SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-111097- -00010-0000
Fecha: 2013-06-26 15:35:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 457

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-151939- -00000-0000
Fecha: 2013-06-26 15:35:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 457

Industria y

SUPERINTE

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN DIVISIONAL EXPEDIENTE 10-111.097

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TITULO:** **CONTROL TEMPORAL IN VIVO DE ENZIMAS ACTIVABLES QUE DEGRADAN MATRIZ**

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K 38/48

71. SOLICITANTE: HALOZYME, INC.

DOMICILIO: California, Estados Unidos de América

74. APODERADA SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-111097- -00010-0000

Fecha: 2013-06-26 15:35:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 457

DIVISIONAL EXP.10 111 097

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5

No. 13-151939- -00000-0000

Fecha: 2013-06-26 15:35:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 457

DIRECCIÓN DE NUEV
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y F

1. Identificación del Tramite

☐ **Conversión** ☒ **División** ☐ **Fusión**

☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídic ☒

HALOZYME, INC.
Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número_____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	11388 Sorrento Valley Road San Diego,	California 92121

☐ **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ . **C.C. 22.468.787** **147463 CSJ**
Apellidos y Nombre **Documento de identificación** **Tarjeta profesional**

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia		Bogotá D.C.
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
notificaciones@clarkemodet.com.co	6350824	6181088

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

P-3833

000001

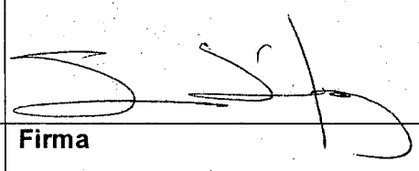
4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente_____ De: _____ A: _____	Expediente De: _____ A: _____	Expediente_____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No. **Fecha**

6. Anexos

- ☐ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
- ☐ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ	
Nombre y apellidos	**Firma**
C.C. 22.468.787	**Tarjeta Profesional T.P. 147463 CSJ**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	**TIPO DE SOLICITUD**	☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo I Capitulo II
2	**DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)**	
	Solicitud Internacional No.	**PCT/US2009/001486** **Fecha** **06 Marzo de 2009**
	Publicación Internacional No.	**WO 2009/111083 A1** **Fecha** **11 de Septiembre de 2009**
3	**TÍTULO DE LA INVENCIÓN** (200 caracteres o espacios máximos)	
	CONTROL TEMPORAL IN VIVO DE ENZIMAS ACTIVABLES QUE DEGRADAN MATRIZ	
4	**CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A61K 38/48**	
5	**SOLICITANTE (S)** ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria	

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
HALOZYME, INC.			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN: **11388 Sorrento Valley Road San Diego,** No. TELÉFONO:

CIUDAD: **California 92121,** CORREO ELECTRONICO:

PAÍS DE RESIDENCIA: **Estados Unidos de América** LUGAR DE CONSTITUCIÓN: **Estados Unidos de América**

7 INVENTOR (ES)

APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.KELLER,	**Gilbert, A.**	**Estadounidense**
2.FROST,	**Gregory, I.**	**Estadounidense**

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

DIRECCIÓN	CIUDAD	ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
1. 2523 Carmelita Avenue,	**Belmont,**	**California 94002,**	**Estados Unidos de América**
2. 13662 Mercado Drive,	**Del Mar,**	**California 92014,**	**Estados Unidos de América**

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 ☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LÓPEZ DÍAZ	**SILVANA MARIA**	**C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ**

DIRECCIÓN **Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6** No. TELÉFONO **6181088**

CIUDAD **Bogotá, D.C.** CORREO ELECTRÓNICO **notificaciones@clarkemodet.com.co.**

PAÍS **Colombia**

10 DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☐ SI ☐ NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA AAA/MM/DD
1.Estados Unidos de América	**US**	**61/068,667**	**2008/03/06**
2.Estados Unidos de América	**US**	**61/127,725**	**2008/05/14**

000002

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los paises miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13	REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas	☐
Universidades públicas o privadas	☐
Entidades sin ánimo de lucro	☐

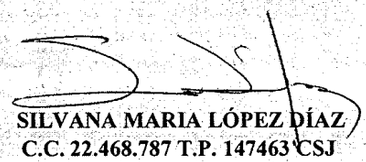
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-054099// 13-059534	Fecha 05/06/2013 18/06/2013

16	FIRMA DEL APODERADO :



SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ
C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ

17	ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios 442
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 33
3. ☐ Dibujos y/o figuras — N° folios:
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☐ Poderes, si fuera el caso.
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medinas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

CONTROL TEMPORAL IN VIVO DE ENZIMAS ACTIVABLES QUE DEGRADAN MATRIZ

SOLICITUDES RELACIONADAS

Se reivindica el beneficio de prioridad para la Solicitud Provisional de E.U.A No. de Serie 61/068,667, para Gilbert Keller and Gregory Frost, titulada "In Vivo Temporal Control of Activatable Matrix-Degrading Enzymes," presentada el 6 de marzo de 2008, y a la Solicitud Provisional de E.U.A No. de Serie 61/127,725, para Gilbert Keller and Gregory Frost, titulada "In Vivo Temporal Control of Activatable Matrix-Degrading Enzymes," presentada el 14 de mayo de 2008. Donde se permite, la materia objeto de las solicitudes arriba notadas se incorporan para referencia en su totalidad.

Esta solicitud también se refiere a la Solicitud de Patente E.U.A. No. de Serie (Doc. del Apoderado No. 119374-00082/3056); titulada "In Vivo Temporal Control of Activatable Matrix-Degrading Enzymes," que reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de E.U.A No. de Serie 61/068,667 y a la Solicitud Provisional de E.U.A No. de Serie 61/127,725.

Esta solicitud también se refiere a la Solicitud de Patente E.U.A. No. de Serie (Doc. del Apoderado No. 119374-00103/p3077), titulada "Temperature Sensitive Mutants of Matrix Metalloproteases and Uses Thereof."

Donde se permite, la materia objeto de las solicitudes arriba notadas se incorporan para referencia en su totalidad.

Incorporación para referencia del Listado de Secuencias Proporcionado en discos compactos.

Se presenta una versión electrónica en disco compacto (CD-R) del Listado de Secuencias con esta en cuatro copias (etiquetadas COPIA 1, COPIA 2, COPIA 3, y CRF), los contenidos de las cuales se incorpora para referencia en su totalidad. El archivo legible en computadora en cada uno de los discos compactos arriba mencionados, creados el 6 de marzo de 2009, es idéntico, 1.96 megabytes de tamaño, y titulado 3056SEQ.PC1.txt.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan métodos y combinaciones para controlar la duración de la acción, en vivo, de las enzimas que degradan matriz. Los métodos y combinaciones permiten temporalmente la activación in vivo de enzimas que degradan matriz con la administración de la matriz extracelular (o "ECM"). Las enzimas que degradan matriz que tengan una duración de acción controlada se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades mediadas por ECM o trastornos caracterizados por el depósito o acumulación en aumento de uno o más componentes de ECM.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La matriz extracelular (ECM) ofrece un apoyo crítico estructural para las células y tejidos. Los defectos o cambios en la matriz extracelular como resultado de un depósito excesivo o acumulación de componentes de la MEC, pueden llevar a enfermedades o afecciones mediadas por ECM. Entre ellas se encuentran enfermedades o afecciones mediadas por colágeno que se caracterizan por la presencia de septos fibrosos abundantes de colágeno. A menudo, el único tratamiento aprobado para

00899904

dichas enfermedades o afecciones es la cirugía, que puede ser altamente invasiva. Otros tratamientos, tales como la aponeurotomía de agujas para el tratamiento del síndrome de Dupuytren (también llamado contractura de Dupuytren) o la liposucción para la celulitis, también son altamente invasivos.

La colagenasa, una enzima que se activa a un pH neutro que degrada el colágeno, se ha utilizado para tratar enfermedades mediadas por ECM tales como celulitis (véase, por ejemplo, solicitud publicada de E.U.A. número de serie US20070224184), síndrome de Dupuytren (véase, por ejemplo patente de E.U.A. No. USRE39941; 5589171; 6086872), y la enfermedad de Peyronie (véase, por ejemplo, patente de E.U.A. 6,022,539). La colagenasa, sin embargo, es capaz de escindir irreversible colágenos de tipo I, II y III. La actividad prolongada de la colagenasa limita las dosis que se pueden administrar y también los riesgos de efectos secundarios asociados con la activación prolongada. Por lo tanto, hay una necesidad de tratamientos alternativos de las enfermedades y afecciones mediadas por ECM. Por lo tanto, es uno de los objetos aquí proporcionar los métodos y combinaciones de Enzimas activables que degradan matriz para el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por ECM.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan métodos para tratar enfermedades o afecciones de la matriz extracelular (ECM) mediante la administración de una Enzima activable que degrada la matriz (AMDE por sus siglas en inglés) y un activador. En general, se

administra una cantidad terapéuticamente efectiva de la AMDE. La cantidad es una función de la enfermedad o condición tratada y puede ser determinada empíricamente. La AMDE que se selecciona es la que está inactiva en el en el lugar in vivo de la administración, tal como la ECM. Las AMDEs incluyen enzimas que degradan matriz (MD), de origen natural, las especies y alélicas y otras variantes de la misma, tal como las enzimas modificadas para alterar una actividad, como la especificidad de sustrato o la propiedad, tales como la estabilidad. Las AMDEs pueden ser modificadas por los procesos y métodos para tener propiedades, tales como mayor especificidad para escindir un tipo particular de colágeno o de tener una curva alterada de pH o el óptimo para los métodos en la presente. La administración en conjunto con un activador o una combinación de activadores, no presentes en el lugar de la administración los resulta de en un AMDE que está activo durante un periodo limitado de tiempo, ya que el activador se disipa o es removido de otra manera del lugar. El AMDE y activador se pueden administrar de forma secuencial, de forma simultánea en la misma composición o separados, o de forma intermitente. Las condiciones pueden ser seleccionadas para que el periodo de tiempo de actividad esté predeterminado. Una AMDE puede requerir más de un activador de la actividad o la actividad completa. El AMDE puede ser administrado como un zimógeno, como un polipéptido maduro de longitud completa, como una sola cadena o de dos cadenas de polipéptidos, o como polipéptido precursor. La AMDE se puede proporcionar en una composición, como una solución o suspensión, o en forma cristalizada o

liofilizada. Las AMDEs ejemplares incluyen, pero no se limitan a, catepsinas, calpainas y heparanasas.

Generalmente, se administra la AMDE sub-epidermis. Cuando se administró a otros lugares, incluyendo por vía tópica, la AMDE se escoge de manera que la AMDE es sustancialmente activa (por lo general al menos alrededor de o 10%, 11%, 12%, 13% o 15% de la actividad en comparación con el pH en su máximo sigue siendo) a pH 5.5. Además, para dicha administración, el AMDE normalmente está inactivo (menos de alrededor de o 10%, 11%, 12%, 13% o 15% de la actividad sigue siendo) a un pH neutro. Las enfermedades y afecciones de la MEC, incluyen, por ejemplo, las enfermedades y afecciones mediadas por colágeno. Estas enfermedades y afecciones incluyen, pero no se limitan a: la celulitis, enfermedad de Dupuytren, adherencias quirúrgicas, queloides, cicatrices hipertróficas y cicatrices deprimidas, enfermedad de Peyronie; fibrosis Ledderhose; rigidez en las articulaciones, incluyendo un hombro congelado, cicatrices existentes, incluyendo las adherencias quirúrgicas, queloides, cicatrices hipertróficas y cicatrices deprimidas; esclerodermia; linfoedema y la colitis colágena. La administración sub-epidérmica incluye, pero no se limita a la administración subcutánea, intramuscular, la administración intralesional y la administración intradérmica.

Por lo tanto, se proporcionan métodos para el tratamiento de una enfermedad o afección de la matriz extracelular (ECM) por la administración en la sub-epidermis a la ECM de una Enzima activable que degrada la matriz (AMDE) y un activador. La AMDE está inactiva o parcialmente inactiva en la ECM en

ausencia del activador, el activador, cuando se administra a la MEC, proporciona una condición de activación de la enzima por la cual la AMDE está activa, y la condición de activación generalmente no está presente en la ECM antes de la administración del activador. En algunas modalidades se selecciona la AMDE para ser una enzima que es sustancialmente inactiva a pH neutro.

También se proporcionan métodos de tratamiento de una enfermedad o afección de la matriz extracelular (ECM) mediante la administración de una enzima activable que degradan matriz (AMDE) y un activador, en donde la AMDE está inactiva a pH neutro, el activador proporciona una condición de activación a un pH ácido para la enzima de manera que el AMDE está activo en o después de la administración, y la condición de activación no está presente en el lugar de la administración antes de la administración del activador, y la AMDE es sustancialmente activa a un pH de 5.5. La AMDE y activador pueden ser administrados por cualquier vía adecuada, incluyendo pero no limitado a, la administración subcutánea, intramuscular, intralesional, intradérmica, tópica, transdérmica, intravenosa, oral y rectal. Por ejemplo, la administración puede ser la administración sub-epidérmica.

También se proporcionan métodos para el tratamiento de una enfermedad o afección de la matriz extracelular (ECM) mediante la administración de una enzima activable que degradan matriz (AMDE) y un activador, donde la AMDE está inactiva en la ECM en ausencia del activador de tal manera que el activador, cuando se administra, establece una condición de activación de la

enzima de manera que la AMDE está activa, la condición de activación no está presente en la ECM antes de la administración del activador, y el activador está seleccionado entre un ion metálico, la temperatura y fuerza iónica de excipiente, o un agente oxidante o reductor. La AMDE y activador o una combinación de activadores pueden ser administrados por cualquier vía adecuada, incluyendo pero no limitado a, la administración subcutánea, intramuscular, intralesional, intradérmica, tópica, transdérmica, intravenosa, oral y rectal. Por ejemplo, la administración puede ser la administración sub-epidérmica.

En una modalidad ejemplar, se proporcionan los métodos para el tratamiento de una enfermedad o afección de la matriz extracelular (ECM) mediante la administración a la ECM por una Enzima activable que degrada la matriz (AMDE) y un activador, donde la AMDE está inactiva en la ECM en ausencia del activador de tal manera que el activador, cuando se administra a la ECM, proporciona una condición de activación de la enzima de manera que la AMDE está activa, la condición de activación no está presente en la ECM antes de la administración del activador, y el activador se selecciona entre los iones metálicos, la temperatura y fuerza iónica. La AMDE y activador pueden ser administrados por cualquier vía adecuada, incluyendo, pero no se limitan a, administración subcutánea, intramuscular, intralesional, intradérmica, tópica, transdérmica, intravenosa, oral y rectal. Por ejemplo, la administración puede ser la administración sub-epidérmica.

00000009

En otras modalidades ejemplares se proporcionan métodos para el tratamiento de una enfermedad o afección del colágeno mediada por la administración a la sub-epidermis a la ECM de una cantidad terapéuticamente efectiva de un catepsina L activable y un activador, donde la catepsina L activable está inactiva en la ECM en ausencia del activador, el activador, cuando se administra a la ECM, proporciona una condición de activación de la enzima de manera que la catepsina L activable es activa, la condición de activación no está presente en la ECM antes de la administración del activador, y la condición de activación es pH ácido. Los polipéptidos de la catepsina L ejemplar son aquellos que incluyen una secuencia de aminoácidos establecidos en la SEQ ID NO: 1 o alelos, especie o su otra variante, donde dichas variantes se modifican para tener propiedades alteradas o actividades y, por lo general tienen al menos o tienen 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NO: 1.

En general con el tiempo en los métodos de la presente, el activador será eliminado o disipado o neutralizado por el medio ambiente local para que la AMDE ya no esté activa. Las condiciones de activación y/o activadores pueden ser seleccionados o preparados de manera que la AMDE esté activa durante un tiempo predeterminado o limitado. El activador se puede proporcionar, o se administra en la misma composición que la AMDE o en una composición separada, y pueden ser administrados de forma secuencial, a la vez o de forma

00000910

intermitente. Por ejemplo, la AMDE se expone al activador antes de la administración o en la administración, por lo que la enzima se activa en la administración. Las condiciones de activación incluyen, pero no están limitadas a, pH, fuerza iónica, temperatura y los iones metálicos. Entre las condiciones de activación está el pH, tales como el pH ácido, por ejemplo, en o alrededor de un rango de 3 a 6.5, o 3.5 a 6, o 3 a 5.5, o 3 a 4.5, o 4 a 6, o 4 a 5.5, o 4.5 a 5 o 5 a 6, tal como 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 o 6.5. Los pH se pueden obtener poniéndose en contacto con la AMDE con una solución amortiguadora al pH deseado. Las soluciones amortiguadoras pueden incluir aquellas que contienen un ácido seleccionado de entre ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES), ácido acético, ácido cítrico, maleato, succinato, lactato, glicinato, fosfato cítrico y la histidina. Otras condiciones de actividad ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los iones metálicos y la temperatura. Por ejemplo, la condición de activación puede ser un ion metálico, como el Ca^{2+}, Zn^{2+} o Mg^{2+}. La temperatura puede ser baja o alta temperatura, donde la enzima es sustancialmente inactiva a la temperatura del lugar de la administración, por lo general 37°C. Por lo tanto, la condición de la activación es la temperatura y la temperatura es o está alrededor de 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C o por encima de 37°C, tales como 40°C, 41°C, 42°0C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C y superiores hasta cualquier temperatura tolerada que no dañe los tejidos o células in vivo.

El control temporal de la actividad se puede lograr, por ejemplo, mediante la selección de la capacidad amortiguadora y/o la fuerza iónica de la misma. Un tiempo predeterminado para la actividad puede llevarse a cabo mediante la selección de tales condiciones, lo cual puede determinarse empíricamente o por cualquier método conocido por aquellos con conocimientos en la materia. Los tiempos predeterminados pueden variar desde menos de un minuto o hasta horas, tales como alrededor de 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas.

Como se ha señalado una AMDE puede ser cualquier enzima degradante de matriz que es activable o que sea modificada para que sea activable por un activador o condición de activación. Entre las AMDES para su uso en los métodos de este documento están las enzimas lisosomales. Las AMDES incluyen, por ejemplo, catepsinas, tales como catepsinas que son cisteína o aspártico proteasas. Estas incluyen, por ejemplo, catepsina S, catepsina K, catepsina L, catepsina B, catepsina C, catepsina H, catepsina F, catepsina S, catepsina R, catepsina V, catepsina W, catepsina D y catepsina E. Ejemplos de tales catepsinas son cualquiera seleccionadas de una catepsina que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 57, 60, 1, 65, 180, 68, 71, 74, 77, 183, 186, 189, 80, 195, 90, 93 y 96, o una variante de alelos o de especies u otra variante de cualquiera de SEQ ID NOS: 57, 60, 1, 65, 180, 68, 71, 74, 77, 183, 186, 189, 80, 195, 90, 93 y 96. Otras

variantes incluyen, por ejemplo, las enzimas modificadas para tener una propiedad alterada, tal como la estabilidad, o una actividad, tal como la especificidad de sustrato. Las variantes pueden tener, por ejemplo, el 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% más de la secuencia de identidad con cualquiera de los polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos se establece en cualquiera de SEQ ID NOS: 57, 60, 1, 65, 180, 68, 71, 74, 77, 183, 186, 189, 80, 195, 90, 93 y 96. En los métodos de la presente, la AMDE, con la administración, puede romper cualquiera de uno o más de los componentes de la matriz extracelular (ECM). Tal división se produce por un tiempo limitado, que puede estar predeterminado. Los componentes de ECM que son divididos, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, colágenos, elastinas, fibronectinas y proteoglicanos, como un colágeno de tipo I, tipo II, tipo III o tipo IV. La AMDES pueden ser modificadas, tal como por métodos de evolución dirigida u otros métodos, para tener propiedades o actividades alteradas, tal como la especificidad de sustrato incrementada para el colágeno tipo I sobre el colágeno tipo IV.

Otros agentes pueden ser administrados con el activador y enzimas. La administración puede estar en la misma composición que el activador y/o una enzima o como composiciones independientes. La administración se puede realizar de forma simultánea, por separado o de forma intermitente. Los agentes ejemplares, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, agentes farmacológicos seleccionados de entre otros productos biológicos, compuestos de moléculas pequeñas, agentes dispersantes, anestésicos y vasoconstrictores y/o combinaciones

de ellos. Ejemplos de un agente de dispersión es una enzima que degrada hialuronano, por ejemplo, una hialuronidasa, como PH20, como una forma soluble del mismo, en particular rHuPH20. Tal hialuronidasa generalmente se administra antes de la administración de la enzima y el activador. Ejemplos de una hialuronidasa soluble es el producto designado rHuPH20, que es codificado por el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 226, o es una variante de especie de alelos u otras variantes de la misma o una variante del polipéptido de tal manera que tiene al menos un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencias a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 226.

Otros agentes son los anestésicos, como la lidocaína, y los vasoconstrictores, como los agonistas de los receptores adrenérgicos alfa, incluyendo, por ejemplo, levonordefrina, la epinefrina y la norepinefrina. Por lo general estos agentes se administran con o antes de la AMDE y activador. Por lo tanto, se proporcionan los métodos para tratar una enfermedad o afección de la matriz extracelular (ECM) por la administración en la sub-epidermis de una enzima activable que degrada la matriz (AMDE), como se describe más arriba, un activador, una hialuronidasa, lidocaína y epinefrina. La AMDE está inactiva en la ECM en ausencia del activador. La enzima, hialuronidasa, lidocaína y epinefrina se pueden administrar simultáneamente, de forma secuencial o de forma intermitente, siempre que la lidocaína se administre antes de la enzima. Por ejemplo, la hialuronidasa, lidocaína y epinefrina se administran antes de

la administración de la enzima o la hialuronidasa, lidocaína y epinefrina se administran de forma simultánea o la hialuronidasa, lidocaína y epinefrina pueden administrarse en una sola composición. La AMDE y activador y otros agentes se pueden administrar por cualquier vía adecuada, incluyendo pero no limitado a, la administración subcutánea, intramuscular, intralesional, intradérmica, tópica, transdérmica, intravenosa, oral y rectal. Por ejemplo, la administración puede ser la administración sub-epidérmica.

También se incluyen los productos, incluyendo composiciones, envases, combinaciones y kits que pueden ser utilizados para efectuar los métodos. Por ejemplo, se contemplan envases que contienen dos compartimientos. Un primer compartimento contiene una cantidad terapéuticamente efectiva de una enzima degradante de matriz activable (AMDE), donde la cantidad es de dosis única o una pluralidad de dosis y una dosis única es eficaz para el tratamiento de una enfermedad o afección de la ECM, y un segundo compartimiento contiene un activador, cuando el activador es el que activa la enzima. Las AMDEs incluyen, por ejemplo, las enzimas lisosomales, como catepsinas, calpainas y heparanasas, incluidas las descritas arriba para el uso en los métodos. Las AMDES en los envases son las que se han descrito anteriormente, incluyendo, por ejemplo, una AMDE que es sustancialmente activa a un pH de 5.5, y, opcionalmente, es sustancialmente inactiva a pH neutro. Los activadores están contemplados para las condiciones de activación como las descritas anteriormente. De ahí el segundo compartimiento puede contener una composición que efectúe un

cambio o mantenga un pH, como una solución amortiguadora, o la fuerza iónica o preste un ion metálico, como el Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}. Las soluciones amortiguadoras ejemplares incluyen aquellas que contienen ácidos de entre ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES), ácido acético, ácido cítrico, maleato, succinato, lactato, glicinato, fosfato cítrico y la histidina. Las enfermedades y afecciones, son los descritos anteriormente. Los envases también pueden incluir un compartimiento de mezcla para efectuar la mezcla de los componentes en el primero y segundo compartimientos. Los envases ejemplares, incluye tubos y botellas, contenidos estériles, como una jeringa, con o sin aguja para la inyección.

La AMDE y activador se proporcionan en una cantidad de dosis múltiples de administración o de una sola. La AMDE en el envase se puede proporcionar en una cantidad que es o está alrededor de unos 10 µg a 100 mg, 50 µg a 75 mg, 100 µg a 50 mg, 250 µg a 25 mg, 500 µg a 10 mg, 1 mg a 5 mg o 2 mg a 4 mg. Puede ser proporcionado como un sólido, tal como en forma cristalizada o en forma liofilizada, o en forma líquida, como solución o suspensión, un gel o de otra forma adecuada. El volumen total de líquido en el envase, por ejemplo, puede ser o es alrededor de 1-100 ml, 1-50 ml, 10-50 ml, 10-30 ml, 1-20 ml y 1-10 ml.

En una modalidad ejemplar se proporcionan envases que tienen al menos dos compartimientos, donde un primer compartimento contiene una cantidad terapéuticamente efectiva de un catepsina activable por L y la cantidad es efectiva para el tratamiento de una enfermedad o afección de la matriz

extracelular (ECM), y un segundo compartimiento contiene una solución amortiguadora ácida que es el que activa catepsina L. Las enfermedades y afecciones son los descritos anteriormente para el método de tratamiento. El activador puede ser el pH que es proporcionado por una solución amortiguadora, particularmente una solución amortiguadora ácida tiene un rango que es, o es alrededor de pH 4.0-5.0, en particular 4.5 a 6, más concretamente, 4.0, 4.5, 5, 5.5 ó 6. Ejemplar topes se encuentran entre topes ácidos que contienen un ácido, como por ejemplo, ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES), ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, ácido láctico, ácido málico, ácido clorhídrico-glicina, fosfato cítrico e histidina. Los polipéptidos de catepsina L ejemplares son aquellos que incluyen una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1 o alelos, especie u otra variante de los mismos, donde dichas variantes se modifican para tener propiedades alteradas o actividades y, por lo general tienen al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de aminoácidos establecidos en cualquiera de SEQ ID NO: 1. La catepsina L activable se puede proporcionar como polvo liofilizado, en particular de una forma activada madura que es de forma de dos cadenas o formato de una sola cadena. La cantidad de catepsina L activable en el envase es terapéuticamente eficaz para la enfermedad o afección en particular, y puede variar, por ejemplo, desde alrededor de o: 10 µg a 100 mg, 50 µg a 75 mg, 100 µg a 50 mg, 250 µg a 25 mg, 500 µg a 10 mg, 1 mg a 5 mg y 2 mg a 4 mg. La cantidad puede

depender de la enfermedad o afección, y si es necesario, puede ser empíricamente determinada. La catepsina L se puede proporcionar como un sólido, como un polvo liofilizado, una pasta o líquido, tal como una suspensión, dispersión o solución. El volumen del envase es adecuado para la cantidad de catepsina L y la ruta prevista y/o lugar de administración. Por ejemplo, un volumen típico en el envase está o es alrededor de 1-100 ml, 1-50 ml, 10 a 50 ml, 10-30 ml, 1-20 ml, o 1-10 ml.

También se incluyen las combinaciones que incluyen el(los) depósito(s) anteriormente mencionado(s) y uno o más envases adicionales con otro agente farmacológicamente eficaz. Estos agentes pueden ser seleccionados de entre los productos biológicos, compuestos de pequeñas moléculas, agentes dispersantes, anestésicos y vasoconstrictores y sus combinaciones. Estos agentes incluyen a los agentes y las cantidades como se describió anteriormente con referencia a los métodos. Por ejemplo, un envase adicional puede contener una hialuronidasa, como rHuPH20. La cantidad puede ser por ejemplo de alrededor/o: 10 unidades a 500,000 unidades, 100 unidades a 100,000 unidades, 500 unidades a 50,000 unidades, 1000 unidades a 10,000 unidades, 5000 unidades a 7500 unidades, 5000 unidades a 50,000 unidades, o 1,000 unidades a 10,000 unidades. Otros envases pueden contener anestésicos, como la lidocaína, en una cantidad, por ejemplo, de igual o alrededor de 10 mg a 1000 mg, 100 mg a 500 mg, 200 mg a 400 mg, 20 mg a 60 mg o 30 mg a 50 mg, y/o un vasoconstrictor, tal como un agonista de los receptores adrenérgicos alfa, incluyendo levonordefrina, la adrenalina o la noradrenalina, en una cantidad para efectuar la

000014

vasoconstricción en el lugar y la región de la administración. La cantidad, por ejemplo, puede estar en o alrededor de 10 µg a 5 mg, 50 µg a 1 mg, 50 µg a 500 µg, 50 µg a 250 µg, 100 µg a 500 µg, 200 µg a 400 µg, 1 mg a 5 mg o 2 mg a 4 mg de, por ejemplo, la epinefrina u otros vasoconstrictores. Cada uno de los agentes adicionales con eficacia farmacológica puede ser mezclado en cualquier combinación en un envase o pueden ser provistos en envases individuales. Ellos pueden suministrarse como líquidos o sólidos como se demuestra y describe anteriormente para catepsina L.

En modalidades ejemplares, las combinaciones, pueden contener la AMDE y activador, y el envase puede contener al menos dos agentes farmacológicamente efectivos, donde los agentes farmacológicos se proporcionan como composiciones por separado, separadas unas de otras o se proporcionan en el mismo envase en la misma composición. Por ejemplo, el envase adicional puede contener uno o más de una hialuronidasa, lidocaína y epinefrina. El envase adicional puede ser en forma de una jeringa con o sin aguja. El volumen total del envase adicional (s) es o está alrededor de 1-100 ml, 1-50 ml, 10-50 ml, 10-30 ml, 1-20 ml, o 1-10 ml.

En modalidades ejemplares, la combinación incluye catepsina L y la hialuronidasa, tal como rHuPH20. Puede ser proporcionada como diferentes composiciones o están en una sola composición en un envase. La combinación puede incluir una solución amortiguadora de ácido que activa a la catepsina L. La solución amortiguadora se puede proporcionar en un envase separado o en combinación con uno o ambos de catepsina L y

hialuronidasa. También se incluyen composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad de catepsina L eficaz para el tratamiento de una enfermedad o afección mediada por ECM con la administración simultánea o secuencialmente con una solución amortiguadora ácida, donde se formula la composición para la administración de dosis única, y la solución amortiguadora tiene un pH que activa la catepsina L. La cantidad de catepsina L es eficaz para la enfermedad o afección en particular y, por ejemplo, es o está alrededor de 10 µg a 100 mg, 50 µg a 75 mg, 100 µg a 50 mg, 250 µg a 25 mg, 500 µg a 10 mg, 1 mg a 5 mg o 2 mg a 4 mg. La composición puede además contener uno o más de la lidocaína, epinefrina y una hialuronidasa.

Los envases y/o combinaciones y composiciones pueden ser envasados en forma de kits. Los kits contienen los envases y/o combinaciones y, opcionalmente, reactivos adicionales para su uso en las formas previstas en la presente, dispositivos para administración, tales como frascos, tubos, jeringas y agujas, aquí proporcionados y/o las instrucciones para dicho uso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: La Figura 1 es una adaptación de las MMP zimógenas, indicando el propéptido, el dominio catalítico, región de unión, los dominios hemopexina 1 -4, las repeticiones de fibronectina tipo II, la región de base, el interruptor de cisteína, los sitios de enlace del calcio (Ca) I y II, y el sitio de unión del zinc. La alineación incluye MMPs zimógenas, incluida la MMP-I (SEQ ID NO:327), MMP-8 (aminoácidos 21-467 de la SEQ ID NO:101), MMP-13 (aminoácidos 20-471 de la SEQ ID

NO:104), MMP-18 (aminoácidos 18-467 de la SEQ ID NO:107), MMP-2 (aminoácidos 30-660 de la SEQ ID NO:110), MMP-9 (aminoácidos 20-707 de la SEQ ID NO:113), MMP-3 (aminoácidos 18-477 de SEQ ID NO:116), MMP-10 (aminoácidos 18-476 de la SEQ ID NO:119), MMP-11 (aminoácidos 32-488 de la SEQ ID NO:122), MMP-7 (aminoácidos 18-267 de la SEQ ID NO: 125), MMP-26 (aminoácidos 18-261 de la SEQ ID NO:128), MMP-12 (aminoácidos 17-470 de la SEQ ID NO: 131), y la MMP-19 (aminoácidos 19-508 de la SEQ ID NO: 146). Un "*" significa que los residuos o nucleótidos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en la alineación, un ":" significa que las sustituciones conservadas han sido observados, y un "." significa que las sustituciones semi-conservadas se observan.

