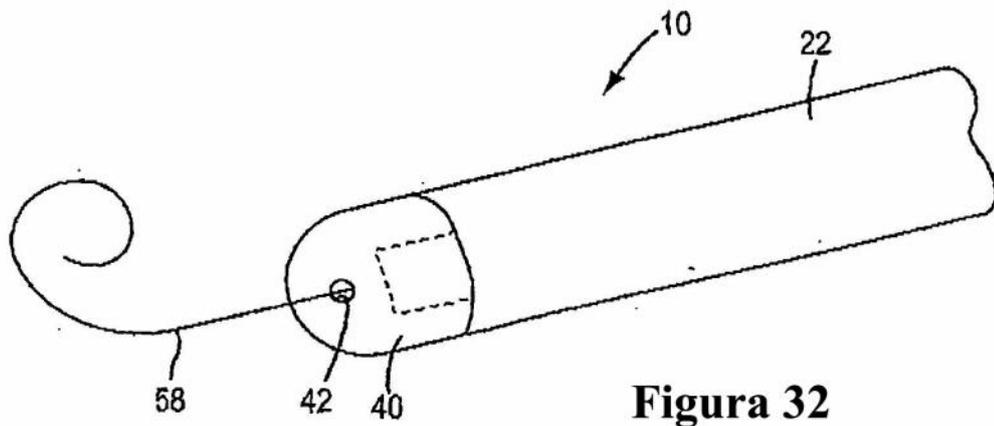


Figura 32