Figura 2: La Figura 2 es una alineación de los dominios catalíticos de las MMP ejemplares, lo que indica residuos de aminoácidos conservados y conservadores ejemplares. Se entiende que otros residuos de aminoácidos conservados y conservadores existen entre las MMP. Por lo tanto, esta figura y la identificación de los residuos no tiene por objeto limitar los residuos correspondientes entre y dentro de las MMP. Las MMP ejemplares son: la MMP-I (aminoácidos 81-242 de la SEQ ID NO:327), MMP-8 (aminoácidos 101-242 de la SEQ ID NO:101), MMP-13 (aminoácidos 104-248 de la SEQ ID NO: 104), MMP-18 (aminoácidos 100-246 de la SEQ ID NO:107), MMP-2 (aminoácidos 110-417 de la SEQ ID NO:110), MMP-9 (aminoácidos 94-425 de la SEQ ID NO:113), MMP-3 (aminoácidos 100-247 de la SEQ ID NO: 116), MMP-10 (aminoácidos 99-246 de la SEQ ID NO: 119), MMP-11 (aminoácidos 98-228 de la SEQ ID NO:122), MMP-7 (aminoácidos

95-242 de la SEQ ID NO:125), MMP-26 (aminoácidos 90-236 de la SEQ ID NO: 128), MMP-12 (aminoácidos 106-247 de la SEQ ID NO: 131), y la MMP-19 (aminoácidos 98-239 de la SEQ ID NO:146). Sustituciones ejemplares conservadas y conservadoras se destacan.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Esquema

A. Definiciones

B. La Matriz Extracelular

1. Componentes de la ECM

a. Colágenos

b. Elastina

c. Fibronectina

d. Glicosaminoglicanos (GAGs)

i. Proteoglicanos

ii. Ácido Hialurónico

2. Histología de la piel

a. La epidermis

b. La dermis

c. La hipodermis

3. Enfermedades de la ECM

C. Enzimas que Degradan matriz

1. La activación enzimática

a. Serina proteasas

b. Cisteína proteasas

i. Catepsinas

Catepsina L

ii. Calpaína

c. Aspártico proteasas

d. Metaloproteasas

e. Heparanasa

D. Enzimas activables que degradan matriz (AMDE)

1. Condiciones de activación y métodos para la activación de enzimas activables que degradan matriz

a. Activación de Estado - pH ácido

b. Activación de Estado - Concentración de cationes metálicos

c. Activación de Estado - Agente reductor

d. Activación de Estado - Temperatura

i. Mutantes de metaloproteasas de matriz sensibles a la temperatura

1) Modificaciones ejemplares tsMMP-1

2) Las combinaciones

3) Modificaciones adicionales

4) Otras MMPs

2. Combinaciones de enzimas que degradan matriz y el Activador

E. Métodos de Producción de ácidos nucleicos que codifican enzimas que degradan matriz, y polipéptidos de las mismas

1. Vectores y células

2. Expresión

a. Células procariotas

b. Células de levadura

c. Células de insectos

d. Células mamíferas

e. Plantas

3. Técnicas de purificación

F. Preparación, Formulación y Administración de enzimas activables que degradan matriz

1. Inyectables, soluciones y emulsiones

Polvos liofilizados

2. Administración tópica

3. Composiciones para otras vías de administración

4. Terapias de combinación

a. Enzimas de degradación de hialuronano

i. Hialuronidasas

1) hialuronidasas de tipo mamífero

2) hialuronidasas bacterianas

3) hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos

ii. Otras enzimas degradantes de hialuronano.

iii. Enzimas de degradación solubles de hialuronano

1) PH20 Soluble Humano

2) rHuPH20

iv. Modificaciones de las enzimas que degradan hialuronano para mejorar sus propiedades farmacocinéticas

G. Empaques y artículos de Fabricación de enzimas de degradación Activables de Matriz

1. Aparato de una sola cámara

2. Aparatos de doble cámara

3. Kits

H. Métodos de evaluación de la actividad de las enzimas que degradan matriz

1. Métodos de evaluación de la actividad enzimática

2. Métodos de Evaluación de la Degradación de ECM

a. Ensayos in vitro

b. Ensayos in vivo

c. Modelos animales no humanos

I. Métodos ejemplares de tratamiento de enfermedades o defectos de las enfermedades o afecciones mediadas por colágeno de ECM

a. Celulitis

b. Enfermedad de Dupuytren

c. Enfermedad de Peyronie

d. Fibrosis Ledderhose

e. Articulaciones Rígidas

f. Cicatrices existentes

i. Adherencias quirúrgicas

ii. Queloides

iii. Cicatrices hipertróficas

iv. Cicatrices deprimidas

g. Esclerodermia

h. Linfedema

i. Colitis colagenosa

J. Ejemplos

A. DEFINICIONES

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por aquellas personas con conocimientos en la materia a la cual pertenece el objeto de la invención. Todas las patentes y solicitudes de

patentes, las solicitudes publicadas y las publicaciones, las secuencias de Genbank, bases de datos, sitios web y otros materiales publicados a que se refiere a lo largo de toda la descripción en este documento, a menos que se indique lo contrario, se incorporan por referencia en su totalidad. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones de términos en este documento, aquellos en esta sección prevalecerán. Cuando se haga referencia a una URL o cualquier otro identificador o dirección, se entiende que esos identificadores puede cambiar y la información particular en Internet puede ir y venir, pero la información equivalente se puede encontrar buscando en Internet. La referencia a ello evidencia la disponibilidad y la difusión pública de dicha información.

Como se utiliza aquí, la matriz extracelular (ECM) se refiere a una estructura compleja de malla que rodea y proporciona soporte estructural a las células de los tejidos y órganos especializados. La ECM se compone de proteínas estructurales, como el colágeno y la elastina, proteínas especializadas como la fibronectina y proteoglicanos. La composición bioquímica exacta varía de un tejido a otro. En la piel, por ejemplo, es la capa dérmica que contiene el ECM. Referencia al "intersticio" se utiliza aquí para referirse indistintamente a la ECM.

Tal como se utiliza en este documento, los componentes de la ECM se refieren a cualquier material producido por las células del tejido conectivo y que secretan hacia el intersticio. A efectos de este documento, las referencias a componentes de ECM se refieren a las proteínas y

glicoproteínas, y no a otros componentes celulares u otros componentes de la ECM. Los componentes ejemplares de ECM incluyen, pero no se limitan a, colágeno, fibronectina, elastina y proteoglicanos.

Como se utiliza aquí, una enzima que degrada la matriz se refiere a cualquier enzima que degrada uno o más componentes de la ECM. Las enzimas que degradan matriz incluyen la proteasa, que son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces covalentes peptídicos. Las enzimas que degradan matriz incluyen cualquiera conocida por aquellos con conocimientos en la materia, al igual que cualquiera descrita en la presente (véase, por ejemplo, Tabla 3), o variantes alélicas o especies u otras variantes de las mismas.

Como se utiliza aquí, una metaloproteasa de matriz (MMP) se refiere a un tipo de enzimas degradantes de la matriz que son endopeptidasas que dependen del zinc que contienen un sitio activo $Zn2^{+}$ necesario para la actividad. Las MMPs son enzimas que degradan los componentes de la MEC, incluyendo pero no limitado a, el colágeno, la fibronectina, elastina y proteoglicanos. Las MMPs contienen generalmente un propéptido, un dominio catalítico, una ligadura de prolina y un dominio de hemopexina (también llamado como C-terminal tipo hemopexina). Algunas MMPs contienen dominios adicionales. Las MMP ejemplares se exponen en el cuadro 5. La referencia a un MMP incluye todas las formas, por ejemplo, la forma precursora (que contiene la secuencia de señales), la forma de proenzima (que contiene el propéptido), la forma activa procesada, y las formas del mismo carecen de uno o más dominios. Por ejemplo, la referencia a una

MMP se refiere a las MMP que contiene sólo los activos de dominio catalítico. Dominios de MMP ejemplares son identificados en la Figura 1. MMP también incluyen variantes de especies u otras variantes alélicas de la misma.

Como se utiliza aquí, una enzima modificada que degradan matriz (o variantes de una enzima que degradan matriz) se refiere a una enzima que tiene una o más modificaciones en la secuencia primaria en comparación con una enzima de tipo silvestre. La una o más mutaciones pueden ser uno o varios sustitutos de aminoácidos (sustituciones), las inserciones, supresiones y cualquier combinación de éstos. Una enzima modificada que incluye los de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más posiciones modificadas. Una enzima modificada mantiene la actividad de una enzima de tipo silvestre, pero puede haber alterado la especificidad o la estabilidad del sustrato. Una enzima modificada por lo general cuenta con 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más secuencias de identidad correspondientes a una secuencia de aminoácidos de una enzima de tipo silvestre.

Como se utiliza aquí, una enzima lisosomal se refiere a las enzimas cuya función de degradación es óptima a pH ácido. En virtud de la exigencia de un pH bajo, tales enzimas en general están presentes en los lisosomas de las células. Las enzimas lisosomales incluyen, pero no se limitan a, catepsina S, K, L, B, C, H, M, O, R, V, D y E. Ejemplos de enzimas lisosomales son las formas precursoras establecidas en cualquiera de SEQ ID NOS: 56, 59, 62, 64, 179, 67, 70, 73, 76,

182, 185, 188, 79, 194, 89, 92 y 95 y las formas maduras establecidas en la SEQ ID NOS: 57, 60, 1, 65, 180, 68, 71, 74, 77, 183, 186, 189, 80, 195, 90, 93 y 96 o variantes alélicas o variantes de las especies u otras variantes de la misma. Otras enzimas lisosomales incluyen, pero no se limitan a, la lipasa ácida lisosomal, lipasa gástrica, fosfolipasa y lipasa lisosomal activada por sales biliares (secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos, incluyendo formas maduras del mismo, como se establecen en cualquiera de SEQ ID NOS: 196-207).

Como se utiliza aquí, un mutante o mutación o variante o modificación sensible a la temperatura (ts) que confiere sensibilidad a la temperatura se refiere a un polipéptido que se modifica para mostrar una mayor actividad enzimática en algunas temperaturas llamadas temperaturas permisivas en comparación con otras temperaturas llamadas temperaturas no permisivas. Por lo general, un mutante sensible a la temperatura muestra actividad enzimática más alta a temperaturas más bajas que a temperaturas más altas.

Como se usa aquí, la temperatura permisiva es la temperatura a la cual un polipéptido muestra una mayor actividad enzimática luego en una segunda temperatura llamada temperatura no permisiva. Por lo tanto, las enzimas modificadas en el presente documento muestran diferentes actividades a diferentes temperaturas, que es superior a una temperatura luego a otra temperatura. La temperatura a la que presenta mayor actividad es la temperatura permisiva.

000029

Como se utiliza aquí, una temperatura no permisiva es la temperatura donde un polipéptido exhibe menor actividad enzimática luego a la temperatura permisiva y exhibe una actividad reducida en comparación con la enzima que no se modificada. Los mutantes sensibles a la temperatura previstos en este documento presentan actividad enzimática a la temperatura no permisiva que está en o alrededor de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% hasta un mínimo de 100% de la actividad a la temperatura permisiva. Los mutantes sensibles a la temperatura previstos en este documento también presentan un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% hasta menos de 100% de la actividad a la temperatura no permisiva en comparación con la enzima que no se modifica (por ejemplo, la enzima tipo silvestre) a la temperatura no permisiva.

Como se utiliza aquí, la relación de la actividad enzimática a la temperatura permisiva en comparación con la temperatura no permisiva se refiere a la relación entre la actividad enzimática a la temperatura permisiva y no permisiva. Se expresa por el cociente de la división de la actividad a la temperatura permisiva por la actividad a la temperatura no permisiva.

Como se usa aquí, la temperatura fisiológica se refiere a las condiciones de temperatura mantenidas en el cuerpo, es decir, alrededor de 37°C, por ejemplo, en o alrededor de 34°C, 35°C, 36°C, 37°, 38°C o 39°C. Se entiende que el rango normal de la temperatura del cuerpo humano varía dependiendo de factores tales como la tasa de metabolismo, el órgano en

particular y otros factores. A efectos de este documento, la temperatura fisiológica es la temperatura que existe para un sujeto vestido cómodamente sin ayuno, que está dentro de una habitación que se mantiene a una temperatura ambiente normal (por ejemplo, 22.7 a 24.4° C).

Como se usa aquí, reversible se refiere a una enzima modificada por cuya actividad a la temperatura permisiva es susceptible de ser recuperada o se recuperara parcialmente cuando se expone a la temperatura no permisiva y reexposición a la temperatura permisiva. Por lo tanto, la actividad de una enzima reversible una vez que se expone a la temperatura no permisivas es la misma o sustancialmente retenida en comparación con la actividad de la enzima expuesta únicamente a las condiciones permisivas y es mayor que la actividad de la enzima expuesta únicamente a las temperaturas no permisivas. Por ejemplo, al regresar a las condiciones permisivas de las condiciones no permisivas, las enzimas reversibles presentan en o alrededor de 120%, 125%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 200% o más la actividad de la enzima expuesta solamente a las temperaturas no permisivas y conservan la actividad de la enzima expuesta sólo a la temperatura permisiva.

Como se utiliza aquí, irreversible o no reversible se refiere a una enzima modificada cuya actividad enzimática a la temperatura permisiva no se recupera cuando se expone a la temperatura no permisiva y reexposición a la temperatura permisiva. Por lo tanto, la actividad de una enzima irreversible una vez que se expone a la temperatura no permisiva es inferior a la actividad de la enzima expuesta sólo

a la temperatura permisiva y también es menor o igual o sustancialmente la misma que la actividad de la enzima expuesta sólo a las afecciones no permisivas. Por ejemplo, al regresar a las condiciones permisivas, las enzimas irreversibles presentan en o alrededor del 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 105%, 110%, 115%, o 120% de la actividad a temperaturas no permisivas y un mínimo de 100% de la actividad en la actividad de la enzima expuesta sólo a la temperatura permisiva.

Como se utiliza aquí, un dominio se refiere a una porción (una secuencia de tres o más, generalmente de 5 o 7 o más aminoácidos) de un polipéptido que es estructural y/o funcionalmente diferenciable o definible. Por ejemplo, un dominio incluye aquellos que pueden formar una estructura independiente plegada de una proteína compuesta por una o más porciones estructurales (por ejemplo, las combinaciones de hélices alfa y/o hebras beta conectados por regiones de rizo) y/o que se hayan reconocido de acuerdo con una actividad funcional, como la actividad de la cinasa. Una proteína puede tener uno o más de uno, dominios distintos. Por ejemplo, un dominio puede ser identificado, definido o caracterizado por homología de la secuencia en él a los miembros familiares relacionados, como la homología y porciones que definen un dominio extracelular. En otro ejemplo, un dominio se puede distinguir por su función, como por la actividad enzimática, por ejemplo, la actividad de cinasa, o una capacidad de interactuar con una biomolécula, como el enlace al ADN, la unión del ligando y dimerización. Un dominio de forma

independiente puede exhibir una función o actividad de tal manera que el dominio de forma independiente o fusionada con otra molécula puede llevar a cabo una actividad, como, por ejemplo, la actividad proteolítica o enlace del ligando. Un dominio puede ser una secuencia lineal de aminoácidos o una secuencia no lineal de aminoácidos del polipéptido. Muchos polipéptidos contienen una pluralidad de dominios. Por ejemplo, la estructura de dominio de las MMP se expone en la Figura 1. Aquellos con conocimientos en la materia están familiarizados con los dominios y los pueden identificar en virtud de la homología estructural y/o funcional con otros dominios tales.

Como se utiliza aquí, un dominio catalítico se refiere a cualquier parte de un polipéptido que presenta una función catalítica o enzimática. Tales dominios o regiones suelen interactuar con un sustrato para dar lugar a la catálisis de la misma. Para las MMP, el dominio catalítico de zinc contiene una porción de enlace, que contiene el ión $Zn2^{+}$ enlazado por tres residuos de histidina y está representado por la secuencia conservada HExxHxxGxxH.

Como se utiliza aquí, una ligadura rica en prolina (también llamada la región de articulación) se refiere a una articulación flexible o región de unión que no tiene ninguna función determinable. Tal región típicamente se encuentra entre los dominios o regiones y contribuye a la flexibilidad de un polipéptido.

Como se utiliza aquí, un dominio de enlace a hemopexina o el dominio C-terminal tipo hemopexina, se refiere a la región C-terminal de MMP. Se trata de una estructura de cuatro paletas

de la hélice-β, que participa en las interacciones proteína-proteína. Por ejemplo, el dominio del enlace de hemopexina de las MMP interactúa con diferentes sustratos y también interactúa con los inhibidores, por ejemplo, el tejido inhibidor de metaloproteasas (TIMP).

Como aquí se utiliza, que consiste esencialmente de, o la mención de un polipéptido que consiste esencialmente en un dominio determinado, por ejemplo, el dominio catalítico, significa que la única parte del MMP del polipéptido es el dominio o una parte de su actividad catalítica. El polipéptido puede incluir opcionalmente secuencias de aminoácidos adicionales no derivados de MMP, por lo general un mínimo de 3, 4, 5, 6 o más, como por la inserción en otro polipéptido o de su ligadura.

Como se utiliza aquí, un "zimógeno" se refiere a una enzima que es un precursor inactivo y requiere algún cambio, como proteólisis del polipéptido, para convertirse en activo. Algunos zimógenos también requieren la adición de factores tales como, pero no limitado a, el pH, fuerza iónica, los iones metálicos o la temperatura para la activación. Zimógenos que incluyen la forma de proenzima de las enzimas. Por lo tanto, los zimógenos en general, están inactivos y se pueden convertir en un polipéptido maduro por escisión autocatalítica o catalítica de la proregión del zimógeno en presencia o ausencia de cofactores adicionales.

Como se utiliza aquí, un prosegmento o proregión se refiere a una región o un segmento que se escinde para producir una proteína madura. Esto puede incluir segmentos que funcionan

para suprimir la actividad enzimática mediante el enmascaramiento de la maquinaria catalítica. Una proregión es una secuencia de aminoácidos colocada en el extremo amino terminal de un polipéptido maduro, y puede ser tan pequeña como algunos aminoácidos, o puede ser una estructura multidominio.

Como se utiliza aquí, una secuencia de activación se refiere a una secuencia de aminoácidos en un zimógeno que son el sitio necesario para la escisión de activación o escisión de maduración para formar una proteasa activa. La escisión de una secuencia de activación puede ser catalizada autocatalíticamente o mediante la activación de los compañeros.

La escisión de activación es un tipo de escisión de maduración en el cual se produce un cambio conformacional requerido para la actividad. La activación puede resultar en la producción de formas múltiples de la cadena de las proteasas, por ejemplo, formas de dos cadenas. En algunos casos, las formas individuales de la cadena de la proteasa pueden mostrar actividad proteolítica como una única cadena.

Como se utiliza aquí, un cofactor se refiere a una condición o factor que se requiere para la actividad de una enzima. Los cofactores incluyen todo lo necesario para la actividad enzimática. Ejemplos de cofactores incluyen, pero no se limitan a, pH, fuerza iónica, los iones de metal o de temperatura. En relación con la administración in vivo de una enzima, cofactores incluyen factores presentes de forma endógena y factores proporcionados de forma exógena.

Como se utiliza aquí, una condición de activación se refiere a cualquier condición física o una combinación de

condiciones que se requiere para la actividad de una enzima. A efectos de este documento, una condición de activación de una enzima activable que degrada la matriz (AMDE) incluye a aquellas que no están presentes en el lugar de administración, por ejemplo, no están presentes en la matriz extracelular, en las cantidades (cantidad es decir, el grado, nivel o de otro tipo medida física) requeridas para realizar la activación de la enzima. Ejemplos de las condiciones de activación incluyen, pero no están limitadas a, pH, iones metálicos, agentes oxidantes o reductores, la temperatura y fuerza iónica. Por ejemplo, en el caso de las enzimas degradantes de la matriz lisosomal que actúan en condiciones de pH bajo, pero inactivas a pH neutro, la exposición de la enzima inactiva a una condición de activación que es pH ácido, resulta en la activación de la enzima. En virtud del hecho de que la condición de activación no está presente en el lugar de la administración de la enzima, sino que debe añadirse exógenamente, la condición de activación se disipará y/o será neutralizada con el tiempo, de tal manera que la condición de activación ya no está presente para activar la enzima. Por lo tanto, la enzima se activa durante un tiempo predeterminado o limitado con la administración.

Como se utiliza aquí, un activador se refiere a cualquier composición que proporciona una condición de activación de una enzima activable que degrada la matriz. Entre los ejemplos de activadores incluyen, pero no se limitan a una solución amortiguadora de pH ácido, una solución amortiguadora fría, o una solución amortiguadora de calcio.

Como se utiliza aquí, una "enzima activable que degrada la matriz (AMDE)" se refiere a una enzima degradante de la matriz que requiere una condición de activación con el fin de estar activa. A efectos de la presente, por ejemplo, una AMDE está sustancialmente inactiva en la ECM a menos que esté expuesta a los activadores antes, o con posterioridad a la administración de la AMDE, proporcionando con ello una condición para la activación de la enzima. Por lo tanto, la activación de las enzimas activables es controlada por condiciones exógenas para que el periodo de tiempo en un lugar in vivo o en el sitio en el que la enzima se activa pueda ser predeterminado y/o controlado como resultado de la disipación y/o neutralización de la condición de activación (es decir, temporalmente controlable o controlada por el tiempo). Así, en virtud de la exposición a una condición de activación, las enzimas se activan por un tiempo limitado y/o de forma limitada en la ECM (es decir, son condicionalmente activas). El alcance y el tiempo de la activación pueden ser controlados mediante la selección de activador o las condiciones de la activación, y pueden ser por un tiempo predeterminado. Por ejemplo, una enzima lisosomal, como una catepsina L, es activable en que puede ser activada por la exposición a la condición de activación de pH, que se estipulan en una solución amortiguada ácida. Tras la administración de la enzima activa con el medio ambiente de pH neutro de la ECM, el medio ambiente del pH volverá a la neutralidad en un período de tiempo que puede estar predeterminado basado en la capacidad de amortiguación de

la solución amortiguadora ácida, de tal manera que la enzima se vuelven inactiva.

Tal como se utiliza en este documento, "la cantidad de un activador" se refiere a la cantidad, grado o nivel de un activador. La cantidad de un activador puede corresponder a una concentración o cantidad absoluta o una temperatura en particular o el pH. A efectos de la presente, la cantidad de un activador es típicamente una cantidad que es suficiente para dar lugar a la activación condicional de una enzima. La cantidad puede ser ajustada para alterar la duración de activación de modo que la activación puede ser para un tiempo limitado o predeterminado.

Como se utiliza aquí, una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "dosis terapéuticamente efectiva" se refiere a un agente, compuesto, material, o composición que contiene un compuesto que es por lo menos suficiente para producir un efecto terapéutico.

Como se utiliza aquí, una enzima que se activa por un tiempo limitado o de duración limitada se refiere a una enzima activa que tiene una actividad que se disipa y/o se neutraliza con el tiempo. Así, en virtud de la ausencia de una condición de activación, la enzima se vuelve inactiva.

Como se utiliza aquí, tiempo predeterminado significa un límite que se conoce antes y se puede controlar. La disipación y/o neutralización de una condición de activación necesaria para la actividad de una enzima puede ser valorada de manera que el tiempo necesario para una enzima activa para convertirse en inactiva se conoce. Por ejemplo, una enzima activada por

ácido que se administra en medio ácido y se expone a un entorno en vivo con un pH neutro (es decir, la ECM), con el tiempo, estará expuesta a un pH que aumenta gradualmente de tal manera que la enzima se mantendrá activa por sólo un tiempo limitado. La tasa de aumento del pH puede ser controlada, por ejemplo, mediante la variación de la capacidad amortiguadora de la solución amortiguadora ácida tal que el período de tiempo necesario para que una enzima activa se vuelva inactiva puede ser pre-determinado. A efectos de este documento, una enzima puede estar activa por un tiempo predeterminado que es, o está a 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, o 4 horas.

Como se utiliza aquí, sustancialmente inactiva a pH neutro significa que la enzima, cuando está a un pH neutro, muestra menos de 10% de la actividad de la enzima en su pH óptimo en condiciones similares (a excepción de las diferencias del pH), es decir, ensayo, amortiguamiento, fuerza iónica.

Como se utiliza aquí, sustancialmente activo a pH 5.5 significa que la enzima, cuando está a un pH de 5.5, muestra más de 10%, por ejemplo, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la actividad de la enzima en su pH óptimo en condiciones similares (a excepción de las diferencias del pH), es decir, ensayo, amortiguamiento, la fuerza iónica.

Tal como se utiliza en este documento, la administración sub-epidérmica se refiere a cualquier administración que

resulte en la entrega de la enzima en la capa más externa de la piel. La administración subepidérmica no incluye la aplicación tópica en la capa externa de la piel. Los ejemplos de administraciones sub-epidérmicas incluyen, pero no se limitan a, vías de administración subcutánea, intramuscular, intradérmica e intralesional.

Como se usa aquí, el sustrato se refiere a una molécula que se escinde por una enzima. Como mínimo, un sustrato objetivo incluye un péptido que contiene la secuencia reconocida por el desdoblamiento de la proteasa, y por lo tanto puede haber dos, tres, cuatro, cinco, seis o más residuos de longitud. Un sustrato también incluye una proteína de longitud completa, variante alélica, isoforma o cualquier parte de éstos, que se escinde por una enzima. Además, un sustrato incluye un péptido o proteína que contiene una fracción adicional que no afecta a la escisión del sustrato por la enzima. Por ejemplo, un sustrato puede incluir un péptido de cuatro aminoácidos, o una proteína de longitud completa ligada químicamente a una fracción fluorogénica.

Como se usa aquí, la escisión se refiere a la ruptura de los enlaces peptídicos u otros enlaces por una enzima que resulta en uno o varios productos de degradación.

Como se usa aquí, la actividad se refiere a una actividad funcional o actividades de un polipéptido o parte de éstos, asociados a una proteína de longitud completa (completa). Las actividades funcionales incluyen, pero no se limitan a, la actividad biológica, catalítica o de actividad enzimática, antigenicidad (capacidad para unirse o competir con un

polipéptido de enlace a un anticuerpo anti-polipéptido), la inmunogenicidad, la capacidad para formar multímeros, y específicamente la capacidad de enlazar a un receptor o ligando para el polipéptido.

Como se usa aquí, la actividad enzimática o la actividad catalítica o actividad de escisión se refiere a la actividad de una proteasa que se evaluará en ensayos proteolíticos in vitro que detectan la proteólisis de un sustrato seleccionado.

Como se utiliza aquí, una enzima activa se refiere a una enzima que muestra actividad enzimática. A efectos de este documento, las enzimas activas son las que cortan uno o más componentes de la ECM, como el colágeno. Las enzimas activas incluyen las de una sola cadena o en forma de dos cadenas.

Como se utiliza aquí, una enzima inactiva se refiere a una enzima que no exhibe ninguna actividad sustancial (es decir, la actividad catalítica o escisión de la actividad), como por ejemplo menos del 10% de la máxima actividad de la enzima. La enzima puede estar inactiva, en virtud de su conformación, la ausencia de una activación de las condiciones necesarias para su actividad, o la presencia de un inhibidor o cualquier otra condición o factor o forma que hace que la enzima esté sustancialmente inactiva.

Como se utiliza aquí, una proteína humana es una codificada por una molécula de ácido nucleico, como el ADN, presente en el genoma de un ser humano, incluyendo todas las variantes alélicas y las variaciones conservadoras de la misma. Una variante o modificación de una proteína es una proteína

humana, si la modificación se basa en el tipo silvestre o la secuencia prominente de una proteína humana.

Como se utiliza aquí, una enzima que degrada hialuronano se refiere a una enzima que cataliza la ruptura de un polímero de hialuronano (también conocido como ácido hialurónico o HA) en fragmentos más pequeños de peso molecular. Ejemplos de las enzimas que degradan hialuronano son las hialuronidasas y en particular condroitinasas y liasas que tienen la capacidad de despolimerizar hialuronano. Las condroitinasas ejemplares que son las enzimas que degradan hialuronano incluyen, pero no se limitan a, la condroitina liasa ABC (también conocida como condroitinasa ABC), liasa condroitina AC (también conocida como el sulfato de condroitina liasa o sulfato de condroitina eliminasa) y C liasa condroitina. La condroitina liasa ABC se compone de dos enzimas, la condroitina-sulfato-ABC endoliasa (EC 4.2.2.20) y el condroitina sulfato-ABC exoliasa (CE 4.2.2.21). Ejemplos de condroitín-sulfato-ABC-endoliasas y condroitina-ABC-sulfato-exoliasas incluyen, pero no se limitan a, los de *Proteus vulgaris* y *Flavobacterium heparinum* (condroitina-sulfato-ABC endoliasa de *Proteus vulgaris* se establece en la SEQ ID NO: 305; Sato et al. (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol. 41 1):39-46). Ejemplos de enzimas AC condroitinasa de las bacterias incluyen, pero no se limitan a, las de *Flavobacterium heparinum, Victivallis vadensis,* establecidos en la SEQ ID NO: 308, y *Arthrobacter aurescens* (Tkalec et al. (2000) Applied Environmental Microbiology 66 (1):29-35; Ernst et al. (1995) Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30(5):387-444). Ejemplos de enzimas de C

condroitinasa de las bacteria incluyen, pero no se limitan a, las de *Streptococcus* y *Flavobacterium* (Hibi et al. (1989) FEMS Microbiol-Lett. 48(2):121-4; Michelacci et al. (1976) J Biol. Chem. 251:1154-8; Tsuda et al. (1999) Eur. J. Biochem. 262:127-133).

Como se utiliza aquí, hialuronidasa se refiere a una enzima que degrada el ácido hialurónico. Las hialuronidasas incluyen hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.99.1), hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos, y los crustáceos (CE 3.2.1.36), y hialuronidasas tipo mamíferos (CE 3.2.1.35). Hialuronidasas comprenderán también los de origen no humano, incluyendo pero no limitado a, los ratones, caninos, felinos, leporinos, aves, bovinos, ovinos, porcinos, equinos, peces, raninas, bacterianas, y cualquier otra de las sanguijuelas, otros parásitos, y crustáceos. Las hialuronidasas ejemplares no humanas incluyen las establecidas en cualquiera de SEQ ID NOS: 237-260. Las hialuronidasas ejemplares humanas incluyen HYAL1 (SEQ ID NO: 262), HYAL2 (SEQ ID NO: 263), HYAL3 (SEQ ID NO: 264), HYAL4 (SEQ ID 0 NO: 265), y PH20 (SEQ ID NO: 232). También se incluyen entre otras hialuronidasas la PH20 humana soluble y rHuPH20 soluble.

La referencia a hialuronidasas incluye polipéptidos precursores de hialuronidasa y polipéptidos maduros de hialuronidasa (como aquellos en los que una secuencia de señales se ha eliminado), formas truncadas de la misma que tienen actividad, e incluye variantes alélicas y variantes de especies, las variantes codificadas por variantes del empalme, y otras variantes, incluidos los polipéptidos que tienen al

menos un 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % o más de identidad de la secuencia del polipéptido precursor establecidos en cualquiera de SEQ ID NO: 232 o la forma madura de la misma. Las hialuronidasas también incluyen aquellas que contienen químicos o modificaciones postraduccionales y los que no contienen químicos o modificaciones postraduccionales. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, pegilación, albuminación, glicosilación, carboxilación, farnesilación, hidroxilación, la fosforilación, y otras modificaciones de polipéptidos conocidas en el arte.

Como se usa aquí, PH20 humana soluble o sHuPH20 incluyen polipéptidos maduros carentes de todo o una parte del lugar de inserción de glicosil fosfatidil inositol (GPI) en el extremo C-terminal de tal manera que con la expresión, los polipéptidos son solubles. Ejemplos de polipéptidos sHuPH20 son polipéptidos maduros que tienen una secuencia de aminoácidos establecidos en cualquiera de SEQ ID NOS:226-231. Los polipéptidos precursores de tales polipéptidos ejemplares sHuPH20 incluyen una secuencia de señal de aminoácidos. Ejemplos de un precursor se establecen en la SEQ ID NOS: 225, que contiene una secuencia de señal de 35 aminoácidos en las posiciones de los aminoácidos 1-35. Los polipéptidos solubles HuPH20 pueden ser degradados durante o después de los métodos de purificación y la producción que se describen a continuación.

Como se usa aquí, rHuPH20 soluble se refiere a una forma soluble de PH20 humana, que es expresada de forma recombinante en las células de ovario de hámster chino (CHO). El rHuPH20

soluble está codificado por el ácido nucleico que codifica los aminoácidos 1-482 establecidos en la SEQ ID NO: 225. También se incluyen las moléculas de ADN que son variantes alélicas del mismo y otras variantes solubles. El ácido nucleico que codifica rHuPH20 soluble se expresa en células CHO que secretan el polipéptido maduro. Cuando se producen en el medio de cultivo existe una gran heterogeneidad en el C-terminal para que el producto incluya una mezcla de especies de la SEQ ID NOS:226-231. Las correspondientes variantes alélicas y otras variantes también están incluidas. Otras variantes pueden tener un 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más secuencias de identidad con cualquiera de SEQ ID NOS:226-231, con tal que conserven una actividad de hialuronidasa y sean solubles.

Como se usa aquí, la actividad de hialuronidasa se refiere a cualquier actividad exhibida por un polipéptido de hialuronidasa. Estas actividades pueden ser probadas in vitro y/o in vivo e incluyen, aunque no se limitan a, la actividad enzimática, tal como efectuar la escisión de ácido hialurónico, la capacidad de actuar como un agente de dispersión o de difusión y antigenicidad. Los ensayos ejemplares incluyen la determinación de la microturbidez (véase, por ejemplo, Ejemplo 16) que mide la escisión del ácido hialurónico por la hialuronidasa indirectamente por la detección de la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se une sin escindir con albúmina sérica.

Como se utiliza aquí, los residuos de α aminoácidos que se presentan naturalmente son los residuos de los 20 α-aminoácidos

que se encuentran en la naturaleza que se incorporan a la proteína por el reconocimiento específico de la molécula de tRNA cargada a su codón de ARNm afines en los seres humanos.

Como se utiliza aquí, los ácidos nucleicos incluyen el ADN, el ARN y los análogos de los mismos, incluyendo los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y sus mezclas. Los ácidos nucleicos puede ser simples o de doble cadena. Al referirse a las sondas o cebadores, que son opcionalmente etiquetados, como con una etiqueta detectable, como por ejemplo un fluorescente o radioetiqueta, se contemplan las moléculas de cadena simple. Dichas moléculas son típicamente de una longitud tal que su objetivo es estadísticamente único o de número de copias bajo (normalmente menos de 5, generalmente menos de 3) para sondeo o de una biblioteca de cebado. En general, una sonda o cebador contiene al menos 14, 16 o 30 nucleótidos contiguos de la secuencia complementaria o idéntica a un gen de interés. Las sondas y cebadores pueden ser de 10, 20, 30, 50, 100 o más ácidos nucleicos de largo.

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

Como se usan en la presente, los aminoácidos que se presentan en las diversas secuencias de aminoácidos aquí contempladas, se identifican de acuerdo con sus abreviaturas conocidas de tres letras o de una letra (Tabla 1). Los nucleótidos que se presentan en los diversos fragmentos de ácidos nucleicos se designan con las designaciones estándar de una letra que se usan de rutina en la técnica.

Como se usa en la presente, un "aminoácido" es un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico. Un polipéptido contiene dos o más aminoácidos. Para los propósitos en la presente, aminoácidos incluyen los veinte aminoácidos que se presentan naturalmente, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos (es decir, aminoácidos en donde el carbono tiene una cadena lateral).

Como se usan en la presente, "residuo de aminoácidos" se refiere a un aminoácido formado con la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus ligaduras de péptidos. Los residuos de aminoácidos aquí descritos se presume que están en la forma "L" isomérica. Los residuos en la forma isomérica "D", que se designan así, se pueden sustituir por cualquier residuo de aminoácido L con tal de que se mantenga la propiedad funcional deseada por el polipéptido. NH2 se refiere al grupo amino libre presente en la terminación amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en la terminación carboxilo de un polipéptido. Al mantener la nomenclatura estándar de polipéptidos descrita en J. Biol. Chem., 243:3552-3559, (1969), y adoptada en el 37 C.F.R, §§ 1.821-1.822, las abreviaturas para los residuos de aminoácidos se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1 - Tabla de Correspondencia

SIMBOLO		
1 letra	3 letras	AMINOACIDO
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina

000047

T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptofano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Acido Aspártico
N	Asn	Asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido u otro

Se debe observar que todas las secuencias de residuos de aminoácidos aquí representadas por las formulas, tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de la terminación amino a la terminación carboxilo. Además, la frase "residuo de aminoácidos" se define ampliamente para incluir los aminoácidos listados en la Tabla de Correspondencia (Tabla 1) y aminoácidos modificados e inusuales, tales como aquellos referidos en 37 C.F.R. §§ 1.821-1.822, e incorporados en la presente por referencia. Además, se debe señalar que un guión al comienzo o final de una secuencia de residuo de aminoácidos indica un enlace de péptido hasta una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos, hasta un grupo terminal amino tal como NH2 o hasta un grupo terminal carboxilo tal como COOH.

Como se usan en la presente, "aminoácidos que se presentan naturalmente" se refieren a los 20 L-aminoácidos que se presentan en los polipéptidos.

Como se usa en la presente, "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto orgánico que tiene una estructura

similar a un aminoácido natural pero que ha sido modificado estructuralmente para imitar la estructura y reactividad de un aminoácido natural. Los aminoácidos que no se presentan naturalmente incluyen así, por ejemplo, aminoácidos o análogos de aminoácidos diferentes a los 20 aminoácidos que se presentan naturalmente e incluyen, pero no se limitan a, los D-isoestereómeros de aminoácidos. Los aminoácidos no naturales ejemplares se describen en la presente y se conocen para aquellos expertos en la técnica.

Como se usa en la presente, un constructo de ADN es una molécula de ADN lineal o circular, de hebra sencilla o de hebra doble, que contiene segmentos de ADN combinados y yuxtapuestos en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Los constructos de ADN existen como resultado de la manipulación humana, e incluyen clones y otras copias de moléculas manipuladas.

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

Como se usa en la presente, el término polinucleótido significa un polímero de hebra sencilla o de hebra doble de bases de desoxiribonucleótidos o de ribonucleótidos leídas desde el extremo 5' ale 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar de fuentes naturales, sintetizados in

vitro, o preparados a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. La longitud de la molécula de polinucleótido se da en la presente en términos de nucleótidos (abreviados "nt") o pares de bases (abreviados "bp"). El término nucleótidos se usa para moléculas de hebra sencilla o de hebra doble en donde lo permite el contexto. Cuando se aplica el término a moléculas de hebra doble, se usa para denotar la longitud global y se entenderá como que es equivalente al término pares de bases. Se reconocerá por aquellos expertos en la técnica que las dos hebras de un polinucleótido de hebra doble, pueden diferir ligeramente de longitud y que los extremos del mismo se pueden escalonar; así todos los nucleótidos dentro de una molécula de hebra doble de polinucleótido no se pueden aparear. Tales extremos no apareados no excederán, en general, 20 nucleótidos de longitud.

Como se usa en la presente, "similitud" entre dos proteínas o ácidos nucleicos se refiere a la relación entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas o las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos. La similitud se puede basar en el grado de identidad y/u homología de secuencias de residuos y los residuos allí contenidos. Los métodos para evaluar el grado de similitud entre proteínas o ácidos nucleicos se conocen para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, en un método de evaluación de la similitud de secuencias, dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se alinean en una forma que produce un nivel máximo de identidad entre las secuencias. La "identidad" se refiere al grado al cual las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos no son

000050

variantes. La alineación de secuencias de aminoácidos, y hasta cierto grado las secuencias de nucleótidos, también pueden tomar en cuenta diferencias conservadores y/o sustituciones frecuentes en los aminoácidos (o nucleótidos). Las diferencias conservadoras son aquellas que conservan las propiedades físico-químicas de los residuos involucrados. Las alineaciones pueden ser globales (alineación de las secuencias comparadas sobre la longitud completa de las secuencias e incluyen todos los residuos) o locales (la alineación de una porción de las secuencias que incluye solamente la región o regiones más similares).

La "identidad" per se, tiene un significado reconocido en la técnica y se puede calcular al usar técnicas publicadas. (ver, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). Aunque existen diversos métodos para medir la identidad entre dos polinucleótidos o polipéptidos, el término "identidad" es bien conocido por los técnicos expertos (Carillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math 45:1073 (1988)).

Como se usan en la presente, homólogo (con respecto a secuencias de ácidos nucleicos y/o de aminoácidos) significa alrededor de, mayor que, o igual a 25% de homología de

secuencias, típicamente mayor que, o igual a 25%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de homología de secuencias; el porcentaje preciso se puede especificar si es necesario. Para los propósitos en la presente, los términos "homología" e "identidad" se usan a menudo de forma intercambiable, a menos que se indique de otra manera. En general, para la determinación del porcentaje de homología o de identidad, las secuencias se alinean de manera que se obtiene la coincidencia del orden más alto (ver, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991 ; Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por la homología de secuencias, se determina el número de aminoácidos conservados por programas de algoritmos de alineación estándar, y se pueden usar si las penalizaciones de espacios por omisión establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácidos nucleicos sustancialmente homólogas hibridizarían típicamente a una severidad moderada o a una alta severidad todas a lo largo de la longitud del ácido nucleico de interés. También se contemplan moléculas de ácidos nucleicos que contengan codones degenerados en lugar de codones en la molécula de hibridización de ácido nucleico.

Ya sea que alguna de las dos moléculas tenga secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos que sean al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% "idénticas" u "homólogas" se puede determinar al usar algoritmos de cómputo conocidos tales como el programa "FAST", al usar por ejemplo, los parámetros por omisión como en Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12(I):3S7 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., et al, J Molec Biol 215:403 (1990)); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48A013). Por ejemplo, la función BLAST de la base de datos del Centro Nacional para Información de Biotecnología se puede usar para determinar la identidad. Otros programas comercial o públicamente disponibles incluyen, el programa DNAStar "MegAlign" (Madison, WI) y el programa del Grupo de Cómputo de Genética de la Universidad de Wisconsin (UWG) "Gap" (Madison WI). El porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de ácidos nucleicos se puede determinar, por ejemplo, al comparar la información de secuencias usando un programa de cómputo GAP (por ejemplo, Needleman et al. (1970) J. MoI. Biol. 48:443, como se modificó por Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482). Brevemente, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos), que son similares, divididos por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por omisión para el programa GAP pueden incluir:

(1) una matriz unitaria de comparación (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:6745, como se describe por Schwartz and Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3.0 para cada espacio y una penalización adicional de 0.10 para cada símbolo en cada espacio; y (3) ninguna penalización para espacios en el extremo.

Por lo tanto, como se usa en la presente, el término "identidad" u "homología" representa una comparación entre una prueba y un polipéptido o polinucleótido de referencia. Como se usan en la presente, el término al menos "90% idéntico a" se refiere a identidades en porcentaje desde 90 a 99.99 con relación al ácido nucleico de referencia o la secuencia de aminoácidos del polipéptido. La identidad a un nivel de 90% o más es indicativo del hecho de que, al asumir que se comparan para propósitos de ejemplificación una longitud de prueba y de referencia de un polipéptido de 100 aminoácidos, no más del 10% (es decir, 10 de cada 100) de los aminoácidos en el polipéptido de prueba difiere de aquel del polipéptido de referencia. Las comparaciones similares se pueden hacer entre los polinucleótidos de prueba y de referencia. Tales diferencias se pueden representar como mutaciones de punto aleatoriamente distribuidas sobre la extensión completa de un polipéptido o se pueden agrupar en una o más ubicaciones de longitud variable hasta un máximo permisible, por ejemplo 10/100 diferencia de aminoácidos (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias

000054

se definen como sustituciones, inserciones o eliminaciones de ácidos nucleicos o de aminoácidos. Al nivel de las homologías o identidades arriba de alrededor de 85-90%, el resultado debe ser independiente del programa y los parámetros de espacio fijados; tales altos niveles de identidad se pueden evaluar fácilmente, a menudo por alineación manual sin apoyarse en el software.

Como se usa en la presente, una secuencia alineada se refiere al uso de homología (similitud y/o identidad) para alinear posiciones correspondientes en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Típicamente, se alinean dos o más secuencias que se relacionan por 50% o más identidad. Un conjunto alineado de secuencias se refiere a 2 o más secuencias que se alinean en las posiciones correspondientes y puede incluir secuencias de alineación derivadas de ARNs, tales como ESTs y otros ADNc, alineados con secuencia genómica de ADN.

Como se usa en la presente, "cebador" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede actuar como un punto de inicio de la síntesis de ADN dirigida por plantilla bajo condiciones apropiadas (por ejemplo, en la presencia de cuatro trifosfatos de nucleósido diferentes y un agente de polimerización, tal como polimerasa de ADN, polimerasa de ARN, o transcriptasa inversa) en una solución amortiguadora apropiada y a una temperatura adecuada. Se apreciará que una determinada molécula de ácido nucleicos puede servir como una "sonda" y como un "cebador". Un cebador, sin embargo, tiene un grupo 3' hidroxilo para extensión. Un cebador puede ser usado en una diversidad de métodos, incluyendo, por ejemplo, reacción

en cadena de polimerasa (PCR), transcriptasa reversa (RT)-PCR, RNA PCR, LCR, PCR múltiple, PCR de "mango de sartén", PCR de captura, PCR de expresión, RACE 3' y 5', PCR in situ, PCR mediada por ligación y otros protocolos de amplificación.

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

Como se usan en la presente, "hibridiza específicamente" se refiere a combinar los pares de bases, al aparear bases complementarias, de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) a una molécula de ácido nucleico objetivo. Aquellos de experiencia en la técnica están familiarizados con parámetros in vitro e in vivo que afectan la hibridación específica, tales como longitud y composición de la molécula en particular. Los parámetros particularmente relevantes para la hibridación in vitro incluyen además la combinación de pares de bases y la temperatura de lavado, composición amortiguadora y concentración de sales. Las condiciones de lavado ejemplares para remover moléculas de ácidos nucleicos no enlazadas específicamente a una alta severidad son 0.1 x SSPE, 0.1% SDS, 65°C, y a una severidad media son 0.2 x SSPE, 0.1% SDS, 50°C. Se conocen en la técnica las condiciones de severidad equivalentes. La persona experimentada puede fácilmente ajustar estos parámetros para alcanzar una hibridación específica de una molécula de ácido

nucleico a una molécula objetivo de ácido nucleico adecuada para una aplicación en particular. De forma complementaria, cuando se refiere a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos pueden hibridizarse, típicamente con menos de 25%, 15% o 5% no coincidencias entre los nucleótidos opuestos. Si es necesario, se especificará el porcentaje de complementariedad. Típicamente las dos moléculas se seleccionan de manera que se hibridicen bajo condiciones de alta severidad.

Como se usa en la presente, sustancialmente idéntico a un producto significa suficientemente similar de manera que la propiedad de interés esté sustancialmente sin cambio de forma que el producto sustancialmente idéntico se pueda usar en lugar del producto.

Como se usan en la presente, también se entiende que los términos "sustancialmente idéntico" o "similar" varían con el contexto como se entiende por aquellos expertos en la técnica relevante.

Como se usan en la presente, una variante alélica o variación alélica hace referencia a alguna de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo lugar cromosomal. La variación alélica aparece naturalmente a través de la mutación, y puede resultar en polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silentes (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tengan secuencias alteradas de aminoácidos. El término "variante alélica" también se usa en la presente para denotar una proteína codificada por una variante alélica de un

gen. Típicamente la forma de referencia de un gen codifica una forma de tipo silvestre y/o una forma predominantes de un polipéptido desde una población o número de referencia sencillo de una especie. Típicamente, las variantes alélicas, que incluyen variantes entre especies típicamente tienen al menos 80%, 90% o mayor identidad de aminoácidos con una forma de tipo silvestre y/o predominantes de la misma especie; el grado de identidad depende del gen y de si la comparación es entre especies o dentro de especies. Generalmente las variantes alélicas dentro de especies tienen al menos alrededor de 80%, 85%, 90% o 95% de identidad o mayor con una forma de tipo silvestre y/o predominante, incluyendo 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad con una forma de tipo silvestre y/o predominante de un polipéptido. La referencia a una variante alélica en la presente, se refiere generalmente a variaciones de proteínas entre los miembros de la misma especie.

Como se usa en la presente, "alelo," que se usa en la presente de manera intercambiable con "variante alélica" se refiere a formas alternas de un gen o porciones del mismo. El alelo ocupa el mismo lugar o posición sobre los cromosomas homólogos. Cuando un sujeto tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homocigótico para ese gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterocigótico para el gen. Los alelos de un gen específico pueden diferir uno del otro en un nucleótido sencillo o en varios nucleótidos, y pueden incluir sustituciones, eliminaciones e inserciones de nucleótidos. Un

alelo de un gen también puede ser una forma de un gen que contiene una mutación.

Como se usa en la presente, variantes de especies se refieren a variantes en polipéptidos entre diferentes especies, incluyendo especies diferentes de mamíferos, tales como el ratón y el humano.

Como se usa en la presente, una variante de empalme se refiere a una variante producida por el procesamiento diferencial de un transcrito primario de AND genómico, que resulta en más de un tipo de mRNA.

Como se usa en la presente, la modificación es con referencia a una modificación de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico e incluye eliminaciones, inserciones, y reemplazos de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Los métodos para la modificación de un polipéptido son de rutina para aquellos expertos en la técnica, tal como por el uso de metodologías recombinantes de ADN.

Como se usa en la presente, el término promotor significa una porción de un gen que contiene secuencias de ADN que proporcionan el enlace de la polimerasa de ARN y el inicio de la transcripción. Las secuencias de promotor se encuentran comúnmente, pero no siempre, en la región no codificadora 5' de los genes.

Como se usa en la presente, polipéptido o proteína aislado o purificado o porción biológicamente activa del mismo está sustancialmente libre del material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o tejido a partir del cual se deriva

la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. Las preparaciones se pueden determinar para estar sustancialmente libres si aparecen libres de impurezas fácilmente detectables cuando se determina por métodos estándar de análisis, tales como cromatografía de capa delgada (TLC), electroforesis de gel y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usados por aquellos de experiencia en la técnica para evaluar tal pureza, o suficientemente puro de manera que la purificación adicional no alteraría detectablemente las propiedades físicas y químicas, tales como actividades enzimáticas y biológicas de la sustancia. Los métodos para la purificación de los compuestos para producir compuestos sustancialmente químicamente puros se conocen para aquellos expertos en la técnica. Un compuesto sustancialmente químicamente puro, sin embargo, puede ser una mezcla de estereoisómeros. En tales casos, una purificación adicional pudiera incrementar la actividad específica del compuesto.

El término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas en las cuales la proteína se separa de componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de forma recombinante. En una modalidad, el término sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas de enzimas que tienen menos de alrededor de 30% (en peso seco) de proteínas sin enzimas (también referidas en la presente como una proteína contaminante), generalmente menos de alrededor de 20% de proteínas sin enzimas o 10% de proteínas sin enzimas o menos de

alrededor de 5% de proteínas sin enzimas. Cuando la proteína de enzimas se produce de forma recombinante, también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de alrededor o a 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína para enzimas.

Como se usa en la presente, el término sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos incluye preparaciones de proteínas de enzimas en las cuales la proteína se separa de precursores químicos u otros químicos que están involucrados en la síntesis de la proteína. El término incluye preparaciones de proteínas de enzimas que tienen menos de alrededor del 30% (en peso seco), 20%, 10%, 5% o menos de precursores químicos o productos químicos o componentes sin enzimas. Como se usa en la presente, sintético, con referencia a por ejemplo, una molécula sintética de ácido nucleico o un gen sintético o un péptido sintético, se refiere a una molécula de ácido nucleico o molécula de polipéptido que se produce por métodos recombinantes y/o por métodos de síntesis química.

Como se usa en la presente, la producción por medios recombinantes al usar métodos de ADN recombinante, significa el uso de los métodos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas codificadas por el ADN clonado.

Como se usa en la presente, vector (o plásmido) se refiere a elementos discretos que se usan para introducir un ácido nucleico heterólogo en células ya sea para expresión o replicación de los mismos. Los vectores típicamente permanecen episomales, pero se pueden diseñar para efectuar la integración de un gen o una porción del mismo dentro de un cromosoma del

000060

genoma. También se contemplan vectores que son cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales de levaduras y cromosomas artificiales de mamíferos. La selección y uso de tales vehículos es bien conocida para aquellos expertos en la técnica.

Como se usa en la presente, un vector de expresión incluye vectores que pueden expresar ADN que se ligan operativamente con las secuencias reguladoras, tales como las regiones del promotor, que pueden efectuar la expresión de tales fragmentos de ADN. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias del promotor y del terminador, y opcionalmente pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores de selección, un potenciador, una señal de poliadenilación, y los similares. Los vectores de expresión se derivan generalmente de un ADN de plásmido o viral, o pueden contener elementos de ambos. Así, un vector de expresión se refiere a un constructo de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que, con la introducción dentro de una célula hospedera apropiada, resulta en la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son bien conocidos para aquellos expertos en la técnica e incluyen aquellos que son replicables en células eucarióticas y/o células procarióticas y aquellos que permanecen en el episoma o aquellos los cuales se integran en el genoma de la célula hospedera.

Como se usa en la presente, vector también incluye "vectores de virus" o "vectores virales." Los vectores virales son virus preparados por ingeniería que se ligan operativamente

a genes exógenos para transferir (como vehículos o transportes) los genes exógenos dentro de las células.

Como se usa en la presente, ligado en operación u operativamente cuando se refiere a segmentos de ADN, significa que los segmentos se configuran de manera de funcionar en conjunto con sus propósitos pretendidos, por ejemplo, la transcripción inicia en el promotor y procede a través del segmento de codificación del terminador.

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

Como se usa en la presente, la actividad biológica se refiere a las actividades in vivo de un compuesto o las respuestas fisiológicas que resultan con la administración in vivo de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica así, abarca efectos terapéuticos y actividad farmacéutica de tales compuestos, composiciones y mezclas. Las actividades biológicas se pueden observar en sistemas in vitro

diseñados para probar o usar tales actividades. Así, para los propósitos en la presente una actividad biológica de una proteasa es su actividad catalítica en la cual se hidroliza un polipéptido.

Como se usa en la presente equivalente, cuando se refiere a dos secuencias de ácidos nucleicos, significa que las dos secuencias en cuestión codifican la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Cuando se usa equivalente al referirse a dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con solamente sustituciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad o función de la proteína o péptido. Cuando equivalente se refiere a una propiedad, la propiedad no necesita estar presente al mismo grado (por ejemplo, dos péptidos pueden mostrar tasas diferentes del mismo tipo de actividad enzimática), pero las actividades son sustancialmente las mismas.

Como se usan en la presente, "modular" y "modulación" o "alterar" se refiere a un cambio de una actividad de una molécula, tal como una proteína. Las actividades ejemplares incluyen, pero no se limitan a, actividades biológicas, tales como la transducción de señal. La modulación puede incluir un incremento en la actividad (es decir, sobre-regulación o actividad agonista) o una disminución en la actividad (es decir, sub-regulación o inhibición) o alguna otra alteración en una actividad (tal como un cambio en la periodicidad, frecuencia, duración, cinética u otro parámetro). La modulación puede ser dependiente del contexto y típicamente la modulación

se compara con un estado designado, por ejemplo, la proteína de tipo silvestre, la proteína en un estado constitutivo, o la proteína cuando se expresa en un tipo o condición de célula designada.

Como se usa en la presente, una composición se refiere a cualquier mezcla. Puede ser una solución, suspensión, líquido, polvo, pasta, acuoso, no acuoso o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa en la presente, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o más partes. La combinación puede ser dos o más partes separadas, tales como dos composiciones o dos colecciones, puede ser una mezcla de los mismos, tal como una mezcla sencilla de las dos o más partes, o cualquier variación de los mismos. Los elementos de una combinación se asocian o relacionan generalmente de forma funcional.

Como se usa en la presente, un kit es una combinación empacada que opcionalmente incluye otros elementos, tales como reactivos adicionales e instrucciones para uso de la combinación o elementos del mismo. En particular, para los propósitos en la presente, un "kit" se refiere a una combinación de enzima activable que degrada la matriz aquí contemplada, y otro artículo para un propósito que incluye, pero no se limita a, activación, administración, diagnóstico, y evaluación de una actividad o propiedad biológica. Los kits opcionalmente incluyen instrucciones para uso.

Como se usa en la presente, "enfermedad o trastorno" se refiere a una condición patológica en un organismo, que resulta

de una causa o condición que incluye, pero no se limita a, infecciones, condiciones adquiridas, condiciones genéticas, y caracterizada por síntomas identificables. Las enfermedades o trastornos de interés en la presente son aquellas que involucran componentes de la ECM.

Como se usa en la presente, una enfermedad o afección mediada por ECM es una en donde alguno o más componentes ECM están involucrados en la patología o etiología. Para los propósitos en la presente, una enfermedad o afección mediada por ECMs incluye aquellas que son provocadas por una deposición o acumulación creciente de uno o más componentes de ECM. Tales condiciones incluyen, pero no se limitan a, celulitis, síndrome de Duputyren, enfermedad de Peyronie, hombros congelados, cicatrices existentes tales como queloides, escleroderma y linfedema.

Como se usa en la presente, "tratamiento" de un sujeto con una enfermedad o afección significa que los síntomas del sujeto están parcial o totalmente aliviados, o permanecen estáticos después del tratamiento. Así, el tratamiento abarca la profilaxis, terapia y/o cura. La profilaxis se refiere a la prevención de una enfermedad potencial y/o una prevención del empeoramiento de los síntomas o avance de una enfermedad. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de un interferón modificado y composiciones aquí proporcionadas.

Como se usa en la presente, un agente farmacéuticamente efectivo, incluye cualquier agente terapéutico o agentes bioactivos, incluyendo pero no limitado a, por ejemplo, anestésicos, vasoconstrictores, agentes dispersantes, fármacos

terapéuticos convencionales, incluyendo fármacos de moléculas pequeñas y proteínas terapéuticas.

Como se usa en la presente, tratamiento significa cualquier forma en la cual los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad u otra indicación, se aminoran o se alteran benéficamente de otra manera.

Como se usa en la presente, efecto terapéutico significa un efecto que resulta del tratamiento de un sujeto que altera, típicamente mejora o aminora los síntomas de una enfermedad o afección o que curan una enfermedad o afección. Una cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad de una composición, molécula o compuesto el cual resulta en un efecto terapéutico que sigue a la administración a un sujeto.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" se refiere a un animal, incluyendo un mamífero, tal como un ser humano.

Como se usa en la presente, un paciente se refiere a un sujeto humano.

Como se usa en la presente, aminoramiento de los síntomas de una enfermedad o trastorno particular por un tratamiento, tal como por la administración de una composición farmacéutica u otro terapéutico, se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria, de los síntomas que se pueden atribuir a o asociarse con la administración de la composición o terapéutico.

Como se usan en la presente, prevención o profilaxis se refieren a métodos en los cuales se reduce el riesgo de desarrollar una enfermedad o afección.

Como se usa en la presente, una cantidad efectiva es la cantidad de un agente terapéutico, necesaria para prevenir, curar, aminorar, suspender o suspender parcialmente un síntoma de una enfermedad o trastorno.

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

Como se usa en la presente, una formulación de dosificación sencilla se refiere a una formulación para administración directa.

Como se usa en la presente, un "artículo de manufactura" es un producto que se hace y vende. Como se usa a lo largo de esta solicitud, el término se pretende para abarcar Enzimas activables que degradan matriz contenidas en los artículos de empaque.

Como se usa en la presente, fluido se refiere a cualquier composición que puede fluir. Fluidos abarcan así composiciones que están en la forma de semi-sólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras de tales composiciones.

Como se usa en la presente, un extracto celular o lisado se refiere a una preparación o fracción la cual se hace de una célula lisada o con disrupción.

Como se usa en la presente, animal incluye cualquier animal, tales como, pero no limitados a primates incluyendo humanos, gorilas, y monos; roedores, tales como ratones y ratas; aves, tales como pollos; rumiantes, tales como cabras,

vacas, venados, ovejas; ovinos, tales como credos y otros animales: los animales no humanos excluyen a los humanos como el animal contemplado. Las enzimas aquí proporcionadas son de cualquier fuente, animal, planta, procariótico y fúngico. La mayoría de las enzimas son de origen animal, incluyendo origen de mamíferos.

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

Como se usan en la presente, las formas en singular "un", "uno" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera. Así, por ejemplo, la referencia a un compuesto, que comprende "un dominio extracelular" incluye compuestos con uno o una pluralidad de dominios extracelulares.

Como se usan en la presente, los intervalos y cantidades se pueden expresar como "alrededor de" un valor o intervalo en particular. Alrededor de, también incluye la cantidad exacta. Así, "alrededor de 5 bases" significa "alrededor de 5 bases" y también "5 bases."

Como se usan en la presente, "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia posteriormente descritos sucede o no sucede, y que la descripción incluye casos en donde el evento o circunstancia sucede y casos en donde no lo hace. Por ejemplo, un grupo opcionalmente

sustituido significa que el grupo está no sustituido o está sustituido.

Como se usan en la presente, las abreviaturas para cualquiera de los grupos protectores, aminoácidos y otros compuestos son, a menos que se indique de otra manera, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas, o de la Comisión sobre Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB (ver, (1972) Biochem. 11 :1726).

B. LA MATRIZ EXTRACELULAR

Se proporcionan en la presente enzimas activables que degradan matriz (AMDE) que degradan uno o más componentes de proteína de la matriz extracelular (ECM) en una manera controlada por tiempo. En virtud de tal direccionado y la activación *in vivo* temporal, enfermedades y/o afecciones del ECM pueden tratarse. La enzima activable que degrada la matriz puede degradar cualquier componente de la ECM; la selección de enzima puede depender del componente direccionado y/o la enfermedad o afección particular a tratarse.

La ECM hace el tejido conectivo o intersticio que rodea los espacios fuera de las células y el sistema linfático y vascular, por ello propocionando soporte mecánico y estructural con y entre tejidos diferentes. El microambiente complejo y dinámico de la ECM representa un sistema de señalización y estructural dentro de tejidos conectivos, tal como la piel. Debido a la naturaleza compleja de ECM, puede servir a diversas funcionales tales como proporcionar soporte y anclaje para células, segregar tejidos, regular la comunicación intercelular, y factores de crecimiento celular secuestantes.

000040

Los defectos o cambios en la organización, o elaboración, de la ECM pueden contribuir a un número de enfermedades o afecciones. Por ejemplo, cambios en la síntesis, degradación y organización de fibras de colágeno contribuye a lipodistrofia (por ejemplo, celulosis) y linfedema.

La ECM está compuesta de proteínas estructurales fibrosas, tales como colágenos, polisacáridos, tales como proteoglicanos y ácido hialurónico, y proteínas de adhesión que ligan componentes de la matriz uno al otro y a las células. Algunos tejidos conectivos, tales como tendón y cartílago, se hacen principalmente de ECM. La ECM elaboran el tejido conectivo de la piel, sin embargo, también se distribuye con fibroblastos, vasos sanguíneos y otros componentes. La ECM también sirve como el espacio donde el agua y estos constituyentes disueltos se mueven desde el plasma sanguíneo a los linfáticos. El fluido intersticial es casi isosmótico con el citoplasma y es amortiguado con bicarbonato para proporcionar un ambiente extracelular que está a pH neutro.

1. Componentes de la ECM

La ECM (también llamada matriz intersticial) es una estructura dinámica tridimensional en complejo que contiene numerosas macromoléculas estructurales incluyendo proteínas fibrosas tales como colágenos, elastina y fibronectina, en las cuales los glicosiaminoglicanos (GAGs) forman una sustancia tipo gel hidratada. Los componentes de la ECM se producen por células residentes, típicamente fibroblastos o células de la familia de fibroblastos, y se secretan por medio de exocitosis donde interactúan con otros componentes de la ECM. Esta es la

variación en la cantidad relativa y la manera en la cual los componentes organizados y forman juntos lo que da para diversos tejidos conectivos tales como hueso, piel o córnea (Albert et al., "Cell Junctions, Cell Adhesions and the Matriz extracelular." Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishers, 1994. Página 972.)

a. Colágenos

El colágeno es el principal constituyente estructural de los tejidos conectivos, tales como la piel, y juega un papel en el desarrollo y mantenimiento de arquitectura de tejido, resistencia de tejido e interacciones célula-célula. Los colágenos incluyen una familia de proteínas estructuralmente relacionadas de la ECM que contiene uno o más dominios que tienen la conformación de una hélice triple de colágeno (Van der Rest et al. (1991) FASEB J., 5:2814-2823). Los colágenos que contienen una estructura de repetición Gly-X-Y, que permite que las cadenas de colageno se tuerzan en una estructura en hélice. Cada molécula de colágeno contiene tres cadenas torcidas en una estructura en hélice. Cada molécula de colágeno contiene tres cadenas torcidas una alrededor de la otra para formar una hélice triple, designada α1-α3. La estructura de hélice triple proporciona una alta resistencia mecánica a la molécula de colágeno. Hay al menos 27 tipos diferentes de colágenos, que difieren en secuencia de aminoácido y composición de cadena. Por ejemplo, dependiendo del tipo de colágeno, las tres cadenas que forman la hélice triple pueden las mismas o diferentes. Los colágenos pueden ser homotriméricos (es decir, las tres cadenas de polipéptido de la

hélice triple se hacen del mismo colágeno) o pueden ser heterotípicos (es decir los fibrilos hechos de más de un tipo de colágeno). Los colágenos pueden dividirse en varias familias dependiendo de la estructura que forman. Estas incluyen colágenos fibrilares (también llamados colágenos intersticiales; por ejemplo, Tipo I, II, III, V y XI) y colágenos no fibrilares tales como facit (por ejemplo, Tipo IX, XII, XIV), cadena corta (por ejemplo, Tipo VIII, X), mebrana de basamento (por ejemplo, Tipo IV), y otros colágenos (por ejemplo, Tipo VI, VII, y XIII). La Tabla 2 enseguida establece tipos de colágeno comunes y su ubicación representativa (Van der Rest et al. (1991) FASEB J., 5:2814-2823); www.collagenlife.com/page_1167323108078.html; www.indstate.edu/thcme/mwking/extracellularmatrix.html).

Entre los colágenos intersticiales, moléculas de colágeno asociadas para formar fibrilos grandes, que tienen un patrón de banda distintivo. El patrón de banda resulta del traslape entre las adjacent molecules. La resistencia de fibras de colágeno se basa en la multiplicidad de ligaduras intra- e intermoleculares de las fibras de colágeno que forman la red de fibras de colágeno densa de tejidos conectivos. El más común de los colágenos fibrilares incluye colágenos tipo I, II y III. El colágeno Tipo I se encuentra en la mayoría de los tejidos conectivos tales como piel, hueso, tendón y córnea, y se hace de dos cadenas α1(I) y una cadena α2(I) ($[\alpha1(I)]_2\alpha2(I)$). El colágeno tipo II es homotrimérico ($[\alpha1(II)]_3$) y se encuentra predominantemente en el cartílago. El golágeno tipo III también es homotrimérico ($[\alpha1(III)]_3$) y se encuentra predominantemente

en la piel y los vaso.

No todos los colágenos forman redes de fibrilo. Por ejemplo, el colágeno de tipo IV de membrana de basamento es no fibroso y tienen interrupciones no en hélice, que actúa como una bisagra que da a la molécula mayor flexiblidad. De esta manera, el colágeno tipo IV forma una lámina hecha por red de malla de filamentos en vez de por fibrilos lineales.

La proteína más abundante de la piel es el colágeno, que se hace primariamente del tipo I (80-85%) y tipo III (8-11%) del colágeno total de la piel. El colágeno de tipo I se asocia con el colágeno tipo III para formar las principales fibras de colágeno de la dérmis. La resistencia a la tensión de la piel se debe predominantemente a estas moléculas de colágeno fibrilares, que se ensamblan en microfibrilos en una configuración laterla cabeza a cola y estratificada lado a lado. Las moléculas de colágeno se vuelven reticuladas a las moléculas de colágeno adyacentes, creando resistencia y estabilidad adicional en fibras de colágeno. Por ejemplo, el colágeno de tipo V también se asocia con fibras de colágeno tipo I/III, y regula el diámetro del fibrilo. Otros tipos de colágeno en la piel incluyen, por ejemplo, el tipo IV, tipo VI, tipo VII, tipo XII, tipo XIV y tipo XVII.

Tabla 2: Tipos de Colágenos

Tipo	**Composición de la Molécula**	**Tejido representativo**
Colágenos Fibrilares		
I	$[\alpha1(I)]_2[\alpha2(I)]$	Piel, hueso, tendón, dentina, ligamentos, tejido intesticial
II	$[\alpha1(II)]_3$	Cartílado, humor vítreo

000079

III	$[\alpha1(III)]_3$	Piel, músculo, vasos sanguíneos; frecuentemente asociado con tipo I
V	$[\alpha1(V)][\alpha2(V)][\alpha3(V)]$	Similar al tipo I, también cultivo celular, tejidos fetales; asociado con Tipo I
XI	$[\alpha1(XI)][\alpha2(XI)][\alpha3(XI)]$	Cartílago, cartílago invertebrado y esmalte óseo
Colágenos no fibrilares		
IV	$[\alpha1(IV)]_2[\alpha2(IV)]$	Membrana de basamento
VI	$[\alpha1(VI)][\alpha2(VI)][\alpha3(VI)]$	Tejidos más intesticiales; asociados con el tipo I
VII	$[\alpha1(III)]_3$	Epitelio
VIII	$[\alpha1(VIII)]_3$	Desconocido, algunas células endoteliales
IX	$[\alpha1(IX)][\alpha2(IX)][\alpha3(IX)]$	Cartílago; asociados con Tipo II
X	$[\alpha1(X)]_3$	Cartílago heterotrófico y mineralizante
XII	$[\alpha1(XII)]_3$	Ligamentos, tendones y esmalte de dientes; interactúa con tipos I y III

b. Elastina

Una red de fibras elásticas en la ECM proporciona flexibilidad a los tejidos que requieren resilencia para retroceder después de estirarse, tal como la piel, arterias y pulmones. El componente principal de las fibras elásticas es la molécula de elastina, que crea reticulaciones para moléculas de elastina adyacentes. Estas moléculas forman un núcleo de fibras

elásticas y se cubren por fibrilina, una glicoproteína grande que se enlaza a elastina y es importante para la integridad de las fibras elásticas.

C. Fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína que existe como un par de dos subunidades grandes unidas por un par de enlaces disulfuro cerca de las tterminales carboxi. Cada subunidad contiene dominios funcionalmente distintos específicos para otras macromoléculas de matriz y receptores en la superficie de las células. Por ejemplo, los dominios distintos de fibronectina unen colégano (dominios separados para tipos I, II y III), heparina, fibrina y receptores de superficie celular tales como integrinas. La fibronectina se presenta tanto en plasma como tejido. En el tejido, la fibronectina funciona para ligar en conjunto diferentes tipos de moléculas ECM y células. También contiene un dominio enlazado a la célula importante hecho de los tres aminoácidos, Arg-Gly-Asp (RGD), que se reconoce por receptores de integrina en las membranas de plasma de células. El enlace de moléculas de fibronectina a receptores de integrina en células lleva a la estimulación de las trayectorias de señalización que promueven la unión, migración y diferenciación de célula. Estas características permiten a la fibronección jugar un papel importante en la adhesión celular y comunicar señales entre las células y los componentes de la ECM.

d. Glicosaminoglicanos (GAGs)

Las GAGs son cahdenas de polisacáridos no ramificadas hechas de unidades de disacáridos repetidas que son fuertemente

hidrofílicas. Las GAGs son cargadas altamente de forma negativa y por lo tanto atraen Na^+ osmóticamente activo, lo que causa que grandes cantidades de agua se saquen en su estructura para mantener la ECM hidratada. Las GAG, tales como sulfato de dermatan, contienen típicamente múltiples cadenas de glicosaminoglicano de 70-200 azúcares de largo (formados de unidades de disacárido repetidas) que ramifican desde un núcleo de proteína lineal. Esto resulta en GAGs que ocupan un volumen enorme con relación a su masa y forman geles a muy bajas concentraciones. La naturaleza hidrofílica de las GAGs causa una presión de hinchazón, o turgencia, que permite que la ECM soporte fuerzas de compresión.

En la ECM, las GAGs se unen a las proteínas ECM para formar proteoglicanos o, en el caso de ácido hialurónico (también llamado hialuronano), existen como un componente de matriz no proteoglicano. Los proteoglicanos extracelulares son moléculas grandes, altamente hidratadas, que ayudan a amortiguar las células en la ECM. Los glicosaminoglicanos tales como hialuronano contribuyen a la "sustancia molida" al crear una barrera al flujo de fluido de volumen a través de la matriz de colágeno intersticial por medio de su viscosidad y agua de hidratación. Las GAGs de proteoglicanos y no proteoglicanos se asocian para formar complejos poliméricos grandes en la ECM. Estas se asocian una con la otra, y también con proteínas fibrosas tales como colágeno.

i. Proteoglicanos

Hay tres tipos principales de GAGs que forman proteoglicanos de la ECM, incluyendo sulfato de dermatan y

sulfato de condroitina, heparina y sulfato de heparano, y sulfato de ceratan. Generalmente, un proteoglicano es 95% carbohidrato en peso, típicamente en la forma de cadenas GAG no ramificadas largas. Además de proporcionar espacio hidratado alrededor de las células, los proteoglicanos también regulan el tráfico de moléculas y células, enlazan moléculas de señalización jugando por ello un papel en la activación celular, y enlaza otras proteínas secretadas tales como proteasas e inhibidores de proteasas para regular las actividades de proteínas secretadas (Albert et al., "Cell Junctions, Cell Adhesions and the Matriz extracelular." Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishers, 1994. pp. 972-978.) Por ejemplo, las cadenas de sulfato de heparina de proteoglicanos enlazan a varios factores de crecimiento diferentes, incluyendo factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), ayudándolos a enlazarse a sus receptores de superficie específicos.

El agrecano es un proteoglicano, que contiene principalmente GAGs de sulfato de condroitina y sulfato de heparano, y se encuentra típicamente en agregados grandes que forman el cartílago con hialuronano para proporcionar soporte mecánico. La decorina es otra GAG ejemplar de tejido conectivo hecha primariamente de GAGs de sulfato de condroitina y sulfato de dermatan. Se enlaza a fibrilos de colágeno tipo I. el perlecan y betaglicano son otros proteoglicanos ejemplares de la ECM. No todos los proteoglicanos se asocian con la ECM: por ejemplo, serglicina se asocia con vesículas secretoras donde ayuda a empacar y almacenar moléculas secretoras, y sindecanos

se encuentran en la superficie celular y actúan como co-receptores (Albert et al., "Cell Junctions, Cell Adhesions and the Matriz extracelular." Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishers, 1994. pp. 972-978.)

Los proteoglicanos de sulfato de heparan (HSPGs) son macromoléculas ubicuas asociado con la superficie celular y matriz celular (ECM) de un amplio rango de células de tejidos vertebrados e invertebrados (Wight, T. N., Kinsella, M. G., and Qwarnstromn, E. E. (1992) Curr. Opin. Cell Biol, 4,793-801; Jackson, R. L., Busch, S. J., and Cardin, A. L. (1991) Physiol. Rev., 71,481-539; Wight, T. N. (1989) Arteriosclerosis, 9,1-20; Kjellen, L., and Lindahl, U. (1991) Annu. Rev. Biochem., 60,443-475; y Ruoslahti, E., and Yamaguchi, Y. (1991) Cell, 64,867-869). La estructura HSPG básica consiste de un núcleo de proteína al cual se enlazan covalentemente varias cadenas de sulfato de heparano lineales. Las cadenas de polisacárido se componen típicamente de unidades de D-glucosamina y hexurónicas repetidas que están sustituidas hasta una extensión variable con porciones de sulfato ligadas a N y O y grupos acetilo ligados a N. los estudios en el involucramiento de moléculas ECM en el enlace celular, crecimiento y diferenciación revela un papel central de HSPGs en morfogénesis embriónicos, angiogénesis, metastasis, crecimiento de neuritas y reparación de tejido. Las cadenas de sulfato de heparano (HS), que son únicas en su capacidad para enlazar una multitud de proteínas, asegura que una amplia variedad de moléculas efectoras se pegen a la superficie celular. Las HSPGs también son componentes prominentes de los vasos sanguíneos. En los vasos grandes están

000079

mayormente concentradas en el íntimo y revestimiento medio, mientras que en los capilares se encuentran principalmente en la membrana de base subendotelial donde soportan células endoteliales proliferantes y migrantes y estabilizan la estructura de la pared capilar. La capacidad de las HSPGs para interactuar con macromoléculas ECM tales como colágeno, laminina y fibronectina, y con diferentes sitios de enlace en las membranas de plasma sugiere un papel clave para este proteoglicano en el auto-ensamble e insolubilidad de componentes ECM, así como en adhesión y locomoción celular.

ii. Ácido hialurónico

El ácido hialurónico (HA; también llamado hialuronano) es una GAG grande que atraer agua, y cuando se enlaza al agua existente en una forma tipo gel, viscosa. De esta manera, el HA sirve como un lubricante, manteniendo juntos los tejidos conectivos tipo gel. El HA es un polímero de disacáridos (algunas veces tanto como 25,000 repeticiones en longitud) y está compuesto de unidades de repetición de dos azúcares sencillos modificados: ácido glucurónico y N-acetil glucosamina. El HA es parte de la ECM de muchos tejidos conectivos. El HA se encuentra en la cantidad más grande en la piel con casi el 50% del HA del cuerpo encontrado en la piel. El HA proporciona humedad continua a la piel al enlazar agua. La producción reducida de HA, tal como por la edad, resulta en piel arrugada y poco saludable.

El HA, principalmente a través de su receptor CD44, también funciona para regular el comportamiento celular durante el desarrollo y morfogénesis embriónica, cicatrización de

heridas, reparación y regeneración, inflamación y progreso e invasión de tumor (Harada et al. (2006) J. Biol. Chem., 8:5597-5607). El HA se desgrada por hialuronidasas. Los productos de degradación de HA pueden encontrarse en cantidades incrementadas en tejidos dañados o en crecimiento, y en una variedad de afecciones inflamatorias. Los fragmentos de HA promueven la angiogénesis y pueden estimular la producción de citoquina por macrófagos y células dendríticas en tejido lesionado y transplante de piel.

2. Histología de la piel

La piel está compuesta de varias capas distintas, principalmente la epidermis y dermis. La epidermis es un epitelio especializado derivado del ecotodermo, y debajo está la dermis, que es un derivado del mesodermo y es un tejido conectivo denso vascular. Estas dos capas se adhieren firmemente una a la otra y forman una región que varía en grosor general desde aproximadamente 0.5 hasta 4 mm en áreas diferentes del cuerpo. Debajo de la dermis está una capa de tejido conectivo suave, que varía desde areolar hasta adiposo en carácter. Se refiere como la hipodermis, pero típicamente se considera que no es parte de la piel. La dermis se conecta a la hipodermis al conectar fibras de tejido que pasan desde una capa a la otra.

a. La Epidermis

La epidermis es la capa de piel directamente arriba de la dermis, y es la capa de superficie de la piel. La función principal de la epidermis es actuar como una barrera protectora contra la pérdida de agua, lesión química y patógenos

000080

invasores. La epidermis es una capa delgada de aproximadamente quince capas de células que es de alrededor de 0.1 hasta 1.5 milímetros de grosor compuestas primariamente de queratinocitos (Inlander, Skin, New York, N. Y.: People's Medical Society, 1-7 (1998)). La epidermis por sí misma está dividida en varias capas (por ejemplo, estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido, estrato córneo) con base en el estado de diferenciación de los queratinocitos. Los queratinocitos se originan en la capa basal de células madre de queratinocitos. Ya que los queratinocitos crecen y se dividen, pueden experimentar una diferenciación que alcanza eventualmente el estrato córneo donde forman una capa de células altamente queratinizadas, aplanadas, enucleadas, llamadas células escamosas (también llamadas corneocitos). Además de hacerse de corneocitos, el estrato córneo también contiene sebo. El sebo se secreta por glándulas sebaseas, que se encuentran usualmente en las áreas cubiertas de pelo conectadas a los folículos de cabello.el sebo es una capa ligeramente ácida que ayuda a mantener los corneocitos juntos y con humedad. Esta acidez se debe a la presencia de aminoácidos anfotéricos, ácido láctico y ácidos grasos que hacen el sebo. De esta manera, el pH de la superficie de la piel está normalmente entre 5 y 6, típicamente alrededor de 5.5. El sebo actúa para impermeabilizar el pelo y la piel, y los protege de que se sequen, quiebren y rompan, y también inhibe el crecimiento de microorganismos en la piel. El término "manto ácido" se refiere a la presencia de las sustancias solubles en agua en la mayoría de las regiones de la piel.

000082

b. La Dermis

El tejido conectivo de la piel se llama la dermis. La dermis es de 1.5 hasta 4 mililitros de espesor. En la piel, la dermis contiene componentes ECM; los componentes de proteína principal son colágeno y elastina. La dermis también es el hogar para la mayoría de las estructuras de la piel, incluyendo sudor y glándulas sebáseas que secretan sustancias a través de las aberturas en la piel llamadas poros, o comedones, folículos capilares, terminaciones nerviosas, y vasos sanguíneos y linfáticos (Inlander, Skin, New York, N. Y.: People's Medical Society, 1-7 (1998)).

c. La Hipodermis

Bajo la dermis está la hipodermis, que es una capa grasa y es la capa más profunda de la piel. Esta actúa como un aislante para la conservación del calor corporal y como un absorbente de golpes para protección de los órganos (Inlander, Skin, New York, N. Y.: People's Medical Society, 1-7 (1998)). Además, la hipodermis también almacena grasa para reservas de energía.

3. Enfermedades de la ECM

Ciertas enfermedades y afecciones resulta de defectos o cambios en la arquitectura de la matriz extracelular debido a la expresión o producción aberrante de los componentes de ECM. Por ejemplo, en algunas condiciones inflamatorias tales las que ocurren durante la cicatrización de heridas, se secretan las citoquinas, que estimulan los fibroblastos a secretar componentes de ECM tales como colágeno. Los componentes de ECM acumulan y se depositan localmente, lo que resulta en un amplio rango de afecciones fibróticas. La desposición de matriz es una característica

00183

frecuente en muchas enfermedades inflamatorias crónicas y en otras enfermedades y afecciones. Se incluyen entre estas las afecciones de enfermedad mediada por colágeno tal como, pero no se limita a, cicatrices tales como queloides y cicatrices hipertróficas, síndrome de Duputyren, enfermedad de Peyronie y linfedema. La celulosis también es una enfermedad prominente de la ECM que, además de incrementar la adipogenicidad, se caracteriza por alteraciones en la matriz de tejido conectivo que resulta en una red de septo fibroso anormal de colágeno (Rawlings et al. (2006) Int. J Cos. Science, 28:175-190).

Las enfermedades y afecciones de la ECM que se caracterizan por la expresión aberrante o sobreproducción de componentes de matriz, resulta en su acumulación y deposición indeseada. En virtud de la activación temporal de tales enzimas durante la administración in vivo, el tratamiento de tales enfermedades y afecciones se regula para limitar la degradación enzimática de los componentes de matriz. Por ejemplo, al limitar la duración de la acción de degradación de matriz, se minimizan los efectos secundarios indeseados tales como degradación de proteína incontrolada.

C. Enzimas que degradan matriz

Se proporcionan en la presente composiciones, combinaciones y recipientes que contienen enzimas activables que degradan matriz, y métodos para usar las enzimas activables que degradan matriz para tratar enfermedades o afecciones mediadas por ECM. Las enzimas que degradan matriz degradan los componentes de la proteína o glicoproteínas de la ECM, que incluye, pero no se limita a, colágeno, elastina, fibronectina y proteoglicanos. En virtud de su

capacidad para desdoblar uno o más componentes ECM, enzimas activables que degradan matriz proporcionadas en la presente pueden usarse para modificar la matriz de tejidos, particularmente aquellos que exhiben defectos o cambios estructurales debido al exceso de una o más proteína ECM o acumulación indeseada de tejido fibroso rico en una o más proteínas ECM, tal como colágeno. De esta manera, tales enzimas son útiles para tratar enfermedades o afecciones en las cuales están involucradas las proteínas ECM.

Entre las enzimas que degradan matriz están las proteasas y glicosil hidrolasas. Por lo tanto, las enzimas que degradan matriz incluyen proteínas que son enzimas que degradan la proteína que reconocen secuencias de aminoácidos o un sustrato polipéptido dentro de una proteína objetivo y también hidrolasas que reconocen enlaces no péptidos tales como enlaces de éster o grupos glicosilo. Entre las proteasas están las exoproteasas de las familia serina, cisteína, aspártico y metalo-proteasa. Una vez que se reconoce la secuencia del sustrato, las proteasas catalizan la hidrólisis o desdoblamiento de una proteína objetivo. Tal hidrólisis de una proteína objetivo, dependiendo de la ubicación del enlace péptido dentro del contexto de secuencias de longitud completa de la secuencia objetivo, pueden inactivar, o en algunos casos activar, un objetivo.

Varios tipos distintos de mecanismos catalíticos se usan por proteasas (Barret et al. (1994) Meth. Enzymol. 244:18-61; Barret et al. (1994) Meth. Enzymol 244:461-486; Barret et al. (1994) Meth. Enzymol. 248:105-120; Barret et al. (1994) Meth. Enzymol. 248:183-228). Con base en su mecanismo catalítico, las proteasas que desdoblan enlaces péptidos se subdividen en serina-, cisteína-,

85

aspártico-, treonina- y metalo- proteasas. Las péptidasas tipo serina tienen un residuo de serina involucrado en el centro activo, peptidasas tipo cisteína que tienen un residuo de cisteína, peptidasas tipo treonina que tienen un residuo treonina, y metalo- peptidasas que usan iones de metal en el mecanismo catalítico. La actividad catalítica de las proteasas se requiere para desdoblar el sustrato objetivo. La serina y metaloproteinasas son más activas a pH neutro, mientras la cisteína y proteasas ásparticas, encontradas predominantemente en lisosomas, tienen pH ácido óptimo. De esta manera, las proteasas lisosomales incluyen proteasas de las familias de cisteína y proteasa aspárica. Otras familias de enzimas incluyen las hidrolasas tales como esterasas que actúan en los enlaces éster y glicolasas que hidrolisan compuestos O- o S-glicosilo o compuestos N-glicosilos. La gtlicosil hidrolasa ejemplar es heparanasa.

Las enzimas que degradan matriz ejemplares se establecen en la TABLA 3 (ver por ejemplo, Chapman et al., Am J. Physiol Heart Circ. Physiol. (2004) 286: 1-10; Iozzo RV, Proteoglycans: Structure, biology, and Molecular Interactions, CRC Press (2000), pp. 94-96; Owen et al. (1999) J. Leuk. Biol., 65: 137-150; Buhling et al. (2004) Eur. Respir. J., 23:620-628; Thomas Kreis and Ronald Cale, Matriz extracelular, Anchor and Adhesion Proteins, Oxford University Press (1999) pp. 515-523; Ian M. Clark and Gillian Murphy. "Matrix Proteinases," en Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism, Academic Press (2006), pp. 181-198; Buck et al. (1992) Biochem J., 282:273-278). Los identificadores de secuencia (SEQ ID NO) para la secuencia de nucleótido (mARN) y secuencia de aminoácido codificada del polipéptido precursor para cada una de

las proteasas ejemplares se describen en la Tabla. Los identificadores de secuencia (SEQ ID NO) para la secuencia de aminoácido de la proproteína para cada una de las proteasas ejemplares también se describen en la Tabla, así como las posiciones de aminoácido dentro de la proteína que corresponde al propéptido. También existen variaciones entre las variantes alélicas y de especies y otras variantes conocidos en la técnica, y tales variantes también se contemplan para uso como enzimas activables. La Tabla también establece sustratos objetivo ECM ejemplares para cada enzima. La referencia a tales sustratos es para referencia y ejemplificación, y no se pretende que represente una lista exhaustiva de todos los sustratos objetivo. Alguien de experiencia en la técnica conoce o puede determinar empíricamente los sustratos objetivo ECM para la enzima deseada usando ensayos de rutina, justo como cualquiera descrito en la presente.

Las enzimas que degradan matriz pueden producirse o aislarse por cualquier método conocido en la técnica incluyendo aislado de fuentes naturales, aislado de proteínas recombinantemente producidas en células, tejidos y organismos y por métodos recombinantes y por métodos que incluyen etapas in silico, métodos sintéticos y cualquiera de los métodos conocidos por aquellos de habilidad en la técnica. Típicamente, las enzimas se producen o aíslan en una forma inactiva. La activación condicional puede alcanzarse como se describe enseguida.

TABLA 3: Enzimas que Degradan matriz

Proteasa	Sustrato	Código de acceso al banco de datos de la enzima (EC) www.expasy.ch/sprot/enzyme.html	GenBank No.	SEQ ID NO		
				Precursor		maduro
				nt	aa (aa de secuencia de señal(ss); aa de pro-péptido(pp)	aa
Serina Proteasa						
Elastasa pancreática (PE1; Elastasa-1)	elastina	3.4.21.36	Q9UNI1; NM_001971	19	20 (ss aa 1-8; pp aa 9-18)	21
Elastasa-2A	elastina	3.4.21.71	P08217; NM_033440	22	23 (ss aa 1-16; pp aa 17-28)	24
Elastasa-2B	elastina	3.4.21.71	P08218; NM_015849	25	26 (aa aa 1-16; pp aa 17-28)	27
Neutrofil elastasa (NE; leucocito elastasa; elastasa-2)	Elastina, fibronectina, laminina, colágeno tipo II, IV, VI, proteoglicanos	3.4.21.37	P08246 NM_001972	28	29 (ss aa 1-17; pp aa 28-29)	30
Proteinasa-3 (PR-3; mieloblastina)	elastina, fibronectina, laminina, vitronectina, tipo colágeno	3.4.21.76	P24158 NM_002777	31	32 (ss aa 1-25; pp aa 26-27, 249-256)	33

TABLA 3: Enzimas que Degradan matriz

Proteasa	Sustrato	Código de acceso al banco de datos de la enzima (EC) www.expasy.ch/sprot/enzyme.html	GenBank No.	SEQ ID NO		
				Precursor		maduro
				nt	aa (aa de secuencia de señal(ss); aa de pro-péptido(pp)	aa
	IV					
Elastasa vascular endógena (EVE; elastasa de tejido; factor D de complemento)	elastina	3.4.21.46	S73894 (*Rattus sp.*)	34	35 (ss aa 1-20; pp aa 21-25)	36
Catepsina G	Tipo IV colágeno, laminina, fibronectina, proteoglicano, elastina	EC 3.4.21.20	P08311 NM_001911	37	38 (ss aa 1-18; pp aa 19-20)	39
Quimasa de mastocito	Tipo IV colágeno, laminina, fibronectina, proteoglicano	3.4.21.39	P23946 NM_001836	40	41 (ss aa 1-19; pp aa 20-21)	42
Triptasa de mastocito	Fibronectina, fibrinógeno, colágeno tipo IV, proteoglicano	3.4.21.59	Q9BZJ3 NM_012217	43	44 (ss aa 1-18; pp aa 19-30)	45
Plasmina	Proteoglicano, fibronectina, laminina	3.4.21.7	P00747 NM_000301	46	47 (ss aa 1-19; pp aa 20-97)	48
Trombina	proteoglicano	3.4.21.5	P00734 NM_000506	49	50 (ss aa 1-24; pp aa 25-43)	51
Granzima B	proteoglicano	3.4.21.79	P10144 NM_004131	52	53 (ss aa 1-18; pp aa 19-20)	54
Cisteína Proteasa						
Catepsina S	Elastina, colágeno	EC 3.4.22.27	P25774 NM_004079	55	56 (ss 1-16; pp 17-114)	57
Catepsina K	elastina, colágeno I y III	EC 3.4.22.38	P43235 NM_000396	58	59 (ss aa 1-15; pp aa 16-114)	60
Catepsina L	elastina, colágeno I y	EC 3.4.22.15	P07711	61	62 (ss aa 17; pp	1

TABLA 3: Enzimas que Degradan matriz

Proteasa	Sustrato	Código de acceso al banco de datos de la enzima (EC) www.expasy.ch/sprot/enzyme.html	GenBank No.	SEQ ID NO		
				Precursor		maduro
				nt	aa (aa de secuencia de señal(ss); aa de pro-péptido(pp)	aa
	IV				aa 18-113)	
Catepsina B	Colágeno IV, laminina, fibronectina	EC 3.4.22.1	P07858 NM_001908	63	64 (ss aa 1-17; pp aa 18-79)	65
Catepsina C	Proteoglicanos (decorina)	EC 3.4.14.1	P53634 NM_001814	178	179 (ss aa 1-24; pp aa 135-230)	180
Catepsina H	fibronectina	EC 3.4.22.16	P09668 X16832	66	67 (ss aa 1-22; pp aa 23-97)	68
Catepsina F	Fragmentos de colágeno	EC 3.4.22.41	Q9R013 NM_019861 (*Mus musculus*)	69	70 (ss aa 1-19; pp aa.20-248)	71
Catepsina F	Fragmentos de colágeno	EC 3.4.22.41	Q9UBX1 NM_003793	181	182 (ss aa 1-19; pp 20-270)	183
Catepsina O	fibrinógeno	EC 3.4.22.42	Q8BM88 NM_177662 (*mus musculus*)	72	73 (aa aa1-23; pp aa 24-98)	74
Catepsina O	fibrinógeno	EC 3.4.22.42	P43234 NM_001334	184	185 (ss aa 1-23; pp aa 24-107)	186
Catepsina R		EC3.4.22.-	Q9JIA9 NM_020284 (*mus musculus*)	75	76 (ss aa 1-17; pp aa 18-114)	77
Catepsina V (Catepsina L2)	colágeno	EC 3.4.22.43	O60911 NM_001333	187	188 (ss aa 1-17; pp aa 18-113)	189
Catepsina W		EC 3.4.22.-	P56202 NM_001335	78	79 (ss aa 1-21; pp aa 22-127)	80
Calpaína 1	fibronectina, vitronectina, proteoglicanos	EC 3.4.22.52	Subunidad grande de Calpaína 1: P07384 NM_005186	81		82

TABLA 3: Enzimas que Degradan matriz

Proteasa	Sustrato	Código de acceso al banco de datos de la enzima (EC) www.expasy.ch/sprot/enzyme.html	GenBank No.	SEQ ID NO		
				Precursor		maduro
				nt	aa (aa de secuencia de señal(ss); aa de pro-péptido(pp)	aa
Calpaína 2	Fibronectina, vitronectina, proteoglicanos	EC3.4.22.53	Subunidad grande de calpaína 2: P17655 NM_001748	83	84 (aa 1 metionina inicial)	85
		Subunidad 1 pequeña de calpaína (asociada con subunidades grandes de Calpaína 1 y 2) P04632 NM_001749		86		87
Legumaína		EC 3.4.22.34	Q99538 NM_005606	190	191 (ss aa 1-17; pp aa 324-433)	192
Catepsina Z (catepsina X)		EC 3.4.22.-	Q9UBR2 NM_001336	193	194 (ss aa 1-23; pp aa 24-61)	195
Proteasa Aspártica						
Catepsina D	proteoglicano	EC 3.4.23.5	P07339 NM_001909	88	89 (ss aa 1-18; pp aa 19-64)	90
Catepsina E	proteoglicano	EC 3.4.23.34	P14091 Isoforma a NM_001910	91	92 (ss aa 1-17; pp aa 18-53)	93
			Isoforma b NM_148964	94	95 (ss aa 1-17; pp aa 18-53)	96
Metalo-Proteasa						
MMP-1 (colagenasa -1)	Colágeno I, II, III, VII, VIII, X, XI, gelatina, proteoglicano, fibronectina, glicoproteína	3.4.24.7	P03956, NM_002421	97	98 (ss aa 1-19; pp aa 20-99)	99
MMP-8 (colagenasa -2)	Colágeno I, II, III, agrecano	3.4.24.34	P22894 NM_002424	100	101 (ss aa 1-20; pp aa 21-100)	102

TABLA 3: Enzimas que Degradan matriz

Proteasa	Sustrato	Código de acceso al banco de datos de la enzima (EC) www.expasy.ch/sprot/enzyme.html	GenBank No.	SEQ ID NO		
				Precursor		maduro
				nt	aa (aa de secuencia de señal(ss); aa de pro-péptido(pp)	aa
MMP-13 (colagenasa -3)	Colágeno I, II, III, IV, VI, IX, X, XIV, gelatina, proteoglicano, fibronectina, glicoproteína	3.4.24.-	P45452 NM_002427	103	104 (ss aa 1-19; pp aa 20-103)	105
MMP-18 (colagenasa -4)	colágeno I	3.4.24.-	*Xenopus laevis* O13065	106	107 (ss aa 1-17; pp aa 18-99)	108
MMP-2 (gelatinasa A)	gelatinas, colágeno I, II, III, IV, V, VII, X, XI, elástina, fibronectina, laminina, proteoglicano, glicoproteína	3.4.24.24	P08253 NM_004530	109	110 (ss aa 1-29; pp 30-109)	111
MMP-9 (gelatinasa B)	gelatina, colágeno I,V, V; VI, XIV, elástina, laminina, proteoglicano, glicoproteína	3.4.24.35	P14780 NM_004994	112	113 (ss aa 1-19; pp aa 20-93)	114
MMP-3 (estromelisina -1)	fibronectina, elastina, laminina, gelatina, proteoglicano, glicoproteína, colágeno III, IV, V, VII, IX, X, XI	3.4.24.17	P08254 NM_002422	115	116 (ss aa 1-17; pp aa 18-99)	117
MMP-10 (estromelisina -2)	colágeno III, IV, V, elastina, gelatina, fibronectina, agrecano	3.4.24.22	P09238 NM_002425	118	119 (ss aa 1-17; pp aa 18-98)	120
MMP-11 (estromelisina-	Gelatina, fibronectina,	3.4.24.-	P24347 X57766	121	122 (ss aa 1-31;	123

TABLA 3: Enzimas que Degradan matriz

Proteasa	Sustrato	Código de acceso al banco de datos de la enzima (EC) www.expasy.ch/sprot/enzyme.html	GenBank No.	SEQ ID NO		
				Precursor		maduro
				nt	aa (aa de secuencia de señal(ss); aa de pro-péptido(pp)	aa
3)	laminina, colágeno IV				pp aa 32-97)	
MMP-7 (matrilsina)	fibronectina, laminina, elastina, gelatina, colágeno I, IV, proteoglicano, glicoproteína	3.4.24.23	P09237 NM_002423	124	125 (ss aa 1-17; pp aa 18-94)	126
MMP-26 (matrilsina-2)	colágeno IV, fibronectina, gelatina, proteoglicano	3.4.24.-	Q9NRE1 NM_021801	127	128 (ss aa 1-17; pp aa 18-89)	129
MMP-12 (metaloelastasa)	elastina, fibronectina, laminina, colágeno I, IV, V, gelatina, proteoglicano, glicoproteína	3.4.24.65	P39900 NM_002426	130	131 (ss aa 1-16; pp aa 17-105)	132
MMP-14 (MT1-MMP)	colágeno I, II, III, gelatina, agrecano, fibronectina, laminina, proteoglicano, glicoproteína	3.4.24.80	P50281 NM_004995	133	134 (ss aa 1-20; pp aa 21-111)	135
MMP-15 (MT2-MMP)	agrecano, fibronectina, laminina, glicoproteína	EC 3.4.24.-	P51511 NM_002428	136	137 (ss aa 1-41; pp aa 42-131)	138
MMP-16 (MT3-MMP)	Colágeno III, fibronectina, laminina, gelatina, proteoglicano	EC 3.4.24.-	P51512 NM_005941	139	140 (ss aa 1-31; pp aa 32-119)	141
MMP-17 (MT4-MMP)	gelatina	EC 3.4.24.-	Q9ULZ9 AB021225	142	143 (ss aa 1-38; pp aa 39-128)	144
MMP-24 (MT5-MMP) Transmembrana	fibronectina, gelatina, proteoglicano	EC 3.4.24.-	Q9Y5R2 NM_006690	309	310 (ss aa 1-52; pp aa 53-155)	311

TABLA 3: Enzimas que Degradan matriz

Proteasa	Sustrato	Código de acceso al banco de datos de la enzima (EC) www.expasy.ch/sprot/enzyme.html	GenBank No.	SEQ ID NO		
				Precursor		maduro
				nt	aa (aa de secuencia de señal(ss); aa de pro-péptido(pp)	aa
MMP-25 (MT6-MMP) ancla GPI	colágeno IV, gelatina, fibronectina, proteoglicano	EC 3.4.24.-	Q9NPA2 NM_022468	312	313 (ss aa 1-21; pp aa 22-107)	314
MMP-19	colágeno IV, gelatina, laminina, agrecano, fibronectina, glicoproteína	EC 3.4.24.-	Q99542 NM_002429	145	146 (ss aa 1-18; pp aa 19-97)	147
MMP-20 (enamelsina)	agrecano	EC 3.4.24.-	O60882 Y12779	148	149 (ss aa 1-22; pp aa 23-107)	150
MMP-x (MMP-21) (XMMP)	Sin sustratos definidos	EC 3.4.24.-	O93470 NM_001085816 (*Xenopus*)	151	152 (ss aa 1-22; pp aa 23-180)	153
MMP-21	gelatina	EC 3.4.24.-	Q8N119 NM_147191	315	316 (ss aa 1-24; pp aa 25-144)	317
MMP-23 CA-MMP	gelatina	EC 3.4.24.-	O75900 AJ005256	318	319	320
MMP-27 CMMP	gelatina	EC 3.4.24.-	Q9H306 NM_022122	321	322 (ss aa 1-17; pp aa 18-98)	323
MMP-28 (epilisina)		EC 3.4.24.-	Q9H239 NM_024302	324	325 (ss aa 1-22; pp aa 23-122)	326
ADAMTS-1	agrecano	EC 3.4.24.	Q9UHI8 NM_006988	157	158 (ss aa 1-49; pp aa 50-252)	159
ADAMTS-2	Procolágeno I, procolágeno II	EC 3.4.24.	O95450 AJ003125	160	161 (ss aa 1-29; pp aa 30-253)	162
ADAMTS-3	Procolágeno II	EC 3.4.24.14	O15072 NM_014243	163	164 (aa 1-229)	165
ADAMTS-4 (agrecanasa-1)	agrecano	EC 3.4.24.82	O75173 NM_005099	166	167 (ss aa 1-51; pp aa 52-212)	168

TABLA 3: Enzimas que Degradan matriz						
Proteasa	**Sustrato**	**Código de acceso al banco de datos de la enzima (EC) www.expasy.ch/sprot/enzyme.html**	**GenBank No.**	**SEQ ID NO**		
				Precursor		**maduro**
				nt	**aa** (aa de secuencia de señal(ss); aa de pro-péptido(pp)	**aa**
ADAMTS-5 (agrecanasa-2)	agrecano	EC 3.4.24.	Q9UNA0 NM_007038	169	170 (ss aa 1-16; pp aa 17-261)	171
ADAMTS-14	Procolágeno II	EC 3.4.24.	Q8WXS8 Isoforma a NM_139155	172	173 (ss aa 1-22; pp aa 23-252)	174
			Isoforma a NM_080722	175	176 (ss aa 1-22; pp aa 23-252)	177
Otro						
Heparanasa	Proteoglicano	EC 3.2.-.-	Q9Y251 AF152376	154	155 (ss aa 1-35; pp aa 110-157)	156

1. Activación de Enzimas

La mayoría de las proteasas se sintetizan y secretan como formas inactivas y requieren procesamiento adicional para volverse activas. La activación se alcanza típicamente por cambios conformacionales, estéricos u otros que revelan el sitio activo de las enzimas. Con la excepción de calpaínas, todas las enzimas proteasas se sintetizan típicamente como zimógenos. La activación de zimógeno previene la degradación de proteína indeseada que ocurriría si las proteasas siempre estubieran presentes en una forma activa. Generalmente, las porciones de terminal N que contienen zimógenos (o prosegmentos o proregiones) que bloquean estéricamente el sitio activo de la proteasa y previenen el acceso de sustratos al sitio activo de la proteasa. Los prosegmentos de los zimógenos están en uin

intervalo de tamaño desde dos residuos hasta 150 residuos. Durante la secreción de una forma preproenzima, la proenzima (que contiene el prosegmento) es inactiva.

Durante la remoción proteolítica del prosegmento del zimógeno, ya sea autocatalíticamente o por otras proteasas, el sitio activo de la enzima se expone resultando en una proteasa madura, y típicamente, activación. En algunos casos, sin embargo,m también se requieren cofactores adicionales para la activación completa. Por ejemplo, el cambio de pH dispara la activación de enzimas de la familia de cisteína, asártico y metaloproteasa. El pH bajo actúia para incrementar la susceptibilidad del prosegmento como un sustrato durante la conversión del zimógeno o causa un cambio conformaciones en el prosegmento o enzima (Jerala et al. (1998) J Biol. Chem., 273:11498-1 1504). Las enzimas lisosomales, tales como catepsinas de las familias de proteasas de cisteína y aspártica, requieren condiciones ácidas antes de alcanzar la activación completa. Además del pH, otros cofactores incluyen, pero no se limitan a, concentración de sal, agentes reductores tales como cisteína, DTT y TCEP, iones de metal tales como calcio, calor o temperatura. De esta manera, existen varios mecanismos de conversión de zimógeno y varían entre las familias de proteasa (ver por ejemplo, Khan et al. (1998) Protein Science, 7:815-836; Khan et al. (1999) PNAS, 96: 10968-10975). Por ejemplo, la conversión de zimógeno a la enzima activa a menudo se presenta como un resultado de la proteólisis por autocatálisis o acciones de otras proteasas, cambios en el pH, o el involucramiento de moléculas o iones accesorios, o una

combinación o una o más de las condiciones anteriores. El control adicional sobre el tiempo y la ubicación de acción a menudo se alcanza por inhibidores de proteína (Stroud et al. (1977) Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 6:177-93).

a. Serina Proteasas

Las serinas proteasas (SPs), que incluyen enzimas secretadas y enzimas secuestradas en organelos de almacenaje citoplásmico, tienen una variedad de papeles fisiológicos, incluyendo coagulación sanguínea, cicatrización de heridas, digestión, respuestas inmunitarias e invasión y metástasis de tumor. Muchas serinas proteasas degradan componentes de la matriz extracelular (ver Tabla 2 enseguida). Por ejemplo, las proteasas involucradas en la degradación y remodelación de la matriz extracelular (ECM) contribuyen a la remodelación de tejido, y son necesarias para invasión y metástasis del cáncer.

La actividad de proteasas en la familia de serina proteasa depende de un conjunto de residuos de aminoácido que forman su sitio activo. Uno de los residuos siempre es una serina; por lo tanto su designación como serina proteasas. El mecanismo de desdoblado de una proteína objetivo por una serina proteasa se basa en el ataque nucleofílico del enlace peptídico dirigido por una serina. La serina catalítica forma un intermediario tetrahédrico enlazado covalentemente con el átomo de carbonilo del enlace péptido de escisión de substratos. En muchos casos la propiedad nucleofílica del grupo se mejora por la presencia de una histidina, que se adhiere en un "estado aceptor del protón" por un aspartato. Las cadenas laterales alineadas de serina, histidina y aspartato construyen la triada catalítica

común para la mayoría de las serina proteasas.

La mayoría de las serina proteasas existen como zimógenos en la forma precursora, y de esta manera son inactivos. En la forma de zimógeno del sitio activo de proteasa para catalizais se distorsiona comparado con la enzima activa. De hecho, las serina proteasas son la única familia de proteasas quienes tienen diferencias conformaciones en el sitio activo entre el zimógeno y la forma activa de la proteasa. De esta manera, la triada catalítica existe en el zimógeno, pero un rizo distorcionado de la protenzima obstruye parcialmente la endidura enlazada al sustrato. Como un resultado, el polipéptido de sustrato no enlaza efectivamente, y la proteólisis no se presenta. Sólo después de la activación, durante lo cual la conformación y estructura del zimógeno cambia y el sitio activo se abre, puede presentarse la proteólisis.

Las serina proteasas son activas a pH neutro. La conversión del zimógeno se presenta después de la proteólisis limitada, tal como por desdoblamiento catalítico altamente específico por otra proteasa o por auto-activación. Por ejemplo, la conversión de la protrombina inactiva a la forma activa de la enzima (trombina) se alcanza por desdoblamiento catalítico altamente específico del prosegmento por otra de las enzimas de coagulación (factor Xa). Otras serina proteasas usan mecanismos similares, pero los sitios de desdoblamiento de activación difieren y de esta manera las serina proteasas típicamente se activan por diferentes convertasas.

Las serina proteasas asociadas con gránulo, incluyendo

pero no limitado a, granzimas A y B, catepsina G, neutrófilo elastasa, proteinasa 3, y triptasa de masticitos y quimasa requieren de un evento proteolítico doble para la activación. Estas enzimas se sintetizan como preproenzimas; desdoblan el péptido de señal lo que resulta en una forma de proenzima zimógeno que es inactiva. Las serina proteasas asociadas con gránulo contienen un prodipéptido en la terminal N de la enzima, y también contienen una extensión de terminal carboxi que también deberá removerse de la activación. El prodipéptido previene el plegado de la enzima madura en una formación catalíticamente activa. La activación de las serina proteasas asociadas con gránulo se alcanza por el desdoblado de tanto la extensión carboxi-terminal como el prodipéptido. La catepsina C se ha implicado en el desdoblamiento del prodipéptido en al menos algunas serina proteasa asociada con el gránulo (Kummer et al. (1996) J Biol. Chem., 271 :9281-9286).

b. Cisteína Proteasas

Las cisteína proteasas contienen un par Cys-His en su sitio activo, y su activación catalítica involucra un grupo cisteína sulfhidrilo. La desprotonación de la cisteína sulfhidrilo por un residuo de histidina adyacente se sigue por ataque nucleofílico de la cisteína en el péptido carbonilo carbono. Un tioéster que liga la terminal carboxi nueva a la cisteína tiol es un intermediario de la reacción (comparable con el intermediario acilo-enzima de una serina proteasa). La cisteína proteasa incluye papaína, catepsina, caspasas, y calpaínas. Los mecanismos de activación de estas familias diferentes de cisteína proteasas difieren.

i. Catepsinas

Las cisteína proteasas tipo papaína, incluyendo catepsinas, son una familia de endo-peptidasas dependientes de tiol relacionados por similitud estructura a la papína. Estas forman una proteína de dos dominio con los dominios etiquetados R y L (para derecho e izquierdo) y rizos desde ambos dominios forman una hendidura de reconocimiento de sustrato. Las catepsinas se sintetizan como zimógenos que contienen un prosegmento; el prosegmento actúa como un prosegmento inhibidor de terminal N. aunque hay alrededor de 25% de secuencia identificada entre las enzimas maduras, los prosegmentos exhiben poca similitud de secuencia. El prosegmento funciona como un inhibidor potente de la enzima madura. El prosegmento también sirve para otras funciones tales como jugar un papel en el plegado y estabilidad de la enzima durante la síntesis y transporte a pH neutro.

Las catepsinas de la familia de cisteína proteasa son enzimas lisosomales y de esta manera se activan óptimamente debajo de pH 7 y se vuelven inactivos arriba de pH 7. Las catepsinas se sintetizan como precursores inactivos (es decir zimógenos), y se activan por la remoción proteolítica del prosegmento. Esto resulta en la generación de enzimas de cadena sencilla. Generalmente, las enzimas de cadena sencilla pueden procesarse en dos formas de cadena que contienen una cadena pesada y una cadena ligera. Típicamente, las dos cadenas se adhieren juntas por medio de interacciones no covalentes o por medio de puentes disulfuro. Por lo tanto, las catepsinas maduras existen en forma de cadena lateral o en dos cadenas.

La remoción del prosegmento puede facilitarse ya sea por la activación por otras proteasas o por activación autocatalítica a pH ácido (Turk et al. (2001) The EMBO Journal, 20:4629-4633). La dependencia de pH del proceso de conversión de zimógeno se regula por puentes de sal conservados en el prosegmento (por ejemplo, Asp82p y Arg38p y Glu87p y Arg48p en procatepsina L establecidos en SEQ ID NO:62). La disrupción de los puentes de sal por protonación de los grupos carboxilatos al pH inferior rompen el núcleo hidrofónico del prosegmento lo que resulta en la disociación del prosegmento del sitio activo (Khan et al. (1998) Protein Science, 7:815-836). Los residuos que inducen la formaciuón de puentes de sal pueden diferir entre catepsinas. Por ejemplo, la pro-catepsina B usa interacciones de puente de sal alternativas para esta conversión de zimógeno dependiente del pH (Coulombe et al. (1996) EMBO J., 15:5492-5503).

Se requieren condiciones de pH ácido para la actividad de catepsinas maduras; la conversión de zimógeno por sí misma no es suficiente para la actividad de enzima. Además de este requerimientos para actividad, el pH ácido también estabiliza la enzima. La inactivación y desestabilización de catepsinas a condiciones de pH más altas está causada por la desprotonación de la porción imidazol del sitio activo $-S^{-}/H^{+}im-$ ion par, y "sin cremallera" de la estructura a lo largo de la ranura del sitio activo (Dehrmann et al. (1995) Arch. Biochem. Biophys., 324:93-98). Por lo tanto, la mayoría de catepsinas tienen actividad y estabilidad óptima a un pH ácido. Por ejemplo, las catepsinas B, F, H, K, L y V son óptimamente activos én

000100

ambientes ácidos y sólo son débiles o no activos a pH neutro (Lutgens et al. (2007) The FASEB J., 21 : 3029-3041). Algunas catepsinas, por ejemplo, catepsina L, pierden su actividad rápidamente después de la incubación a un pH neutro. Algunas catepsinas mantienen su actividad enzimática aún después de la incubación a pH neutro, y de esta manera pueden degradar las proteínas de matriz bajo condiciones fisiológicas. Las catepsinas C y S se han encontrado que tienen la estabilidad al pH más alta, mientras las catepsinas K y V exhiben estabilidad al pH intermedio. Las investigaciones *in vitro* han mostrado que la catepsina K pueden degradar las proteínas de fibrilo a pH neutro (Buhling et al. (2004) Eur. Respir. J., 23:620-628).

Catepsina L

La catepsina L (CatL) es una cisteína proteasa de ácido lisosomal que pertenecen a la familia de papaína. El gen L de catepsina humano que codifica una cisteína proteasa de 333 aminoácidos contienen un péptido de señal de 17 aminoácidos, un propéptido de 96 aminoácidos y una región madura de 220 aminoácidos (ver SEQ ID NOS:61 y 62 y acceso al GenBank No. P07711). La catepsina L también incluye variantes alélicas y especies, y otras variantes. Los ejemplos de tales variantes son cualquier de las establecidas en SEQ ID NOS:208 hasta 223 y 234. La catepsina L se sintetiza como una proenzima inactiva, y al igual que otras proteasas, contiene un propéptido que corresponde a los aminoácidos 18-113 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:62. El propéptido inhibe la actividad proteolítica de la enzima. El segmento de propéptido también funciona para estabilizar la proenzima de

000102

los efectos desnaturante de pH neutro a alcalino (Coulombe et al. (1996) The EMBO J., 15:5492-5503). El desdoblamiento del propéptido se presenta al autoprocesar bajo condiciones ácidas lo que resulta en una enzima madura que es activa y tiene actividad catalítica bajo condiciones ácidas. La catepsina L madura (establecida en la SEQ ID NO:1) puede existir como una forma de cadena sencilla de alrededor de 28 kDa y/o como una forma de dos cadenas de alrededor de 24 y 4 kDa (cadena pesada y ligera, respectivamente). Se conocen las variantes alélicas y de especie de catepsina L. las variantes de especies ejemplares son cualquiera establecida en las SEQ ID NOS:208-223, incluyendo ácidos nucleicos y polipéptido codificado y formas maduras de los mismos que caren de la secuencia de señal y propéptido. Las variantes alélicas ejemplares son cualquiera establecida en la SEQ ID NO:234.

La catepsina L se localiza primariamente para endosomas y lisosomas. La capacidad proteolítica óptima de la catepsina L madura se alcanza a un pH ácido de alrededor de 5.5 y es inactivo a pH neutro (Bohley P et al., "Intracellular Protein Turnover." en S. Holzer and H. Tschcsche (eds.). Biological Functions of Proteinases, pp. 17-34, Berlin: Springer- Verlag. 1979). El pH óptimo de la catepsina L puede estar influenciado por la resistencia iónica, y por lo tanto el pH óptimo difiere entre soluciones amortiguadoras (Dehrmann et al. (1995) Arch. Biochem. Biophys., 324: 93-98). La procatepsina L es estable bajo pH neutro y ligeramente alcalino, condiciones donde la catepsina L madura se inactiva (Jerala et al. (1998) J. Biol. Chem., 273 : 11498- 11504). Por ejemplo, a pH ácido la enzima

es más estable, actúa menos en sí misma, pero cataliza actividamente la hidrólisis de sustratos de proteínas. A un pH más cercano al neutro o pH fisiológico y en presencia de temperatura elevada tal como 37°C, la enzima es altamente inestable debido a que prefiere por sí misma como un sustrato (autocatalisis) contra otros sustratos de proteína. Un agente reductor, si se agrega a una catepsina L activa, puede aumentar estas actividades a pH tanto ácido como fisiológico.

La forma activada de la catepsina L tiene siete residuos de cisteína medios, que incluyen tres cisteínas de disulfindo y 1 cisteína libre (el sitio activo Cys 25 que se conserva en la familia de cisteína proteasa). La presencia de un grupo sulfhidrilo reducido (-SH) del Cys25 se requiere para actividad. Por lo tanto, la presencia de un agente de reducción tal como Cisteína o una forma reducida de glutaiona puede ayudar a mantener el sitio activo de sulfhidrilo en el estado reducido. Alternativamente, o además, el agente reductor puede reducir los disulfuros y ayudar a realizar una conformación de proteóina más favorable (secundaria y terciaria) que induce mejor el enlace y catalisis de sustratos in vivo.

La catepsina L degrada sustratos de proteínas, que incluyen, pero no se limitan a, colágenos, precursor IL-8, precursor de neurotransmisor, pro-encefalina, y depósitos amiloides asociados con cadena ligera de inmunoglobulina (AL) y azocaseína (Barret & Kirschke (1981) Methods Enzymol., 80:535-561; Mason et al., (1985) Biochem. J., 226:233-241). CatL se inhibe rápidamente por Z-Phe-Ala-CHN2.

ii. Calpaína

000104

La calpaína es una cisteína proteasa citoplásmica dependiente de Ca^{2+} que existe en dos formas predominantes, μ-calpaína (calpaína 1) y m-calpaína (calpaína 2). Los sustratos de calpaína incluyen proteínas citoesqueletales, enzimas de transducción de señal, factores reguladores transcripcionales y proteínas de membrana integral. Entre los componentes ECM, las calpaínas degradan la fibronectina, vitronectina y proteoglianos (Ian M. Clark and Gillian Murphy. "Matrix Proteinases," en Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism, Academic Press (2006), pp. 181-198).

Las calpaínas existen como heterodímeros inactivos (y subunidades ~80 kDa y ~30 kDa), y requieren Ca^{2+} para autocatálisis. La μ-calpaína y m-calpaína difiere en su sensibilidad a Ca^{2+} requerida para la activación; la μ-calpaína es activada como máximo a la mitad a concentracioens de calcio micromolares bajas, que es alrededor de un orden de magnitud inferior que aquellas concentracioens requeridas para activar la m-calpaína (Meyer et al. (1996) Biochem. J, 314:51 1-519). Durante la activación, ambas subunidades de calpaína experimentan autólisis limitada que remueve el prosegmento de terminal N e incrementa la sensibilidad al calcio. La autólisis por sí misma no es suficiente para activar la calpaína debido a que la proteasa autolizada todavía requiere calcio para desdoblar el sustrato (Meyer et al. (1996) Biochem. J., 314:511-519). De esta manera, la activación sostenida de calpaína requiere la presencia de calcio. Los requerimientos de calcio son considerablemente más altos que concentraciones de Ca^{2+} fisiológicas, que es generalmente 1 μM. Por ejemplo, la μ-

calpaína *in vitro* requiere una concentración de calcio de 10-50 µM y la m-calpaína requiere una concentración de calcio de 300-500 µM (Hosfield et al. (1999) The EMBO J., 18:6880-6889). Debido al requerimiento de calcio, la calpaína se regula por flujos de calcio regionales y/o enlace de membrana (Molinari and Carafoli (1997) J Membr. Biol, 43:543-5). El calcio posiblemente induce un cambio de conformación para exponer el sitio activo a proteasa. La calpastatina es un inhibidor celular específico de calpaínas.

c. Proteasas Aspárticas

Las aspartato proteasas incluye algunas proteasas encontradas en lisosomas que han mostrado que degradan componentes ECM. Incluidas entre estos están las catepsinas D y E. para actividad, dos residuos de aspartato participan en la catalisis de ácido/base en el sitio activo. En la reacción inicial, un aspartato acepta un protón de un sitio activo H_2O, que ataca el carbonil carbono de la ligadura de péptido. Simultáneamente, el otro aspartato dona un protón al oxígeno del grupo péptido carbonilo.

La forma de zimógeno de las aspartato proteasas contienen un prosegmento de termina N cargado positivamente que interactúa con la porción central de la enzima que forman puentes de sal con el segmento cargado negativamente. Debido al posicionamiento del prosegmento y la formación de los puentes de sal, los sustratos se previenen que tengan acceso al sitio activo. La conversión de zimógeno a una enzima activa se presenta por la disrupción de los puentes de sal a pH bajo. La exposición a pH bajo esulta en la protonación de las cadenas

laterales de carboxilato de residuos Asp y Glu, lo que resulta en la desestabilización de puentes de sal entre el prosegmento y la enzima madura. Una vez que se remueve, el prosegmento se degrada autocatalíticamente por la enzima activa. La hidrólisis posterior del prosegmento asegura que la activación sea irreversible, y que el prosegmento liberado no actúe como un inhibidor competitivo de la enzima activa. Además, no se requieren otras moléculas accesorio para la conversión (Khan et al. (1998) Protein Science, 7:815-836). Igual que las catepsinas de la familia de cisteína proteasa, sin embargo, las condiciones de pH ácido se requieren para actividad y estabilidad de las enzimas maduras.

d. Metaloproteasas

Las metaloproteasas (también llamadas proteasas de Zinc) incluyen las enzimas carboxipeptidasas digestivas, varias metaloprotasas de matriz (MMPs) que se secretan por células, ADAMs (un dominio de disintegrina y metaloproteasa), ADAMTS (un dominio de disintegrina y una metaloproteinasa con porciones de trombospondina) y proteasas lisosomales. Estas enzimas, incluyendo ADAMs y MMPs, tienen papeles en el desarrollo embriónico, crecimiento y proliferación celular, respuestas inflamatorias, reparación de heridas, esclerosis múltiple, artritis, y progreso y metástasis de cáncer (Manzetti et al., (2003) J of Computer-Aided Mol. Design, 17: 551). La mayoría de las MMPs (por ejemplo, colagenasa) están involucradas en la degradación de la matriz extracelular, por ejemplo, durante la remodelación de tejido. Por ejemplo, muchas de estas enzimas pueden desdoblar componentes de la membrana base y matriz

000109

extracelular.

Las metaloproteasas contienen un ión Zn^{++} en el centro activo de la enzima requerida para actividad catalítica. Una porción enlazada al zinc en el sitio activo de la metaloproteasa incluye dos residuos de histidina cuyas cadenas laterales de imidazol son ligandos al Zn^{++}. Durante la catalización, el Zn^{++} promueve el ataque nucleofílico en el carbonil carbono por el átomo de oxígeno de una molécula de agua en el sitio activo. Una base de sitio activo (un residuo de glutamato en carboxipeptidasa) facilita esta reacción al extraer un protón del ataque de molécula de agua. Generalmente, estas enzimas tienen una porción enlazada al zinc común (HExxHxxGxxH) en su sitio activo, y una mutación conservadora convierte después el sitio activo. La mutación de cualquiera de las histidinas somete a ablación la actividad catalítica.

La forma de zimógeno de las metaloproteasas contienen un prosegmento de alrededor de 80-100 residuos en longitud. En la forma de zimógeno, los residuos dentro del sitio enlazado al sustrato de la enzima madura y los iones Zn^{++} catalíticos están en la misma posición de conformación como en la forma activa, y no cambian durante la conversión de zimógeno. La enzima se inactiva debido al prosegmento colocado para bloquear el sitio, previniendo de esta manera el acceso a los sustratos. La conversión del zimógeno a la enzima activa resulta del desdoblamiento del prosegmento de la enzima madura. Los mecanismos múltiples son capáces de iniciar los eventos de desdoblamiento, incluyendo acciones por otras proteasas, calor, agentes de mercurio (por ejemplo, acetato 4-amino-

fenilmercúrico), agentes que reaccionan a SH, oxígeno reactivo y detergentes (ver por ejemplo, Khan et al (1998) Protein Science, 7:815-836; Okada et al (1988) Biochem J, 254:731-741; Okada & Nakanashi (1989) FEBS Lett., 249:353-356; Nagase et al. (1990) Biochemistry, 29:5783-5789; Koklitis et al. (1991) Biochem J, 276:217-221; Springman et al. (1990) PNAS, 87:364-8; Murphy et al (1997) Matrix Biol, 15:511-8).

e. Heparanasa

La heparanasa es una enzima glicosilada que está involucrada en el catabolismo de ciertos glicosaminoglicanos. Es una endo-β-glucuronidasa que desdobla el sulfato de heparano en sitios intercadena específicos. La hepranasa es un miembro del clan A de glicosil hidrolasa (GH-A), que comparte un mecanismo catalítico común que involucra dos residuos ácidos conservados, un donador de protones supuestos en Glu^{225} y un nucleófilo en Glu^{343} (Hulett et al (2000) Biochemistry, 39: 15659-15667). La interacción de linfocitos T y B, plaquetas, granulocitos, macrófagos y mastocitos con la matriz extracelular subendotelial (ECM) se asocia con la degradación de sulfato de heparano por actividad de heparanasa.

El cADN de heparanasa humano codifica una proteína que se sintetiza inicialmente como una pre-pro-proteína con una secuencia de señal de péptido que se remueve por peptidasa de señal durante la transubicación en el retículo endoplásmico (ER). Lo que resulta en una forma de pro-enzima de 65 kDa que se procesa además por desdoblamiento proteolítico que resulta en la excisión de un fragmento de 6 kDa intervenido que genera un polipéptido de 8 kDa y un polipéptido de 50 kDa, que forma

000109

un heterodímero. La secuencia de aminoácidos de la heparanasa madura se establece en la SEQ ID NO: 156. La actividad de heparanasa y la localización está estrechamente regulada. Por ejemplo, la enzima es altamente sensible a cambios en el pH local, ejerciendo una actividad enzimática alta bajo condiciones ácidas que se presentan en la vecindad de los tumores y en sitios de inflamación con poca o ninguna actividad a pH fisiológico. De esta manera, el desdoblamiento mediado por heparanasa del andamiaje HS es un proceso dependiente del pH; la actividad enzimática máxima se alcanza a valores de pH en el rango desde 4 hasta 6.8 (Gilat et al. (1995) J Exp. Med., 181 : 1929-1934; Goldshmidt et al. (2003) The FASEB J, 17:1015-1025). A pH fisiológico, la heparanasa exhibe poca actividad. La dependencia de pH asegura que el rompimiento estructural de la ECM se confina a condiciones más ácidas, tales como las que se presentan en la endosoma y en sitio de lesión o inflamación (McKenzie et al. (2003) Biochem. J, 373:423-435).

D. Enzimas activables que degradan matriz (AMDE)

Las enzimas que degradan matriz requieren conversión de zimógeno para activación por desdoblamiento del prosegmento para generar una enzima madura. Como se discute arriba, muchas enzimas que degradan matriz también requieren la presencia continua de una o más de otras condiciones activantes para la actividad. Tales condiciones activantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, pH, iones de metal, temperatura, agentes de reducción, agentes oxidantes y concentración de sal. Por ejemplo, muchas enzimas requieren valores pH específicos o concentración de iones de metal o concentración de sal o la

presencia de un agente de reducción para actividad. En un ejemplo, las enzimas lisosomales requieren condiciones de pH ácidas para actividad. Por ejemplo, las catepsinas de la familia de cisteína y aspártica de proteasas requeren condiciones de pH ácidas para actividad. La heparanasa también es una enzima lisosomal que se acumula en lisosomas para procesamiento normales en el ambiente ácido. Generalmente, el ambiente ácido se proporciona en las lisosomas ácidas donde las proteasas lisosomales se localizan nornalmente. Fuerta de este ambiente, las proteasas lisosomales son inactivas o menos activas y requieren exposición exógena a pH ácido para actividad. En otro ejemplo, las condiciones activantes incluyen concentración de iones de metal. Por ejemplo, las calpaínas requieren concentración suficiente de Ca^{2+} para actividad. La actividad de tales enzimas es reversible en ausencia de la condición activante.

Al tomar la ventaja del requerimiento para condiciones activant4es exógenas, las enzimas que desgradan la matriz activables pueden hacerse temporalmente activas por una duración limitada durante la administración *in vivo*, por ejemplo a la ECM. Tales enzimas activables que degradan matriz son activas sólo cuando se exponen a condiciones activantes exógena. Ya que la condición activante no se presenta en el sitio de administración y deberá aplicarse exógenamente, la condición activantes se neutralizará o disipará con el tiempo después de la adminsitración in vivo de un activador que siministra la condición activante apropiada. Por lo tanto, la activación de una AMDE es reversible después de la

000110

administración in vivo ya que el activador se disipa o se neutraliza de otra manera. Por ejemplo, la activación temporal de una AMDE puede alcanzarse en el ambiente del intestilio de la piel y otros tejidos al administrar la AMDE en presencia de una condición activante exógena (es decir un activador) que no se presenta en el sitio de administración. Típicamente, la condición activante es una que no se presenta en la ECM, antes de la administración de un activador proporciona la condición activante. De esta manera, la exposición de una enzima activable que degrada la matriz para una condición activante resulta en la activación de la enzima por un tiempo limitado o predeterminado ya que la condición activante se disipa o neutraliza en el ambiente intersticial.

Por lo tanto, se proporcionan en la presente composiciones, combinaciones y recipientes que contienen enzimas activables que degradan matriz que, durante la administración in vivo, permiten la activación de la enzima por un periodo de tiempo limitado o predeterminado durante el cual la enzima puede ejercer su acción biológica. En virtud de la actividad reversible de las enzimas activables, las enzimas se desactivan, por ello controlando la duración de la acción biológica de tales enzimas. Las enzimas activables que degradan matriz se proporcionan en combinaciones y recipientes con un activador que proporcionan la condición activante. Además, la enzima activatable que degrada la matriz y el activador también pueden combinarse o proporcionarse en combinación, tales como en recipientes, con otros agentes tales como cualquiera de uno o más de un antitético, agente alfa adrenérgico o agente

dispersante. Las enzimas activables que degradan matriz se proporcionan en una cantidad terapéuticamente efectiva, que cuando se activa, degrada uno o más componentes de la ECM durante la administración, tales como durante administración subcutánea. Las enzimas activables que degradan matriz resultantes pueden usarse como terapéuticos para tratar enfermedades o afecciones mediadas por ECM.

Cualquier enzima que degrada la matriz, ya sea sintética o aislada de fuentes naturales, tales como aquellas establecidas en la Table 3 o en cualquier otro lugar en la presente, variantes alélicas o de especie u otras variantes de las mismas, o cualquiera conocida por aquellos de experiencia en la técnica se pretende que se usen en composiciones, combinaciones, métodos y aparatos proporcionados en la presente, de manera que la enzima es activable debido al requerimiento de una condición activante. Las enzimas activables que degradan matriz se proporcionan en una forma inactiva ya sea como un zimógeno o como un polipéptido maduro inactivo ya sea en forma de cadena sencilla o de dos cadenas. Por ejemplo, las catepsinas aún en su forma madura son inactivas y requieren condiciones de pH ácidas para estabilidad conformacional. Las enzimas activables que degradan matriz incluyen proteasas lisosomales, tales como las catepsinas de la familia de cisteína y aspártica y heparanasas. Las enzimas activables que degradan matriz ejemplares son cualquiera de las establecidas en cualquiera de SEQ ID NOS:56, 59, 62, 64, 179, 67, 70, 73, 76, 182, 185, 188, 79, 194, 89, 92, 95 y 155 y formas maduras de las mismas establecidas en SEQ ID NOS:57, 60,

1, 65, 180, 68, 71, 74, 77, 183, 186, 189, 80, 195, 90, 93, 96 y 156 o variantes alélicas o variantes de especies u otras variantes de las mismas. Alguien de experiencia en la técnica conoce o identificaría enzimas activables que degradan matriz. Por ejemplo, alguien de experiencia en la técnica usaría ensayos de rutina de activación de enzima, tales como cualquiera de los proporcionados en la presente y conocidos en la técnica, para evaluar el requerimiento de una condición activante exógena para activación sostenida o reversible de cualquier enzima deseada.

Las enzimas activables que degradan matriz pueden modificarse para alterar cualquiera de una o más propiedades o actividades. Por ejemplo, las propiedades o actividades alteradas incluyen, pero no se limitan a, modificación que vuelve la enzima más estable, alterar la especificidad del sustrato y/o conferir sensibilidad a la temperatura para la enzima. Si se desea, la estabilidad de la enzima también puede incrementarse por pegilación o glicosilación de la enzima. La modificación de polipéptidos usando técnicas de ADN recombinantes estándar es de rutina para alguien experto en la técnica. Para los propósitos en la presente, las enzimas que degradan matriz modificadas mantienen una o más actividades de la enzima no modificada y son activables. La actividad mantenida puede ser 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más actividad de la enzima no modificada.

En un ejemplo, la enzima que degrada la matriz, por ejemplo, una catepsina, pueden modificarse de tal manera que su prosegmento no es inhibidor. Pueden hacerse modificaciones por

reemplazo de aminoácido, sustitución o inserción dentro del prosegmento en sí mismo, o dentro de regiones del sitio activo donde se presentan las interacciones inhibidoras. Por lo tanto, la catepsina podría proporcionarse en una forma de zimógeno donde se presenta la autocatálisis bajo condiciones ácidas; el prosegmento desdoblado de tal enzima modificada no resultaría en la inactivación como se presenta para las las catepsinas tipo natural si se proporciona en la forma de zimógeno.

En otro ejemplo, una enzima activable puede modificarse para alterar su especificidad al sustrato. Por ejemplo, una enzima puede modificarse para tener especificidad incrementada para un sustrato particular. De esta manera, por ejemplo, la catepsina L, que exhibe especificidad al sustrato para colágeno tipo I y tipo IV pueden modificarse de manera que tiene especificidad al sustrato incrementada para colágeno tipo I, y no colágeno tipo IV, y vice versa. Las modificaciones de polipéptidos pueden alcanzarse por técnicas de biología molecular de rutina, y están dentro de la experiencia de alguien en la técnica. Las enzimas modificadas pueden probarse para su especificidad al sustrato usando ensayos de rutina para desdoblamiento de sustrato tales como se describe en la presente, o conocidos en la técnica. Por ejemplo, el desdoblamiento del sustrato puede evaluarse en péptidos fluorogénicos o en proteínas purificadas. El desdoblamiento puede evaluarse usando ensayos *in vitro* o *in vitro*. Por ejemplo, el desdoblamiento puede evaluarse al incubar la enzima con el sustrato, y luego correr la mezcla en un gel SDS-PAGE. La degradación puede evaluarse por Western Blot o usando

teñidos de proteína estándar tales como Azul Coomasie o Reactivos de teñido de plata.

En un ejemplo adicional, la enzima que degrada la matriz pueden modificarse para tener sensibilidad a la temperatura. Por ejemplo, las enzimas que degradan matriz que son activas a temperatura fisiológica (por ejemplo 37 °C) pueden modificarse y las enzimas seleccionadas que son activas a temperaturas más bajas (por ejemplo, menos de 37 °C; por ejemplo a o alrededor de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C o 30 °C), pero que no son activos a temperatura fisiológica. Por lo tanto, tales enzimas modificadas pueden usarse como enzimas activables que degradan matriz donde la condición de activación es temperatura baja. La administración de la enzimas simultáneamente, intermitentemente, o subsecuentemente con una condición activante proporciona la temperatura fría (por ejemplo solución amortiguadora fría) que resulta en activación de la enzima. La activación de la enzima se controla temporalmente conforme la temperatura *in vitro* regresa a la temperatura fisiológica de 37 °C.

1. Condiciones y Métodos Activantes para Activación de Enzimas activables que degradan matriz

Las enzimas activables que degradan matriz son inactivas en ausencia de una condición activante. Durante la administración *in vitro*, la activación temporal de tales enzimas activables que degradan matriz se alcanza por exposición (antes de o durante la administración subsecuentemente, intermitentemente o simultáneamente) a uno o más activadores específicos que proporcionan una condición

activante suficiente para activación de la enzima. Por ejemplo, la activación puede alcanzarse por exposición de enzimas activables que degradan matriz para, por ejemplo, temperatura (por ejemplo frío o calor), pH, sal, a soluciones que contienen concentraciones suficientes de iones de metal (por ejemplo, Ca^{2+}) para activación, a soluciones que contienen concentraciones suficientes de agentes de reducción o agentes de oxidación para activación, u otros métodos como se describe en la presente o conocido para alguien de experiencia en la técnica. La elección del activador variará dependiendo de la elección de la enzima como se describe en la presente o es conocido para alguien de experiencia en la técnica. Generalmente, una cantidad (por ejemplo concentración, nivel o grado) de activador suficiente para generar una enzima activa se usa. Esta cantidad puede determinarse fácilmente de forma empírica y depende de la enzima seleccionada y aplicación seleccionada.

En virtud de la activación reversible y condicional de enzimas activables, se alcanza la activación temporalmente, por ello se regula la duración de la acción enzimática en los componentes de matriz extracelular (ECM). Esta es una ventaja de los métodos actuales tal como efectos secundarios perjudiciales asociados con activación de enzimas prolongada indeseada puede controlarse. La activación temporal se alcanza debido a que las enzimas activables que degradan matriz requieren exposición contínua a condiciones activantes con objeto de mantenerse activas. Las condiciones activantes son presentadas no normalmente, endógenamente, en cantidades

suficientes para activación de una enzima en sitios donde las enzimas activables que degradan matriz se administran *in vitro*. Por ejemplo, el intersticio de piel tienen un pH neutro, y de esta manera una condición activante a pH bajo no se presenta normalmente. En otro ejemplo, el nivel fisiológico de iones de metal, tales como calcio, en el intersticio de piel, son más bajos que las cantidades efectivas requeridas para activación de algunas enzimas. De esta manera, la desactivación de enzimas puede presentarse durante la reducción de la exposición de la enzima a las condiciones activantes exógenas como puede ocurrir después de la administración *in vitro* de una enzima activable donde la condición activante suministrada exógenamente se disipa gradualmente o se neutraliza.

De esta manera, las condiciones activantes se proporcionan en la presente aquellas que son requeridas para activación de enzimas activables que degradan matriz, pero que son presentadas no normalmente en cantidades suficientes en el sitio de administración. El requerimiento para condiciones activantes para activación de enzimas activables que degradan matriz permite la activación de las enzimas que degradan matriz por un tiempo limitado, hasta que la condición activante se disipa o se neutraliza de tal manera que la enzima se vuelve inactiva o se vuelve inestable y se degrada. La cantidad de tiempo que una enzima se activa puede ser por un tiempo determinado. Por ejemplo, puede proporcionarse un activador que contiene una cantidad de condición activante, tal como la concentración, cantidad efectiva, nivel o grado, que se elige de tal manera que la enzima se activa por un tiempo establecido

bajo el ambiente y condiciones a las que se expone durante la administración *in vitro*. En un ejemplo, donde el pH ácido es la condición activante, la capacidad amortiguadora de una solución amortiguadora ácida puede ajustarse para modular el tiempo de su resistencia a cambios en pH. El tiempo predeterminado al cual un activador activa una enzima que degrada la matriz condicionalmente activable puede determinarse de forma empírica y es una función de la enfermedad a tratarse, el individuo tratado, la elección de la enzima y el activador. Una enzima activable que degrada la matriz puede ser activa después de la administración *in vitro* en presencia de un activador proporcionando una condición activante por o alrededor de 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas o más.

Las condiciones activantes ejemplares y activadores y métodos de activación temporal se describen a continuación en la presente. En vista de tal descripción, otras modalidades serán aparentes para alguien de experiencia en la técnica.

a. Condición activante - pH ácido

Las composiciones y métodos para activación condicional de las enzimas que degradan matriz cuya actividad se regula por pH, y el uso de tales enzimas para tratar enfermedades o afecciones mediadas por ECM son proporcionados en la presente. Tales métodos toman ventaja de proteínas que tienen actividad enzimática sólo a pH ácido, mientras se mantiene inactivo o se vuelve inestable y degrada a pH neutro. Tales proteínas incluyen proteasas lisosomales, que incluyen, pero no se limita

a, las catepsinas de las familias de cisteína y aspártica, y también heparanasa. Por ejemplo, las lisosomas, un compartimiento intracelular ácido, que contiene una gran variedad de enzimas hidrolíticas que degradan proteínas y otras sustancias internalizadas por endocitosis. Todas las proteasas intralisosomales, por ejemplo, catepsina L, exhiben un pH ácido óptimo. Tales proteasas ejemplares son cualquiera de las establecidas en cualquiera de las SEQ ID NOS: 57, 60, 1, 65, 180, 68, 71, 74, 77, 183, 186, 189, 80, 195, 90, 93, 96 y 156.

Los métodos de uso de las enzimas que degradan matriz que son activas sólo durante la exposición a ciertas condiciones de pH se usan en la presente para tomar ventaja de pH diferenciales dentro de la piel. Los sistemas epidérmicos humanos mantienen un gradiente de pH dentro de las capas estratificadas de la piel. Las capas exteriores se han reportado que exhiben un pH promedio de 5.5 (W.P. Smith (1994) Cosmetics and Toiletries, 109:41-48). El pH de las capas sucesivas de la epidérmis se incrementa con la profundidad, alcanzando un pH final cercano al rango fisiológico (alrededor de pH 7.4) en la capa dérmica.

Por lo tanto, se contempla en la presente que las enzimas activables que degradan matriz se empleen de manera que exhiban actividad en condiciones ácidas, pero son sustancialmente inactivas a pH neutro tal como existen en la ECM. Una enzima sustancialmente inactiva es cualquiera que exhibe 10% o menos actividad de la enzima a este pH óptimo, por ejemplo, a o alrededor de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 9.5% o 10% de actividad como se presenta en el pH óptimo de la enzima.

Alguien de experiencia en la técnica conoce o puede determinar el pH óptimo de una enzima y puede evaluar las diferencias en actividad a condiciones de pH variables. Por ejemplo, el pH óptimo de catepsina L es o está alrededor de 5.5, pero puede variar dentro de un rango de 4.5 hasta 6 dependiendo de la especie particular de catepsina L, condición de solución amortiguadora o resistencia iónica. La catepsina L es sustancialmente inactiva a o alrededor de pH 7.4 (Dehrmann et al. (1995) Arch. Biochem. Biophys., 324:93-98). En otro ejemplo, el valor de pH óptimo para la actividad de catepsina D es o está alrededor de 3.0 hasta 4.0, y es sustancialmente inactiva a valores de pH a o alrededor de 6.0 o superiores (Rojas-Espinosa et al. (1973) Infection and Immunity, 8:1000-1008). La catepsina S es una de algunas proteasas lisosomales que es estable a pH 7.0 (Bromme et al. (1993) J Biol. Chem., 268: 4832-4838).

Para los propósitos en la presente, una enzima activable se activa en condiciones de pH a o alrededor de 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 o 6.5, pero es sustancialmente inactiva a pH neutro. El perfil de actividad de pH puede realizarse en una enzima, y la actividad relativa evaluada, para determinar su pH óptimo bajo varias condiciones (Dehrmann et al. (1995) Arch. Biochem. Biophys., 324:93-98). Se entiende que el pH óptimo puede ser diferente dependiendo del sustrato usado, condiciones de solución amortiguadora, resistencia iónica y especies de enzima. De esta manera, la referencia a pH óptimo en la presente es sólo para ejemplificación. Alguien de experiencia en la técnica puede de forma empírica determinar el pH óptimo

000120

de una enzima bajo condiciones específicas. Por ejemplo, las condiciones de solución amortiguadora y resistencias iónicas puede variar para determinar una actividad de enzimas bajo varias condiciones de pH. Las evaluaciones de enzima para determinar los perfiles de actividad de pH pueden realizarse usando sustratos fluorogénicos tales como se describen en la presente y se conocen para alguien de experiencia en la técnica. La elección del sustrato fluorogénico usado variará entre enzimas, y se conoce para alguien de experiencia en la técnica o puede determinarse de forma empírica.

De esta manera, la capacidad para activar condicionalmente las enzimas que degradan matriz por la administración con una condición activante no se presenta normalmente en el sitio de administración permite la regulación temporal de, y alteración de, los parámetros fisiológicos de órganos y tejidos, tales como el intersticio, que exhiben un pH neutro. Bajo condiciones fisiológicas normales, el pH del intersticio es neutro. De esta manera, las enzimas activables que degradan matriz se activan a pH bajo, tales como enzimas lisosomales descritas en la presente, cuando se presenta en el intersticio normalmente sería catalíticamente inactivo debido a al pH neutro del intersticio. Cuando el pH del intersticio se convierte temporalmente ácido, por ejemplo por la administración de una solución ácida amortiguadora, las enzimas lisosomales con pH ácido óptimo cuando se administran al intersticio se activarán. Cuando el pH del intersiticio regresa a su neutralidad, entonces las enzimas que degradan matriz con pH ácido requerido se inactivan y cesan para ejercer su actividad enzimática.

En consecuencia, se contempla en la presente que las enzimas activables que degradan matriz que son sustancialmente inactivas a pH neutro pueden administrarse sub-epidérmicamente bajo la piel (es decir por administración subcutánea, intradérmica o intramuscular) donde el pH es neutro. Otras vías de administración de enzimas que degradan matriz condicionalmente activables también se contemplan y pueden determinarse de forma empírica con base en el pH óptimo de la enzima particular de tal manera que la actividad de la enzima se vuelve reversible debido a cambios en las condiciones de pH durante la administración. Otras vías de administración incluyen, pero no se limitan a, rutas de administración oral, tópica y transdérmica.

Ya que el intersticio de la mayoría de los tejidos y órganos exhibe un pH neutro, la acidificación temporal puede alcanzarse por infusión de una solución ácida a un intersticio del tejido u órgano. La solución amortiguadora ácida es una composición que, cuando se administra, disminuye temporalmente el pH del intersticio hasta menos de o alrededor de 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ó 6.5 de tal manera que la enzima activatable que degrada la matriz es activa. El componente ácido de la solución amoriguadora es susceptible a neutralización por el pH neutro del intersticio. Las soluciones amortiguadoras ácidas se conocen para alguien de experiencia en la técnica. Para los propósitos en la presente, el componente ácido de la solución amoriguadora puede ser un ácido orgánico o inorgánico. Generalmente, la solución es una solución de un ácido débil. Los ácidos ejemplares incluyen, pero no se limitan

a, ácido 2-(N-morfolin)etansulfónico) (MES), ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, ácido láctico, ácido maléico, ácido glicin-clorhídrico, fosfato cítrico e histidina. El rango de pH efectivo de las soluciones amortiguadoras ácidas se conoce, y por lo tanto, pueden elegirse soluciones amortioguadoras apropiadas con base en el pH óptimo de la enzima seleccionada. Las soluciones amortiguadoras ácidas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, solución amortiguadora de acetato, citrato, formiato, glicina, malato, MES, fosfato, piperazina, propionato, piridina y succinato. Por ejemplo, el rango de pH efectivo de la solución amortiguadora de MES es 5.5 hasta 6.7.

El periodo de tiempo requerido para neutralización, y la posterior inactivación de la enzima que degrada la matriz que se activa por ácido, depende de la formulación de la solución amortiguadora ácida. Por ejemplo, periodos de tiempo más cortos resultan si los agentes ácidos y/o amortiguadores en la solución amortiguadora ácida son débiles con relación a la capacidad neutralizante del intersticio; periodos de tiempo más largos resultan si se utiliza un ácido más fuerte o se emplea un agente amortiguador más fuerte en la solución amortiguadora ácida. Por lo tanto, la resistencia a cambios en el pH depende de la capacidad amortiguadora de la solución amortiguadora particular. Entre más alta la resistencia iónica o concentración de la solución amoriguadora, más alta la capacidad de la solución amoriguadora. De esta manera, en los métodos y composiciones proporcionados en la presente, la regulación temporal de una enzima que degrada la matriz

activada a un pH dado puede controlarse además por la capacidad amortiguadora de la solución amoriguadora elegida. Esto se ejemplifica en el Ejemplo 7. La determinación de las soluciones amkortiguadoras deseadas para aplicaciones dadas es de rutina y están dentro del nivel de alguien de experiencia en la técnica.

Típicamente, la solución ácida se infusiona directamente a un sitio donde la degradación de uno o más componentes ECM se desea, por ejemplo, para tratar una enfermedad o afección mediada por ECM. La infusión de la condición activante en la forma de un activador de solución ácida pueden realizarse simultáneamente, secuencialmente o intermitentemente con la administración de una enzima activable que degrada la matriz inactiva. Donde la administración se presenta simultáneamente, la enzima activatable que degrada la matriz y la solución ácida amortiguadora pueden estar en la misma composición o en una separada. Cuando están en la misma composición, la enzima y la solución ácida amortiguadora pueden proporcionarse en una composición como una mezcla. La activación de la enzima también puede alcanzarse por la adición de la solución ácida a solución o suspensión líquida concentrada o forma liofilizada o en polvo de la enzima antes de la administración. Generalmente, donde una solución o suspensión líquida de una enzima activable que degrada la matriz se proporciona, es una solución o suspensión que, cuando se expone a un activador proporciona la condición activante apropiada, es susceptible a activación de la enzima por la condición activante.

Además, en las combinaciones y métodos proporcionados en la presente, un activador que tiene la condición activante (por

ejemplo a la solución ácida amortiguadora) y una enzima activable que degrada la matriz pueden proporcionarse y administrar en combinación con cualquiera de uno o más de otros agentes tales como cualquiera de uno o más de un agonista o agente dispersante del receptor adrenérgico alfa, anestético. Los ejemplos de tales agentes se discuten en la presente enseguida en la Sección titulada "Terapias de Combinación." Los otros agentes pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o intermitentemente con el activador y/o enzima que degrada la matriz.

En un ejemplo de los métodos proporcionados en la presente, una solución ácida amortiguadora se administra en el intersticio de piel, u otro tejido, donde una afección o enfermedad ECM se presenta. La solución ácida amoriguadora puede elegirse con base en el pH requerido para activación de la enzima que degrada la matriz y la capacidad de la solución amortiguadora deseada para alcanzar activación de duración limitada. Por ejemplo, la catepsina L es una enzima ejemplar para propósito de tratar una enfermedad mediada por colágeno, tal como, por ejemplo celulosis. En consecuencia, la solución amortiguadora ácida se prepararía al pH óptimo de 5.5 para activación de catepsina L. Tal solución amortiguadora ácida ejemplar es MES. La capacidad amortiguadora de la solución ácida también puede determinarse experimentalmente como se desee, por ejemplo, como se establece en el Ejemplo 7. Generalmente, la solución amortiguadora ácida se administra justo antes de o junto con la enzima que degrada la matriz. Por ejemplo, si la enzima que degrada la matriz se proporciona en

forma liofilizada, la enzima puede reconstituirse con la solución amortiguadora ácida justo antes de la administración, y la combination de la enzima y activador se administra en conjunto. En presencia de la solución amortiguadora ácida, la enzima se activa después de la administración *in vitro*. Dependiendo de la capacidad amortiguadora de la solución amortiguadora ácida, el pH del intersticio regresará a neutralidad después de un tiempo limitado o predeterminado, por ello invirtiendo los efectos degradantes de la enzima que degrada la matriz.

En otro ejemplo de los métodos proporcionados en la presente, una combinación de un anestético y vasoconstrictor, por ejemplo, lidocaína/epinefrina, se administra antes de la administración del activador y enzima que degrada la matriz. Generalmente, en los métodos, el agente dispersante, tal como una enzima que degrada el hialuronano, por ejemplo una hialuronidasa, también se administra junto con el anestético y vasoconstrictor, tales como un agonista del receptor adrenérgico alfa.

b. Condición activante – Concentración de Metal de Catión

Se proporcionan en la presente una composición, combinaciones, recipientes y métodos que contienen enzimas activables que degradan matriz que requieren la exposición a un ión de metal apropiado, por ejemplo Ca^{2+}, Mg^{2+} o Zn^{2+}, para activación. Una de tal enzima ejemplar es la calpaína (por ejemplo subunidad grande establecida en SEQ ID NO: 82 (calpaína 1) y SEQ ID NO:85 (calpaína 2) y subunidad pequeña establecida en SEQ ID NO:87, o variantes alélicas o de especies u otras

variantes de los mismos), que requieren Ca^{2+} para activación. El ión de metal puede proporcionarse en la forma de una composición acuosa, por ejemplo, como una sal de calcio. La enzima inactiva puede proporcionarse como una mezcla con un ión de metal, o puede proporcionarse como una composición separada. Si se proporciona como una composición separada, tales como en la forma de una composición líquida concentrada o en forma liofilizada o en polvo, la adición de el ión de metal a la enzima resultará en una enzima activada.

Generalmente, la activación se alcanza al exponer una enzima inactiva a un catión de metal, por ejemplo Ca^{2+}, a una concentración suficiente para activación. Cantidades precisas pueden determinarse de forma empírica o se conocen para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, la activación *in vitro* de µ-calpaína y m-calpaína requiere concentraciones de 10-50 y 300-500 µM de calcio, respectivamente (Hosfield et al. (1999) The EMBO J., 18: 6880-6889.) Los ensayos para actividad enzimática pueden realizarse para determinar concentraciones óptimas. Típicamente, para los propósitos en la presente, las enzimas activables que degradan matriz incluyen aquellas que requieren concentración suficiente de un ión de metal para la activación a una concentración que excede el nivel fisiológico del ión de metal presente en el intersticio. Para el caso de µ-calpaína y m-calpaína, los niveles de calcio requeridos para la activación exceden los niveles fisiológicos (ver por ejemplo, Patente E.U.A. No. 6,620,592; Hosfield et al. (1999) The EMBO J., 18: 6880-6889.)

En general, la enzima inactiva se empaca o se proporciona

de manera que hay iones de metal insuficientes para disparar la activación de enzima. Por lo tanto, donde la enzima inactiva se proporciona como una composición separada del activador de ión de metal, puede ser necesario agregar ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido etilen glicol tetraacético (EGTA) (concentraciones desde alrededor de 5 hasta alrededor de 100 mM o superiores dependiendo de la aplicación) para vincular cualquier Ca2+ u otro ión de metal para prevenir el disparo de la reacción de activación hasta que se desee. La reacción de activación puede entonces dispararse al agregar Ca^{2+} (u otro catión de metal) a una concentración suficiente para vencer los efectos del quelador. Las cantidades precisas pueden determinarse de forma empírica.

Dependiendo de la enzima, la activación temporal puede alcanzarse al descontinuar simplemente la exposición a un ión de metal. Por ejemplo, la activación sostenida de calpaína requiere la presencia de calcio. De esta manera, una forma inactiva de calpaína puede activarse al agregar Ca^{2+}, y la mezcla resultante, ya sea en la misma composición o separada, pueden administrarse al intersticio de un órgano o tejido. Durante la administración, sin embargo, la concentración efectiva de calcio requerido para continuar la activación no está más disponible; la enzima activante resultante regresará finalmente a su estado inactivo. En otros ejemplos, la regulación temporal de una enzima que requeriere un ión de metal para la activación puede controlarse por la administración de un quelador de metal u otro agente reversible.

c. Condición Activante - Agente Reductor

Se proporcionan en la presente una composición, combinaciones, recipientes y métodos que contienen enzimas activables que degradan matriz que requieren la exposición a un agente reductor que contiene tiol o sin tiol apropiado, por ejemplo, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) o cisteína, para activación. Una de tal enzima ejemplar es catepsina L, que requieren agente reductor para activación. El agente reductor puede proporcionarse en la forma de una composición acuosa, por ejemplo, como cisteína. La enzima inactiva puede proporcionarse como una mezcla con un agente reductor, o puede proporcionarse como una composición separada. Si se proporciona como una composición separada, tal como en la forma de una composición líquida concentrada o en forma liofilizada o en polvo, la adición del agente reductor a la enzima resultará en una enzima activada. El agente reductor puede agregarse antes de, simultáneamente, subsecuentemente o intermitentemente durante la administración de la enzima.

Generalmente, la activación se alcanza al exponer una enzima inactiva a un agente reductor, por ejemplo cisteína, a una concentración suficiente para activación. Las cantidades precisas puede determinarse de forma empírica o se conocen para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, la activación *in vitro* de catepsina L generalmente requiere 1-50 mM de cisteína. Los ensayos para actividad enzimática pueden realizarse para determinar concentraciones óptimas. Típicamente, para los propósitos en la presente, las enzimas activables que degradan matriz incluyen aquellas que requieren concentración suficiente

de un agente reductor para la activación a una concentración que excede el nivel fisiológico del agente reductor presente en el intersticio.

En general, la enzima inactiva se empaca o se proporciona de manera que hay una concentración de agente reductor insuficiente para disparar la activación de enzima. La reacción de activación puede entonces dispararse al agregar cisteína (u otro agente reductor) a una concentración suficiente para recuperar la actividad de la enzima. Las cantidades precisas pueden determinarse de forma empírica.

Dependiendo de la enzima, la activación temporal puede alcanzarse al descontinuar simplemente la exposición a agente reductor. Por ejemplo, la activación sostenida de catepsina L requiere la presencia de cisteína o TCEP. De esta manera, una forma inactiva de catepsina L libre de su prosegmento puede activarse al agregar cisteína, y la mezcla resultante, ya sea en la misma composición o separada, puede administrarse al intersticio de un órgano o tejido. Durante la administración, sin embargo, la concentración efectiva de cisteína requerida para continuar la activación no está más disponible; la enzima activante resultante regresará finalmente a su estado inactivo. En otros ejemplos, la regulación temporal de una enzima que requeriere un agente reductor para la activación puede controlarse por la administración de un agente de inversión tal como glutationa oxidante.

d. Condición Activante - Temperatura

Se proporcionan en la presente mutantes de enzima sensibles a la temperatura (ts) de enzimas que degradan matriz

(tsAMDE) que degradan uno o más componentes de la matriz extracelular (ECM) en una manera dependiente de la temperatura. En particular, los mutantes proporcionados en la presente degradan un colágeno. En algunos ejemplos, los mutantes exhiben actividad superior a temperaturas más bajas (por ejemplo 25°C) entonces a temperaturas más altas, por ejemplo, temperaturas fisiológicas (por ejemplo 37°C). En otros ejemplos, los mutantes exhiben actividad superior a temperaturas fisiológicas que a temperaturas más bajas. De esta manera, la activación del tsAMDE, por ejemplo, tsMMPs, durante la administración al cuerpo, puede controlarse temporalmente y condicionalmente en virtud de los cambios en temperatura. La actividad de la enzima descontrolada puede ser altamente disruptiva a la integridad del tejido. En virtud de la activación condicional de tsAMDE activatable, se alcanza la activación temporalmente, por ello se regula la duración de la acción enzimática en los componentes de matriz extracelular (ECM) para reducir los efectos secundarios perjudiciales asociados con activación de enzimas prolongada indeseada. Esta es una ventaja del actual tsAMDE, por ejemplo tsMMPs, sobnre tratamiento de colagenasa existente para tratar enfermedades o afecciones mediadas por ECM. Por lo tanto, una ventaja de tales mutantes es que su actividad puede regularse, por ello se permite el uso de tsAMDE para tratar enfermedades y/o afecciones de la ECM.

Los mutantes tsAMDEs, por ejemplo tsMMPs, proporcionados en la presente incluyen aquellos que se modifican para ser sensibles a la temperatura, por ejemplo, por sustitución, inserción, o reemplazo de aminoácidos. Generalmente los

0032

tsAMDEs contienen uno o más reemplazos de aminoácidos en su secuencia primaria lo que vuelve la proteína más activa a temperaturas permisibles que a temperaturas no pérsibles. Los tsAMDEs proporcionados en la presente pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1 1, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más modificaciones de aminoácidos. En particular, los tsAMDEs proporcionados en la presente contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 modificaciones de aminoácidos. Los tsAMDEs, por ejemplo tsMMPs, se proporcionan en la presente activables a una temperatura permisible, pero son menos activos o inactivos a otras temperaturas no permisibles. Los tsAMDEs proporcionados en la presente tienen una relación de actividad a una temperatura permisible comparado con una temperatura no permisible que es o está alrededor de 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más. De esta manera, la actividad de los tsAMDEs proporcionados en la presente a la temperatura no permisible es o está alrededor de 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% o menos de la actividad a una temperatura permisible.

Por ejemplo, los AMDEs que son normalmente activos a temperatura fisiológica (por ejemplo 37°C) se modifican y las enzimas seleccionadas que son activas a temperaturas más bajas (por ejemplo menos de 37°C; por ejemplo a o alrededor de 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C o 30°C), pero que son menos activos o inactivos a temperatura fisiológica. Tales enzimas modificadas pueden usarse como

00133

enzimas activables que degradan matriz (AMDE) donde la condición de activación es temperatura baja. La activación de la enzima se controla temporalmente conforme la temperatura *in vitro* regresa a la temperatura fisiológica de 37°C. De esta manera, por ejemplo, los tsAMDEs se proporcionan en la presente activos a una temperatura permisible que es o está alrededor de 25°C, pero son menos activos a temperaturas más altas tales como a o alrededor de 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C o 39°C. Los tsAMDEs proporcionados en la presente tienen una relación de actividad a una temperatura permisible baja (por ejemplo menos de 37°C, tales como a o alrededor de 25°C) comparado con una temperatura no permisible de o alrededor de 34°C ó 37°C, por ejemplo, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C o 39°C, que es o está alrededor de 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más. De esta manera, la actividad de los tsAMDEs proporcionados en la presente a la temperatura no permisible de o alrededor de 34°C ó 37°C es o está alrededor de 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1 %, 0.5% o menos de la actividad en la temperatura permisible a o alrededor de 25°C.

Los tsAMDEs, por ejemplo tsMMPs, proporcionados en la presente mantienen una o más actividades de enzima tipo natural, por ejemplo, actividad enzimática para desdoblamiento de un componente de ECM tales como colágeno. Por ejemplo, los tsAMDEs proporcionados en la presente mantiene una actividad en la temperatura permisible que es o está alrededor de 30%, 40%,

50%, 60%,70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 140%, 150% o más la actividad de AMDE tipo natural en la temperatura permisible. Generalmente, los tsAMDEs proporcionados en la presente, sin embargo, son menos activos que la enzima tipo natural a la temperatura no permisible más alta, por ejemplo temperatura fisiológica. Por ejemplo, los tsAMDEs proporcionados en la presente exhiben 95%, 90%, 80%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, generalmente 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, o 5% de actividad residual de la enzima tipo natural a temperatura fisiológica (por ejemplo 34 o 37°C).

Donde la condición activante es temperatura, un activador puede proporcionarse que expone los tsAMDEs a la temperatura permisible requerida para activación. La exposición al activador puede ser *in vitro* o *in vitro*. El activador puede exponerse a los tsAMDEs antes de, simultáneamente, subsecuentemente o intermitentemente durante la administración *in vitro*. El activador puede proporcionar el requisito de frío o calor requerido para activación. Por ejemplo, donde la condición activante es temperatura baja, el activador puede proporcionarse como una solución amortiguadora fría o como un empaque de hielo para aplicarse al sitio de administración. Donde la condición activante es calor, el activador puede proporcionarse como una solución amortiguadora de calentamiento o como un paquete de calor para aplicarse al sitio de administración. La condición activante también puede proporcionarse al almacenar el tsAMDE en la temperatura permisible inmediatamente y justo antes del uso. La duración de

la exposición al activador puede ser continua, puede ser por un tiempo determinado, o puede ser intermitente (por ejemplo, si los tsAMDEs son reversibles). De esta manera, el periodo de tiempo que permite la activación es flexible y puede adaptarse a la enzima particular que se usa, la enfermedad o afección a tratarse, el sitio de administración u otros factores. Está dentro del nivel de experiencia del técnico para determinar la duración de la exposición al activador.

En ausencia de la exposición al activador que proporciona la condición activante, el tsAMDE presente a la temperatura no permisible son inactivos o sustancialmente inactivo comparado con la actividad en la temperatura permisible. La condición activante de una temperatura permisible (por ejemplo temperatura baja) no se presenta normalmente en el sitio de administración que permite la regulación temporal de, y alteración de, los parámetros fisiológicos de órganos y tejidos, tales como el intersticio que exhibe una temperatura fisiológica de aproximadamente 37°C. Bajo condiciones fisiológicas normales, la temperatura del intersticio es aproximadamente 37°C. De esta manera, por ejemplo, los tsAMDEs activos a temperaturas bajas, cuando se presenta en el intersticio normalmente sería catalíticamente inactivo debido a la temperatura fisiológica del intersticio. Cuando la temperatura del intersticio se vuelve temporalmente fría, por ejemplo, por exposición a una solución amortiguadora fría o a un paquete frío administrado en la superficie adyacente, los tsAMDEs cuando se administran al intersticio se activarán. Cuando la temperatura se incrementa y regresa a niveles

fisiológicos, entonces los tsAMDEs se vuelven inactivos o sustancialmente inactivos y cesan de ejercer su actividad enzimática. Por lo tanto, al tomar ventaja del requerimiento para condiciones activantes exógenas, los tsAMDEs son activables y pueden hacerse temporalmente activos por una duración limitada durante el uso, tal como durante la administración *in vitro* al cuerpo.

Los tsAMDEs proporcionados en la presente incluyen aquellos que se inactivan irreversiblemente después de la exposición temperaturas no permisibles. Tales mutantes son activos cuando se expone condiciones de temperatura permisible (por ejemplo 25°C), pero son menos activos o inactivos cuando la temperatura se altera a temperaturas no permisibles (por ejemplo 37°C, tal como la que puede ocurrir durante la administración *in vitro* al cuerpo y la remoción de un activador exógeno (por ejemplo empaque frío)). Por ejemplo, durante el regreso a condiciones permisibles, los polipéptidos tsAMDEs irreversibles proporcionados en la presente exhiben a o alrededor de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 105%, 110%, 115%, ó 120% la actividad a temperaturas no permisibles. La actividad no es reversible.

También se proporcionan en la presente tsAMDEs que son reversiblemente inactivos después de la exposición a una temperatura no permisible. Tales mutantes son activos cuando se expone a una condición de temperatura permisible, pero son menos activos o inactivos cuando la temperatura se altera a temperaturas no permisibles. Durante la exposición renovada a una condición activante proporciona la temperatura permisible

(por ejemplo empaque frío), la actividad de los tsAMDEs se restaura, por ello vuelve la enzima suficientemente activa para degradar uno o más componentes de la ECM. Por ejemplo, durante el regreso a condiciones permisibles desde condiciones no permisibles, los polipéptidos tsAMDEs reversibles proporcionados en la presente exhiben a o alrededor de 120%, 125%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 200% o más la actividad a temperaturas no permisibles.

Típicamente, los tsAMDEs proporcionados en la presente son zimógenos (que contienen un propéptido) o enzimas procesadas (que carecen de un propéptido), o formas catalíticamente activas de los mismos. Como se discute enseguida, la mayoría de las enzimas, incluyendo MMPs, son zimógenos y requieren un evento de procesamiento inicial para actividad al remover el segmento de propéptido del extremo de terminal N del polipéptido. El agente de procesamiento, tal como una proteasa o agente químico, inicia directamente o indirectamente uno o más eventos de desdoblamiento para generar una enzima activa en virtud de la remoción del segmento de propéptido y/o cambios conformacionales que exponen el sitio activo de la enzima. Por lo tanto, normalmente, durante el procesamiento de una enzima a una forma madura, la enzima es activa. La actividad de una enzima procesada no es reversible, por ello llevando a una degradación descontrolada de la ECM durante la administración de la enzima procesada al cuerpo. Se contempla en la presente que la modificación de la enzima para conferir adicionalmente sensibilidad a la temperatura proporciona un mecanismo para controlar condicionalmente y temporalmente la activación de la

enzima para evitar la activación continuada de la forma procesada.

Cualquier AMDE, ya sea sintética o aislada de fuentes naturales, tales como aquellas establecidas en la Tabla 3 o en otro lugar en la presente, forma de zimógenos de la misma, forma maduras de la misma que carecen del propéptido, y formas catalíticamente activas incluyen polipéptidos que contienen sólo el dominio catalíticamente activo, y variantes alélicas o de especies u otras variantes de los mismos, o cualquiera conocido por aquellos expertos en la técnica pueden modificarse para ser sensibles a la temperatura y se pretende el uso en las composiciones, combinaciones, métodos y aparatos proporcionados en la presente, de manera que la enzima es activable debido al requerimiento de una condición activante de temperatura. Alguien de experiencia en la técnica conoce o identificaría tsAMDEs. Por ejemplo, alguien de experiencia en la técnica usaría técnicas de biología molecular de rutina para introducir mutaciones de aminoácidos en una enzima que degrada la matriz, y prueba para cada uno para activación de enzima bajo temperatura permisible y temperaturas no permisibles para evaluar el requerimiento de una condición activante exógena para activación sostenida o reversible de cualquier enzima deseada. Los ensayos para activación de enzima ejemplares se proporcionan en la presente y se conocen en la técnica.

Por lo tanto, los tsAMDEs proporcionados en la presente incluyen formas de zimógenos (por ejemplo proenzima), enzimas activas que carecen de propéptido, y polipéptidos que contienen sólo los dominios catalíticamente activos de los mismos de

manera que los tsMMPs exhiben actividad enzimática en la temperatura permisible. Por lo tanto, la modificación de la enzima está en una forma activa de los mismos. Los ejemplos de tales tsAMDEs es un tsMMP-1. El tsMMP-1 proporcionado en la presente contiene una o más modificaciones de aminoácidos en su secuencia primaria que corresponde a reemplazos de aminoácidos en un MMP-1 de tipo natural establecido en SEQ ID NO: 327. Las modificaciones ejemplares se describen enseguida. Los mutantes de tsMMP-1 proporcionados en la presente incluyen aquellos que son zimógenos o aquellos que son enzimas activas que carecen de propéptido de manera que tales formas contienen la mutación. El zimógeno o polipéptidos activos proporcionados en la presente incluyen aquellas que son de longitud completa, incluyendo todo o una porción de la ligadura rica en prolina o el dominio de enlace de hemopexina, carece de todo o una porción de ligadura rica en prolina o el dominio de enlace de hemopexina, o polipéptidos que incluyen sólo dominios catalíticamente activos de los mismos (por ejemplo que corresponde a los aminoácidos 81-242 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 327) de manera que el tsMMP-1 mantiene la actividad enzimática en la temperatura permisible.

Se entiende que cuando se proporciona en forma de zimógeno, los tsAMDEs son inactivos y que el procesamiento por el agente de procesamiento es requerido para actividad. Generalmente, el procesamiento de la enzima se efectúa antes del uso, tales como antes de la administración *in vitro*. El agente de procesamiento puede aplicarse simultáneamente, intermitentemente o subsecuentemente para exposición de los

tsAMDEs a la condición activante (por ejemplo temperatura baja) y administration al cuerpo. Generalmente, el agente de procesamiento se elige de manera que es aceptable para administración a un sujeto. Si se desea, el agente de procesamiento puede purificarse sacando de la enzima, por ejemplo por diálisis u otro método de purificación, antes de la administración. De esta manera, para formas de zimógenos de la enzima, se requieren dos etapas para activación: 1) la exposición al agente de procesamiento; y 2) la exposición a una condición activante. Si está en un zimógeno o forma procesada, la exposición de los tsAMDEs a un activador en la temperatura permisible controla temporalmente la actividad de un tsAMDE.

Los tsAMDEs pueden modificarse además para alterar cualquiera de una o más propiedades o actividades. Por ejemplo, las propiedades o actividades alteradas incluyen, pero no se limitan a, modificación que vuelve la enzima más estable, alterar la especificidad del sustrato y/o incrementar la resistencia a uno o más inhibidores. Por ejemplo, como se describe en otro lugar en la presente, los tsAMDEs pueden modificarse para alterar su especificidad al sustrato. Por ejemplo, una enzima pueden modificarse para tener especificidad incrementada para un sustrato particular. De esta manera, por ejemplo, un tsAMDE, que exhibe especificidad al sustrato para colágeno tipo I y tipo IV pueden modificarse de manera que tiene especificidad al sustrato incrementada para colágeno tipo I, y no colágeno tipo IV, y al contrario. Si se desea, la estabilidad de la enzima también puede incrementarse por pegilación o glicosilación de la enzima. Las modificaciones de

polipéptidos pueden alcanzarse por técnicas de biología molecular de rutina, y están dentro de la experiencia de alguien en la técnica. Para los propósitos en la presente, los tsAMDEs modificados mantienen una o más actividades de la enzima tipo natural en la temperatura permisible. La actividad mantenida puede ser 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, o más actividad de el MMP tipo natural en la temperatura permisible. Las enzimas modificadas pueden probarse para su especificidad al sustrato usando ensayos de rutina para desdoblamiento de sustrato tales como se describe en la presente, o conocidos en la técnica. Por ejemplo, el desdoblamiento del sustrato puede evaluarse en péptidos fluorogénicos o en proteínas purificadas. El desdoblamiento puede evaluarse usando ensayos *in vitro* o *in vitro*. Por ejemplo, el desdoblamiento puede evaluarse al incubar la enzima con el sustrato, y luego correr la mezcla en un gel SDS-PAGE. La degradación puede evaluarse por Western Blot o usando teñidos de proteína estándar tales como Azul Coomasie o Reactivos de teñido de plata.

Los tsAMDEs se proporcionan en la presente como composiciones, combinaciones y recipientes. Los tsAMDEs se proporcionan en una cantidad terapéuticamente efectiva, que cuando se activa, degrada uno o más componentes de la ECM durante la administración, tales como durante la administración sub-epidérmica. Los tsAMDEs resultantes pueden usarse como terapéuticos para tratar enfermedades o afecciones mediadas por ECM.

Por ejemplo, los tsAMDEs se proporcionan en composiciones,

000142

combinaciones y/o recipientes con un activador que proporciona la condición activante. En algunos ejemplos, los tsAMDEs también se proporcionan en composiciones, combinaciones y/o recipientes con el agente de procesamiento. El activador y/o agente de procesamiento pueden estar en la misma composición o en composiciones separadas y en el mismo recipiente o recipientes separados con los tsAMDEs. Además, los tsAMDEs también pueden combinarse o proporcionarse en combinación, tal como en recipientes, con otros agentes tales como cualquiera de uno o más de un anestético, agente alfa-adrenérgico, agente dispersante, o agente terapéutico. Los tsAMDEs pueden proporcionarse en la misma composición o separada como de otros agentes y/o pueden proporcionarse en los mismos recipientes o separados.

Los tsAMDEs pueden proporcionarse como un líquido o en forma liofilizada a una concentración terapéuticamente efectiva. Alternativamente, los tsAMDEs puede proporcionarse como un líquido concentrado, de tal manera que la adición de una cantidad suficiente de activador que resulta en una concentración terapéuticamente efectiva de enzima. La enzimas puede proporcionarse como una solución o suspensión o encapsularse en un vehículo de suministro apropiado, tales como una liposoma, partícula de vidrio, tubo capilar, vehículo de suministro de fármaco, gelatina, gel, comprimido, cápsula, píldora, revestimiento de liberación temporalizada, así como preparación de parche transdérmico e inhaladores de polvo seco u otro de tales vehículos. El activador típicamente se proporciona como una solución o suspensión líquida para

administración en el intersticio ya sea solo o después de la reconstitución de y/o la exposición a los tsAMDEs. En algunos ejemplos, el activador se proporciona exógenamente y se aplica en el sitio de administración. Por ejemplo, un activador puede ser un empaque caliente o frío que puede aplicarse al sitio de administración, por ejemplo la piel, antes de, simultáneamente, subsecuentemente o intermitentemente después de la administración de los tsAMDEs. Como se describe enseguida, los kits que contienen estas combinaciones y también artículos de manufactura, tales como recipientes, también se proporcionan.

De esta manera, cuando se desea, la enzima tsAMDEs se somete a condiciones activantes en las cuales la enzima se expone a un activador para generar una enzima que es activa. La exposición a un activador puede alcanzarse *in vitro* o *in vitro*. Por ejemplo, donde una enzima activable y el activador se proporcionan de forma separada, pueden administrarse juntos o de forma separada. Donde se administra de forma separada, los tsAMDEs pueden administrarse simultáneamente, subsecuentemente o intermitentemente desde el activador. En otro ejemplo, los tsAMDEs, en una forma liofilizada o de líquido concentrado, pueden reconstituirse con el activador justo antes del uso. En tal ejemplo, la mezcla de los tsAMDEs y el activador se administra en conjunto. Tales métodos de la activación pueden determinarse de forma empírica por alguien de experiencia en la técnica, y pueden diferir dependiendo de la elección de la enzima y activador, y el método de tratamiento y régimen de tratamiento deseado.

La enzima activable que degrada la matriz puede

proporcionarse en un artículo o manufactura solo o en combinación con el activador. Por ejemplo, si la enzima se proporciona en combinación con el activador, un artículo de manufactura pueden contener una enzima, ya sea liofilizada o en forma de líquido, en un compartimiento, y un activador en un compartimiento adyacente. Los compartimientos puede ser separados por un miembro de división. Los artículos de manufactura pueden contener adicionalmente el agente de procesamiento. Tales artículos de manufactura se describen en otro lugar en la presente.

Las combinaciones de tsAMDEs y activador también pueden contener además otros agentes, dicutidos en detalle enseguida. Por ejemplo, además del activador y tsMMP, se proporcionan combinaciones que contienen uno o más de un anestético, vasoconstrictor, agente dispersante u otro agente terapéutico.

i. Mutantes de Matriz de Metaloproteasa Sensibles a la Temperatura

Se proporcionan en la presente polipéptidos tsMMP, por ejemplo polipéptidos tsMMP-1, que son sensibles a la temperatura en virtud de modificaciones en la secuencia primaria del polipéptido comparado con un polipéptido MMP no modificado. El polipéptido tsMMP exhibe actividad enzimática incrementada a una temperatura permisible comparado con la actividad del tsMMP polipéptido a una temperatura no permisible. Por ejemplo, polipéptidos tsMMP proporcionados en la presente exhiben actividad enzimática incrementada a una temperatura baja que es menos de 37°C, por ejemplo, que es a o alrededor de 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C,

28°C, 29°C ó 30°C, en particular a o alrededor de 25°C comparado con una temperatura alta no permisible que es a o alrededor de 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C ó 39°C, en particular a o alrededor de 34°C ó 37°C. Debido a la actividad de polipéptidos tsMMP dependiente de la temperatura, la actividad de MMP puede ser controlada condicionalmente, por ello se regula temporalmente la activación para prevenir la degradación prolongada e indeseada de la ECM. En particular, tales polipéptidos tsMMP pueden ser usados en usos, procesos o métodos para tratar enfermedades o afecciones de la ECM, por ejemplo, para tratar enfermedades o afecciones mediadas por colágeno tales como celulosis.

Los polipéptidos tsMMP proporcionados en la presente tienen una relación de actividad a una temperatura permisible comparado con una temperatura no permisible que es o está alrededor de 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más. De esta manera, la actividad de polipéptidos tsMMP proporcionados en la presente a la temperatura no permisible es o está alrededor de 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% o menos de la actividad a una temperatura permisible. Los polipéptidos tsMMPs proporcionados en la presente mantienen una o más actividades de polipéptido MMP tipo natural, por ejemplo, actividad enzimática para desdoblamiento de un componente de ECM tal como colágeno. Típicamente, tal actividad es sustancialmente sin cambio (menos de 1%, 5%, 10%, 20% o 30% de cambio) comparado con una proteína

de inicio o tipo natural. En otros ejemplos, la actividad de un polipéptido MMP modificado se incrementa o se reduce como se compara con un polipéptido MMP-1 tipo natural o de partida. La actividad se evalúa en la temperatura permisible y es comparado con la actividad de un polipéptido MMP no modificado, de partida en la temperatura permisible o una temperatura no permisible. Por ejemplo, un polipéptido tsMMP proporcionadas en la presente mantiene una actividad en la temperatura permisible que es o está alrededor de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 140%, 150% o más la actividad de MMP-1 tipo natural en la temperatura permisible o temperatura no permisible. La actividad puede evaluarse *in vitro, ex vivo* o *in vitro* y puede ser comparada con la del polipéptido MMP no modificado, tales como por ejemplo, un polipéptido MMP inactivo establecido en SEQ ID NO: 327 activado por el agente de procesamiento, o cualquier otro polipéptido MMP conocido por alguien de experiencia en la técnica que se usa como el material de partida. Como se discute en otro lugar en la presente, se entiende que la forma inactiva de zimógeno de un MMP o un MMP modificado deberá procesarse hasta una forma activa antes del uso o medición de la actividad.

Las modificaciones en un polipéptido MMP pueden hacerse para cualquier forma de un polipéptido MMP, incluyendo formas inactivas o activas, variantes alélicas y de especies, variantes de empalme, variantes conocidas en la técnica, o polipéptidos MMP híbridos o quiméricos. Por ejemplo, las modificaciones proporcionadas en la presente pueden hacerse en cualquier polipéptido MMP ejemplar establecido en la Tabla 3,

incluyendo polipéptidos precursores, formas de proenzima inactivas, forma de zimógenos, formas activas de los mismos y variantes alélicas o de especies de los mismos. Por ejemplo, un MMP ejemplar es un polipéptido MMP-1 precursor establecido en SEQ ID NO:98, un MMP-1 de pro-enzima inactiva que contienen el propéptido establecido en SEQ ID NO: 327, un polipéptido MMP-1 maduro que carece del propéptido establecido en SEQ ID NO: 99, o cualquier variante de especies, alélica o modificada y fragmentos activos de los mismos que tienen 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad de secuencia para cualquiera de los polipéptidos MMP-1 establecidos en SEQ ID NOS: 98-99, 327. Las modificaciones también pueden ser en un polipéptido MMP que carecen de uno o más dominios, de manera que el polipéptido MMP es sensible a la temperatura (es decir contiene la modificación) y mantiene la actividad enzimática. Por ejemplo, las modificaciones pueden ser en un polipéptido MMP que incluye sólo el dominio catalítico (por ejemplo en MMP-1 que corresponde a aminoácidos 81-242 del polipéptido MMP-1 de proenzima establecido en SEQ ID NO:327). Las modificaciones también puede hacerse en un polipéptido MMP que carece de todo o una porción de ligadura rica en prolina (por ejemplo en MMP-1 que corresponde a aminoácidos 243-258 del polipéptido MMP-1 de proenzima establecida en SEQ ID NO: 327) y/o que carecen de todo o una porción del dominio de enlace de hemopexina (por ejemplo en MMP-1 que corresponde a aminoácidos 259-450 del polipéptido MMP-1 de proenzima establecida en SEQ ID NO: 327). Las variantes alélicas de los polipéptidos MMP-1 incluyen, pero no

se limitan a, cualquiera del polipéptido MMP-1 que contiene cualquiera de uno o más variantes de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 537. Las variantes de especies ejemplares para modificación en la presente incluyen, pero no se limitan a, cerdo, conejo, bovino, caballo, rata, y ratón, por ejemplo, establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 527-532. Las modificaciones en un polipéptido MMP proporcionadas en la presente para conferir sensibilidad a la temperatura puede hacerse para un polipéptido MMP que también contiene otras modificaciones, tales como aquellas descritas en la técnica, incluyen la modificación de la secuencia primaria y las modificaciones no en la secuencia primaria del polipéptido. Se entiende que modificaciones en una variante alélica o de especies u otra variante incluye la modificación en cualquier forma de la misma tales como una forma activa o inactiva, una forma que incluye sólo el dominio catalítico, o una forma que carece de todo o una porción de ligadura rica en prolina o el dominio de enlace de hemopexina de manera que la forma modificada contienen la modificación sensible a la temperatura y es sensible a la temperatura. Como se discute en la presente enseguida, las modificaciones MMP-1 correspondientes pueden hacerse a formas similares de otros polipéptidos MMP.

Por lo tanto, los polipéptidos MMP resultantes modificados incluyen aquellos que son proenzimas de zimógeno inactivas y aquellos que son polipéptidos activos. Por ejemplo, cualquier polipéptido modificado proporcionados en la presente que es una proenzima de zimógeno puede activarse por el agente de procesamiento para generar un polipéptido MMP activo. Los

agentes de procesamiento incluyen, pero no se limitan a, cualquiera establecido en la Tabla 3A enseguida. La activación de polipéptidos MMP-1 se exhiben típicamente en su forma activa después del desdoblamiento del propéptido y/o procesamiento intermolecular e intramolecular de la enzima para remover el propéptido (ver por ejemplo Visse et al. (2003) Cir. Res., 92:827-839; Khan et al. (1998) Protein Science, 7:815-836; Okada et al. (1988) Biochem J, 254:731-741; Okada & Nakanashi (1989) FEBS Lett., 249:353-356; Nagase et al. (1990) Biochemistry, 29:5783-5789; Koklitis et al. (1991) Biochem J, 276:217-221 ; Springman et al. (1990) PNAS, 87:364-8; Murphy et al. (1997) Matrix Biol., 15:51 1-8).

Tabla 3A. Activadores de Zimógeno	
Compuestos Proteolíticos	
Proteasas	Plasmina
	Calicreína de plasma
	Tripsina-1 (Tripsina I)
	Tripsina-2 (Tripsina II)
	Neutrofil elastasa
	Catepsina G
	Triptasa
	Quimasa
	Proteinasa-3
	Furina
	uPA
	MMPs, incluyendo MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-26, y MT1-MMP
Compuestos No Proeolíticos	
Agentes que modifican tiol	Acetato 4-aminofenilmercúrico (AMPA)
	HgCl2
	N-etilmaleimida

Perturbadores de conformación	Dodecil sulfato de sodio (SDS)
	Agentes caotrópicos
Otros agentes químicos	Glutationa oxidada (GSSG)
	Oxígeno reactivo
	Sales Au(I)
Otras Condiciones Activantes	
	pH ácido
	Calor

Las modificaciones proporcionadas en la presente de un polipéptido de referencia no modificado, de partida incluyen reemplazos de aminoácidos o sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, los polipéptidos tsMMP incluyen aquellos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más posiciones modificadas. También se proporcionan en la presente polipéptidos tsMMP modificados con dos o más modificaciones comparado con un polipéptido MMP-1 de referencia de partida. Los polipéptidos MMP modificados incluyen aquellos con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 , 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más posiciones modificadas. Cualquier modificación proporcionada en la presente puede ser combinada con cualquier otra modificación conocida por alguien de experiencia en la técnica de manera que el polipéptido MMP modificado reusltante mantiene su actividad enzimática cuando está en su forma activada de manera que la actividad enzimática es mayor en la temperatura permisible comparada con la temperatura no permisible. Los polipéptidos MMP modificados proporcionados en la presente pueden evaluarse para actividad

enzimática bajo varias condiciones (por ejemplo temperaturas permisibles y no permisibles) para identificar aquelloos que mantienen actividad enzimática.

Las modificaciones proporcionadas en la presente pueden hacerse por técnicas de ADN recombinantes estándar tales como las que son de rutina para alguien de experiencia en la técnica. Cualquier método conocido en la técnica para efectuar la mutación de cualquiera de uno o más aminoácidos en una proteína objetivo pueden emplearse. Los métodos incluyen mutagénesis dirigida al sitio estándar (usando por ejemplo un kit, tal como QuikChange disponible de Stratagene) de moléculas de ácido nucleico codificadas, o por métodos de síntesis de polipéptido de fase sólida.

Otras modificaciones que están o no están en la secuencia primaria del polipéptido también pueden incluirse en un polipéptido MMP modificado, o conjugado del mismo, que incluye, pero no se limita a, la adición de una porción de carbohidrato, la adición de una porción de polietilen glicol (PEG), la adición de un dominio Fc, etc. Por ejemplo, tales modificaciones adicionales pueden hacerse para incrementar la estabilidad de la vida media de la proteína.

1) Modificaciones de tsMMP-1 Ejemplares

Se proporcionan en la presente polipéptidos MMP-1 modificados que contienen una o más modificaciones de aminoácidos en un polipéptido MMP-1 no modificado, de partida. El reemplazo o reemplazos de aminoácidos puede ser en cualquiera de una o más posiciones que corresponde a cualquiera de las siguientes posiciones: 84, 85, 95, 98, 99, 100, 103,

000152

104, 105, 106, 109, 110, 111, 1 12, 118, 123, 124, 126, 147, 150, 151 , 152, 153, 155, 156, 158, 159, 170, 171, 176, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 185, 187, 188, 189, 190, 191 , 192, 194, 195, 197, 198, 206, 207, 208, 210, 21 1, 212, 218, 223, 227, 228, 229, 230, 233, 234, 237, 240, 251, 254, 255, 256, 257 y 258 de un polipéptido MMP-1 no modificado que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 327, o en una posición correspondiente en una variante alélica o de especies u otra variante de un polipéptido MMP-1 que tiene al menos o al menos alrededor de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a un polipéptido MMP-1 establecida en SEQ ID NO: 327. Los reemplazos de aminoácidos incluyen reemplazos de aminoácidos a un residuo de aminoácido ácido (D o E); básico (H, K o R); neutro (C, N, Q, T, Y, S, G) o hidrofóbico (F, M, W, I V, L A, P). Por ejemplo, los reemplazos de aminoácidos en las posiciones notadas incluyen reemplazo por residuos de aminoácidos E, H, R, C, Q, T, S, G, M, W, I, V, L , A, P , N, F, D, Y o K. Tales polipéptidos MMP-1 modificados incluyen polipéptidos MMP-1 que son sensibles a la temperatura en virtud de la actividad incrementada a la temperatura permisible de 25°C comparado con temperaturas no permisibles de 34°C ó 37°C.

Por ejemplo, los polipéptidos MMP-1 modificados proporcionadas en la presente pueden incluir polipéptidos que tiene una modificación de aminoácido que corresponde a cualquiera de uno o más las modificaciones de T84F (es decir reemplazo de T por F en una posición que corresponde a la posición 84 de un polipéptido MMP-1 establecido en SEQ ID

NO:327), E85F, L95K, L951, R98D, I99Q, E100V, E100R, E100S, E100T, E100F, E100I, E100N, T103Y, P104A, P104M, D105A, D105F, D105G, D105I, D105L, D105N, D105R, D105S, D105T, D105W, D105E, L106C, L106S, A109H, D110A, V111R, D112S, A118T, S123V, N124D, T126S, G147P, R150P, R150V, R150D, R150I, R150H, D151G, N152A, N152S, S153T, F155L, F155A, D156H, D156L, D156A, D156W, D156V, D156K, D156T, D156R, D156M, P158T, P158G, P158K, P158N, G159V, G159T, G159M, G159I, G159W, G159L, G159C, P170D, P170A, G171P, G171E, G171D, A176F, A176W, F178T, F178L, D179N, D179V, D179C, E180Y, E180R, E180T, E180F, E180G, E180S, E180N, E180D, E181T, D181L, D181K, D181C, D181G, E182T, E182Q, E182M, E182G, E183G, R183S, T185R, T185Y, T185H, T185G, T185V, T185Q, T185A, T185E, T185D, N187R, N187M, N187W, N187F, N187K, N187I, N187A, N187G, N187C, N187H, F188V, R189N, R189T, R189Q, E190G, E190Y, E190D, Y191V, N192H, N192S, N192D, N192C, H194P, R195C, R195W, R195L, R195G, R195Q, R195A, R195D, R195V, A197C, A197V, A198G, A198L, A198M, G206A, G206S, L207R, L207V, L207I, L207G, S208R, S208L, S210V, S210A, T211L, D212G, D212H, Y218S, F223C, F223E, F223G, F223A, F223S, F223K, F223M, V227C, V227D, V227E, V227L, V227S, V227W, V227G, V227H, V227Q, V227R, Q228P, L229A, L229T, L29I, A230V, D233E, I234A, I234T, I234E, I234Q, I237L, I237W, I237N, I240S, I240A, I240C, 1251S, 1251W, Q254S, T255H, P256C, K257P, K257T y A258P. Los polipéptidos MMP-1 modificados ejemplares tienen una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 328-526 y formas activas y otras formas de los mismos, y variantes alélicas y de especies de los mismos.

En algunos ejemplos, tales polipéptidos MMP-1 modificados incluyen polipéptidos que tiene un reemplazo o reemplazos de

aminoácidos a cualquiera de uno o más posiciones que corresponde a cualquiera de las siguientes posiciones: 95, 100, 103, 105, 150, 151, 153, 155, 156, 159, 171, 176, 179, 180, 181, 182, 185, 187, 190, 191 , 192, 194, 195, 198, 206, 207, 210, 212, 218, 223, 227, 228, 229, 230, 233, 234, 237 y 240 de un polipéptido MMP-1 no modificado que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 327, o en una posición correspondiente en una variante alélica o de especies u otra variante de un polipéptido MMP-1 que tiene al menos o al menos alrededor de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a un polipéptido MMP-1 establecida en SEQ ID NO: 327. Por ejemplo, los polipéptidos MMP-1 modificados proporcionadas en la presente incluyen polipéptidos que tiene una modificación de aminoácido que corresponde a cualquiera de uno o más las modificaciones de L95K, E100V, T103Y, D105A, D105F, D105G, D105I, D105L, D105N, D105R, D105S, D105T, D105W, R150P, D151G, S153T, F155L, F155A, D156H, D156L, D156A, D156W, D156V, D156K, D156T, D156R, G159V, G159T, G171P, A176F, D179N, E180Y, E180R, E180T, E180F, E181T, D181L, D181K, E182T, E182Q, T185R, T185Y, T185H, T185G, T185V, T185Q, T185A, T185E, N187R, N187M, N187W, N187F, N187K, N187I, N187A, E190G, Y191V, N192H, N192S, N192D, N192C, H194P, R195C, R195W, R195L, R195G, R195Q, R195A, R195D, R195V, A198G, A198L, A198M, G206A, G206S, L207R, L207V, S210V, D212G, Y218S, F223C, F223E, F223G, F223A, F223S, V227C, V227D, V227E, V227L, V227S, V227W, Q228P, L229A, L229T, L229I, A230V, D233E, I234A, I234T, I234E, I234Q, I237L, I240S, I240A, e I240C. Tales polipéptidos MMP-1 modificados exhiben al menos

1.2 veces o más actividad en la temperatura permisible de 25°C comparado con las temperaturas no permisibles de 34°C o 37°C, por ejemplo, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más veces la actividad. Tales polipéptidos MMP-1 modificados ejemplares tienen una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 328, 331-340, 345-352, 354-357, 359, 363, 365, 368, 371, 373-374, 377-378, 380, 382-384, 388-395, 397-398, 401-419, 421-422, 424-426, 428-430, 433, 435, 437-450, 457-459, 462, 465-472, 477-478, 518, y formas activas y otras formas de los mismos, y variantes alélicas y de especies de los mismos.

En otros ejemplos, tales polipéptidos MMP-1 modificados incluyen polipéptidos que tiene un reemplazo o reemplazos de aminoácidos a cualquiera de una o más posiciones que corresponden a cualquiera de las siguientes posiciones: 95, 105, 150, 151, 155, 156, 159, 176, 179, 180, 181, 182, 185, 187, 195, 198, 206, 210, 212, 218, 223, 227, 228, 229, 230, 233, 234, y 240 de un polipéptido MMP-1 no modificado que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 327, o en una posición correspondiente en una variante alélica o de especies u otra variante de un polipéptido MMP-1 que tiene al menos o al menos alrededor de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia para un polipéptido MMP-1 establecida en SEQ ID NO: 327. Por ejemplo, polipéptidos MMP-1 modificados proporcionados en la presente incluyen polipéptidos que tiene una modificación de aminoácido que corresponde a cualquiera de

uno o más las modificaciones de L95K, D105A, D105F, D105G, D105I, D105L, D105N, D105R, D105S, D105T, D105W, R150P, D151G, F155A, D156K, D156T, D156L, D156A, D156W, D156V, D156H, D156R, G159V, G159T, A176F, D179N, E180Y, E180T, E180F, D181L, D181K, E182T, E182Q, T185R, T185H, T185Q, T185A, T185E, N187R, N187M, N187F, N187K, N187I, R195V, A198L, A198M, G206A, G206S, S210V, Y218S, F223E, V227C, V227E, V227W, Q228P, L229T, L229I, D233E, I234A, I234T, I234E, I240S, e I240C. Tales polipéptidos MMP-1 modificados exhiben al menos 1.5 veces o más actividad en la temperatura permisible de 25°C comparado con la temperatura no permisibles de 34°C ó 37°C, por ejemplo, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más veces la actividad. Tales polipéptidos MMP-1 modificados ejemplares tienen una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 328, 331-340, 345-346, 348-352, 534-357, 359, 363, 365, 368, 373-374, 377-378, 382-384, 388-391, 395, 397-398, 401-402, 404, 411, 415-419, 421-422, 430, 433, 437, 439-441, 443-444, 446-449, y formas activas y otras formas de los mismos, y variantes alélicas y de especies de los mismos.

En ejemplos adicionales, los polipéptidos MMP-1 modificados proporcionados en la presente incluyen polipéptidos MMP-1 modificados que son sensibles a la temperatura en la temperatura permisible de 25°C y exhiben al menos 30%, por ejemplo, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 140%, 150% o más actividad a 25°C comparado con MMP-1 tipo natural a 25°C. Tales polipéptidos MMP-1 modificados incluyen polipéptidos que tiene un reemplazo o reemplazos de aminoácidos

en cualquiera de una o más posiciones que corresponde a cualquiera de las siguientes posiciones: 95, 105, 150, 156, 159, 179, 180, 182, 185, 187, 195, 198, 212, 223, 227, 234, y 240 de un polipéptido MMP-1 no modificado que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 327, o en una posición correspondiente en una variante alélica o de especies u otra variante de un polipéptido MMP-1 que tiene al menos o al menos alrededor de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a un polipéptido MMP-1 establecida en SEQ ID NO: 327. Por ejemplo, los polipéptidos MMP-1 modificados proporcionados en la presente incluyen polipéptidos que tiene una modificación de aminoácido que corresponde a cualquiera de uno o más las modificaciones L95K, D105A, D105G, D105I, D105L, D105N, D105S, D105W, D105T, R150P, D156K, D156T, D156V, D156H, D156R, G159V, G159T, D179N, E180Y, E180T, E180F, E182T, T185H, T185Q, T185E, N187M, N187K, N1871, R195V, A198L, F223E, V227E, I234E e I240S. Tales polipéptidos MMP-1 ejemplares modificados tienen una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 328, 332-335, 337-340, 345, 349-352, 355, 359, 363, 368, 373-374, 377, 384, 388-389, 391, 397, 402, 404, 411, 416, 422, 430, 444, 449, o formas activas y otras formas de los mismos, y variantes alélicas y de especies de los mismos.

En particular, los polipéptidos MMP-1 modificados proporcionados en la presente tienen un reemplazo o reemplazos de aminoácidos en cualquiera de uno o más posiciones que corresponde a cualquiera de las siguientes posiciones: 95, 105, 150, 156, 159, 179, 180, 182, 185, 187, 198, 227, 234 y 240 de

000158

un polipéptido MMP-1 no modificado que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 327, o en una posición correspondiente en una variante alélica o de especies u otra variante de un polipéptido MMP-1 que tiene al menos o al menos alrededor de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a un polipéptido MMP-1 establecida en SEQ ID NO: 327. Tales polipéptidos MMP-1 modificados proporcionados en la presente incluyen polipéptidos que tiene una modificación de aminoácido que corresponde a cualquiera de uno o más las modificaciones L95K, D105I, D105N, D105L, D105A, D105G, R150P, D156R, D156H, D156K, D156T, G159V, G159T, D179N, E180T, E180F, E182T, T185Q, N187I, A198L, V227E, I234E e I240S. Más particularmente, los polipéptidos MMP-1 modificados proporcionados en la presente incluyen polipéptidos que tiene una modificación de aminoácido que corresponde a cualquiera de uno o más de las modificaciones L95K, D105N, R150P, D156K, D156T, G159V, D179N, E180T, A198L, V227E, e I240S.

Los polipéptidos MMP-1 modificados proporcionados en la presente incluyen aquellas que exhiben reversible o irreversible (también llamado no reversible) actividad dependiente de la temperatura. En todos los casos, los polipéptidos MMP-1 modificados proporcionadas en la presente exhiben actividad incrementada a una temperatura permisible (por ejemplo 25°C) comparado con temperaturas no permisibles (por ejemplo 34°C ó 37°C.) Para polipéptidos no reversibles, la exposición a la temperatura no permisible antes de, subsecuentemente o intermitentemente de la exposición a la

temperatura permisible vuelve al polipéptido irreversiblemente inactivos. De esta manera, un polipéptido MMP-1 modificado que se regresa a condiciones de temperatura permisibles, por ejemplo 25°C, exhiben la misma o similar actividad del polipéptido MMP-1 a temperaturas no permisibles, por ejemplo, 34°C ó 37°C. Por ejemplo, durante el regreso a condiciones permisibles, los polipéptidos MMP-1 modificados irreversibles proporcionados en la presente exhiben o alrededor de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 105%, 110%, 115%, o 120% la actividad a temperaturas no permisibles. Los polipéptidos MMP-1 modificados no reversibles ejemplares proporcionados en la presente incluyen polipéptidos que tiene una modificación de aminoácido que corresponde a cualquiera de una o más las modificaciones L95K, D1051, D105L, D105N, D105R, D105W, D151G, F155A, D156K, D156T, D156L, D156A, D156W, D156V, D156H, D156R, G159V, A176F, D179N, D181L, D181K, E182T, E182Q, T185R, N187F, N1871, G206A, G206S, V227C, V227E, Q228E, L229T, D233E, I234A, I234T, I234E, I240S, por ejemplo, cualquiera establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 328, 331- 332, 337-339, 346, 348, 349-352, 354-357, 363, 365, 368, 378, 382-384, 390, 401, 404, 417-418, 430, 433, 439-440, 443-444, 446-447, 449 o formas activas y otras formas de los mismos, y variantes alélicas y de especies de los mismos.

Para polipéptidos reversibles, la exposición a la temperatura no permisible antes de, subsecuentemente o intermitentemente desde la exposición a la temperatura permisible vuelve al polipéptido reversiblemente activo. De esta manera, un polipéptido MMP-1 modificado que que se regresa

a condiciones de temperatura permisibles recupera la actividad, y por ello exhibe actividad incrementada en la temperatura permisible comparado con la temperatura no permisible. En tales ejemplos, la actividad recuperada puede ser completa o es parcial. De esta manera, un polipéptido MMP-1 modificado que se regresa a condiciones de temperatura permisibles, por ejemplo 25°C, exhiben una actividad incrementada comparada con la actividad a temperaturas no permisibles, por ejemplo, 34°C o 37°C. Por ejemplo, durante el regreso a condiciones permisibles, los polipéptidos MMP-1 modificados reversibles proporcionados en la presente exhiben a o alrededor de 120%, 125%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 200% o más la actividad a temperaturas no permisibles. Los polipéptidos MMP-1 modificados no reversibles ejemplares proporcionados en la presente incluyen polipéptidos que tienen una modificación de aminoácido que corresponde a cualquiera de una o más modificaciones D105A, D105F, D105G, D105S, D105T, R150P, G159T, E180Y, E180T, E180F, T185H, T185Q, T185A, T185E, N187R, N187M, N187K, R195V, A198L, A198M, S210V, Y218S, F223E, V227W, L229I e I240C, por ejemplo, cualquiera establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 333-336, 340, 345, 359, 373-374, 377, 388-389, 391, 395, 397-398, 402, 411, 415-416, 419, 421-422, 437, 441, 448, o formas activas y otras formas de los mismos, y variantes alélicas y de especies de los mismos.

2) Combinaciones

Se proporcionan en la presente polipéptidos MMP-1 modificados que contienen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más modificaciones comparados

000160

con un polipéptido MMP-1 de partida o de referencia. Los polipéptidos MMP-1 modificados proporcionados en la presente pueden contener cualquiera de dos o más modificaciones proporcionadas anteriormente. Por ejemplo, los polipéptidos MMP-1 modificados proporcionados en la presente contienen reemplazos de aminoácidos en cualquiera de dos o más posiciones que corresponden a cualquiera de las siguientes posiciones: 84, 85, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 106, 109, 110, 111, 112, 118, 123, 124, 126, 147, 150, 151, 152, 153, 155, 156, 158, 159, 170, 171, 176, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 185, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 194, 195, 197, 198, 206, 207, 208, 210, 211, 212, 218, 223, 227, 228, 229, 230, 233, 234, 237, 240, 251, 254, 255, 256, 257 y 258 de un polipéptido MMP-1 no modificado que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 327, o en una posición correspondiente en una variante alélica o de especie u otra variante de un polipéptido MMP-1 que tiene al menos o al menos alrededor de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia a un polipéptido MMP-1 establecido en la SEQ ID NO: 327. Generalmente, tales mutantes de combinación son sensibles a la temperatura y exhiben actividad enzimática incrementada a una temperatura permisible comparado con la actividad del polipéptido tsMMP-1 en una temperatura no permisible. Típicamente, los mutantes de combinación también conservan su actividad en la temperatura permisible comparado con los polipéptidos MMP-1 de mutante sencillos únicamente o comparado con un polipéptido MMP-1 no modificado que no contiene los cambios de aminoácido (por ejemplo, un polipéptido

MMP-1 tipo natural establecido en la SEQ ID NO: 327 o formas activas u otras formas del mismo) en la temperatura permisiva o no permisiva.

Los mutantes de combinación MMP-1 ejemplares proporcionados en la presente contienen reemplazos de aminoácidos en cualquiera de las dos o más posiciones que corresponden a cualquiera de las siguientes posiciones: 95, 105, 150, 156, 159, 179, 180, 182, 185, 187, 198, 227, 234 y 240 de un polipéptido MMP-1 no modificado que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 327, o en una posición correspondiente en una variante alélica o de la especie u otra variante de un polipéptido MMP-1 que tiene al menos o al menos alrededor de 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia a un polipéptido MMP-1 establecida en la SEQ ID NO: 327. Por ejemplo, los polipéptidos MMP-1 modificados proporcionados en la presente incluyen polipéptidos que tienen modificación de aminoácido que corresponde a cualquiera de dos o más modificaciones L95K, D105I, D105N, D105L, D105A, D105G, R150P, D156R, D156H, D156K, D156T, G159V, G159T, D179N, E180T, E180F, E182T, T185Q, N1871, A198L, V227E, I234E y I240S. Más particularmente, polipéptidos MMP-1 modificados proporcionados en la presente incluyen polipéptidos que tienen modificación de aminoácido que corresponde a cualquiera de dos o más modificaciones L95K, D105N, R150P, D156K, D156T, G159V, D179N, E180T, A198L, V227E, y I240S. Se entiende que al menos dos diferentes posiciones se modifican en los mutantes de combinación proporcionados en la presente. Los polipéptidos

mutantes de combinación MMP-1 ejemplares se proporcionan en la presente establecidos en la Tabla 27 en el Ejemplo 29.

3) Modificaciones Adicionales

Cualquier MMP modificada, por ejemplo cualquier MMP-1 modificado, polipéptido proporcionados en la presente también pueden contener una o más de otras modificaciones descritas en la técnica. Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, cualquier sustitución de aminoácido, eliminación o inserción conocida en la técnica. Además que contienen una modificación descrita anteriormente, cualquier polipéptido MMP-1 modificado proporcionado en la presente puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más modificaciones adicionales, de manera que los polipéptidos MMP-1 resultantes exhiben actividad incrementada en la temperatura permisible (por ejemplo 25°C) comparado con la temperatura no permisible (por ejemplo 34°C o 37°C) y mantiene la actividad de MMP-1 tipo natural en la temperatura permisiva o no permisiva. Las modificaciones adicionales pueden conferir propiedades adicionales a la enzima, por ejemplo, estabilidad incrementada, vida media incrementada y/o resistencia incrementada a inhibidores, por ejemplo, TIMP. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones a la secuencia primaria del polipéptido, así como otra modificación tal como PEGilación y glicosilación del polipéptido. Generalmente, tales polipéptidos incluyen una o más modificaciones proporcionadas en la presente y exhiben actividad incrementada en la temperatura más baja que una temperatura más alta. Las modificaciones ejemplares que se

00R169

pueden incluir en un polipéptido proporcionado en la presente incluyen, pero no se limitan a, modificaciones T4P, Q10P, R30M, R30S, T96R, A114V, F166C, I172V, D181H, R189T, E200A, G214E, D232N, D233G, R243S, Q254P, T286A, I298T, E314G, F315S, V374M, R386Q, S387T, G391S, y T432A de un polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 327.

4) Otras MMPs

Las metaloproteasas de matriz son polipéptidos altamente homólogos y exhiben especificidades similares para componentes de matriz extracelular. Las secuencias ejemplares de los MMP se establecen en la Tabla 3, por ejemplo, cualquiera establecido en las SEQ ID NOS: 1, 711, 714, 717, 720, 723, 726, 729, 732, 735, 738, 741, 744, 747, 750, 753, 756, 759, 762, 765, 768, 771, 774 o 777 o forma de zimógenos, formas activas u otras formas del mismo, o variantes alélicas o de especies de los mismos. La Figura 1 proporciona una alineación de la forma de zimógeno de polipéptidos MMP ejemplares. De esta manera, cualquiera de las modificaciones proporcionadas en la presente en un MMP-1 se puede hacer en cualquier otro polipéptido MMP. Por lo tanto, con base en la descripción en la presente, cualquier MMP, especie, variante alélica u otra variante, se puede hacer temporalmente activo (reversible o irreversible) en virtud de la actividad a una temperatura permisible (generalmente una temperatura inferior) comparado con una temperatura no permisible (generalmente a temperatura más alta). Tales mutantes tsMMP se pueden usar por alguien de experiencia en la técnica y usar en composiciones, procesos o métodos para el tratamiento de enfermedades o afecciones

mediadas por ECM.

Está dentro del nivel de alguien de experiencia en la técnica alinear diversos MMPs a MMP-1 (por ejemplo establecido en la SEQ ID NO: 327) e identificar los residuos correspondientes. Cualquiera de las modificaciones proporcionadas en la presente se pueden hacer en cualquier otro MMP en el residuo correspondiente. Alguien de experiencia en la técnica puede probar la actividad del polipéptido modificado resultante para sensibilidad a la temperatura a una temperatura permisible comparado con una temperatura no permisible. En particular, se entiende que diferencias de aminoácidos conservadoras en una posición correspondiente en un MMP son funcionalmente invariantes. De esta manera, donde un residuo en MMP-1 alinea con un residuo conservador a ello en otro MMP, se entiende que tal residuo se contempla para la modificación en la presente. Por ejemplo, la posición 95 en un MMP-1 establecido en la SEQ ID NO: 327 es una leucina (L). La alineación de la SEQ ID NO: 327 con otros MMP muestra que la posición 95 en otros MMP es un residuo de leucina, isoleucina (I) o valina (V) (ver Figura 1). Cada uno de L, I y V son residuos conservadores.

En particular, se proporcionan en la presente polipéptidos MMP modificados que se modifican por uno o más reemplazo de aminoácidos para conferir sensibilidad a la temperatura al efectuar una modificación MMP-1 correspondiente en un residuo correspondiente en un MMP. La Figura 2 describe residuos de aminoácidos ejemplares para modificación. Se entiende que estos residuos identificados son sólo ejemplares y están dentro del

nivel de alguien de experiencia en la técnica para llevar a cabo la modificación de un MMP en otros residuos de aminoácido u otros residuos correspondientes MMP-1 para conferir sensibilidad a la temperatura. Las modificaciones ejemplares proporcionadas en la presente incluyen la modificación de cualquier MMP, por ejemplo, un MMP-8, MMP-13, MMP-18, MMP-2, MMP-9, MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-7, MMP-26 y MMP-12, en cualquiera de una o más posiciones que corresponden a cualquiera de las siguientes posiciones: 95, 105, 151, 156, 159, 176, 179, 180, 181, 182, 185, 195, 198, 206, 210, 212, 218, 223, 228, 229, 233, 234, y 240 de un polipéptido MMP-1 no modificado que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 327. La modificación incluye cualquiera de una o más de las modificaciones proporcionadas en la presente arriba en la posición correspondiente a la posición recitada en MMP-1. Por ejemplo, el residuo 95 en un polipéptido MMP-1 establecido en la SEQ ID NO: 327 corresponde al residuo 113 en un polipéptido MMP-8 establecido en la SEQ ID NO: 101. De esta manera, se proporcionan en la presente polipéptidos MMP-8 modificados que tienen una modificación de aminoácido L113K de un polipéptido MMP-8 no modificado que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 101. Las modificaciones similares se proporcionan en la presente con base en su descripción.

Cualquier polipéptido MMP modificado proporcionado en la presente también puede contener uno o más de otras modificaciones descritas en la técnica. Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, cualquier sustitución

de aminoácido, eliminación o inserción conocida en la técnica. Además que contienen una modificación descrita anteriormente, cualquier polipéptido MMP modificado proporcionado en la presente puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más modificaciones adicionales, de manera que los polipéptidos MMP resultantes exhiben actividad incrementada en la temperatura permisible (por ejemplo 25°C) comparado con la temperatura no permisible (por ejemplo 34°C o 37°C) y mantienen la actividad de MMP tipo natural en la temperatura permisiva o no permisiva. Las modificaciones adicionales pueden conferir propiedades adicionales a la enzima, por ejemplo, estabilidad incrementada, vida media incrementada y/o resistencia incrementada a inhibidores, por ejemplo, TIMP. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones a la secuencia primaria del polipéptido, así como otra modificación tal como PEGilación y glicosilación del polipéptido. Generalmente, tales polipéptidos incluyen una o más modificaciones proporcionadas en la presente y exhiben actividad incrementada en la temperatura más baja que una temperatura más alta. Las modificaciones ejemplares que se pueden incluir en un polipéptido proporcionado en la presente incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de las modificaciones establecidas en la Tabla 3B, abajo.

Tabla 3B. Modificaciones ejemplares en los MMP

MMP	SEQ ID NO	Modificaciones de Aminoácidos
MMP-8	101	S3C; T32I; K87E; E154G; D193V; S229T; N246Y; A436V; K460T
MMP-13	104	H2L; A8V; F75S; D89H; D390G; I427T
MMP-2	110	A27S; R101H; D210Y; A228T; F239L; E404K; A447V; T498M; V620I; V621L; S644I
MMP-9	113	A20V; N38S; E82K; N127K; L187F; R239H; T258I; Q279R; F571V; P574R; R668Q
MMP-3	116	K45E; H113P; R248W
MMP-10	119	L4V; V8G; R53K; G65R; E142Q; F226L; G282E; L440F; H475L
MMP-11	122	V38A; E44K; P61L; S86P; D166N; F182S; Q323H
MMP-7	125	C7W; R77R; S115T; G137D; P241L
MMP-26	128	K43E; S46L; I260M
MMP-12	131	N357S; F468L; G469R
MMP-19	146	R103C; P245S; P488T; T491M

2. Combinaciones de Enzimas que Degradan matriz y Activador

Las combinaciones de una enzima activable que degrada la matriz y activador, suficiente para la activación de la enzima que degrada la matriz, se proporcionan en la presente. Para los propósitos en la presente, la enzima activable que degrada la matriz se proporciona en una forma inactiva. Generalmente, las composiciones de la enzima activable que degrada la matriz puede proporcionarse separada del activador. Las composiciones pueden proporcionarse de forma separada en el mismo recipiente o en recipientes separados. Generalmente, Cuando se envasa por si misma, la enzima se proporciona de manera que hay condiciones activantes insuficientes presentes para hacer la enzima activa.

La enzima que degrada la matriz se puede proporcionar como un líquido o en forma liofilizada en una concentración terapéuticamente efectiva. Alternativamente, la enzima que degrada la matriz se puede proporcionar como un líquido concentrado, tal que la adición de una cantidad suficiente de

resultados del activador en una concentración terapéuticamente efectiva de enzima. Las enzimas se pueden proporcionar como una solución o suspensión o encapsulada en un vehículo de liberación adecuado, tal como un liposoma, partícula de vidrio, tubo capilar, vehículo de liberación de fármaco, gelatina, comprimido, cápsula, píldora, capa de tiempo de liberación, así como preparación de parche transdérmico y inhaladores de polvo seco o cualquier otro vehículo. El activador típicamente se proporciona como una solución de líquido o suspensión para administración en el intersticio ya sea solo o después de la reconstitución de y/o exposición a la enzima que degrada la matriz. Como se describe en la Sección F abajo, los kits que contienen estas combinaciones y también artículos de fabricación, tales como recipientes, también se proporcionan.

De esta manera, cuando se desee, la enzima activable que degrada la matriz se somete a condiciones de activación en las cuales la enzima se expone a un activador para generar una enzima activa. La exposición a un activador se puede lograr in vitro o in vivo. Por ejemplo, donde una enzima activable y activador se proporcionan por separado, se pueden administrar juntos o de forma separada. Donde se administran de forma separada, la enzima que degrada la matriz condicionalmente activable se pueden administrar simultáneamente, posteriormente o intermitentemente del activador. En otro ejemplo, la enzima que degrada la matriz, en una forma líquida concentrada o liofilizada, se puede reconstituir con el activador justo antes de usar. En tal ejemplo, la mezcla de la enzima que degrada la matriz y el activador se administran juntos. Tales métodos de

activación se pueden determinar empíricamente por alguien de experiencia en la técnica, y puede diferir dependiendo de la elección de la enzima y el activador, y el método de tratamiento y régimen de tratamiento deseados.

La enzima activable que degrada la matriz se puede proporcionar en un artículo o fabricado solo o en combinación con el activador. Por ejemplo, si la enzima se proporciona en combinación con el activador, un artículo de fabricación puede contener una enzima, ya sea liofilizada o en forma líquida, en un compartimiento, y un activador en un compartimiento adyacente. Los compartimientos se pueden separar por un miembro de división. Tales artículos de fabricación se describen en otra parte en la presente.

Las combinaciones de enzima que degrada la matriz y activador también pueden además contener otros agentes, discutidos en detalle a continuación. Por ejemplo, además del activador y la enzima que degrada la matriz, las combinaciones se proporcionan conteniendo uno o más de un anestésico, vasoconstrictor o agente dispersante.

E. Métodos para Producir Ácidos Nucleicos Que Codifican Enzimas que Degradan matriz y Polipéptidos Del mismo

Los polipéptidos de enzimas que degradan matriz establecidos en la presente, se pueden obtener por métodos bien conocidos en la técnica por purificación de proteína y expresión de proteína recombinante. Cualquier método conocido por aquellos de experiencia en la técnica para identificación de ácidos nucleicos que codifican genes deseados se puede usar. Cualquier método disponible en la técnica se puede usar para

obtener un clon de ADN genómico o cADN de longitud completa (esto es, que abarca la región de codificación completa) que codifica una enzima que degrada la matriz deseada, tal como de una célula o fuente de tejido. Las enzimas que degradan matriz modificada o variante, se puede fabricar por ingeniería de un polipéptido tipo natural, tal como por mutagénesis dirigida al sitio.

Los polipéptidos se pueden clonar o aislar usando cualquiera de los métodos disponibles conocidos en la técnica para clonar y aislar moléculas de ácido nucleico. Tales métodos incluyen amplificación PCR de ácidos nucleicos y separación por exclusión de colecciones, que incluyen separación por exclusión de hibridización de ácido nucleico, separación por exclusión basada en anticuerpo y separación por exclusión basada en actividad.

Los métodos para amplificación de ácidos nucleicos se pueden usar para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido deseado, incluyendo por ejemplo, métodos de reacción de cadena de polimerasa (PCR). Un ácido nucleico que contiene material se puede usar como un material de partida del cual se puede aislar una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido deseado. Por ejemplo, Preparaciones de ADN y mARN, extractos de célula, extractos de tejido, muestras de fluido (por ejemplo, sangre, suero, saliva), las muestras de sujetos saludables y/o enfermos se pueden usar en métodos de amplificación. Las colecciones de ácido nucleico también se pueden usar como una fuente de material de partida. Los cebadores se pueden diseñar para

amplificar un polipéptido deseado. Por ejemplo, los cebadores se pueden diseñar basados en secuencias expresadas de las cuales un polipéptido deseado se genera. Los cebadores se pueden diseñar basados en retro-traducción de una secuencia de aminoácido de polipéptido. Las moléculas de ácido nucleico generadas por amplificación se pueden procesar por secuencia y confirmar para codificar un polipéptido deseado.

Las secuencias de nucleótido adicionales se pueden unir a una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido, incluyendo secuencias de ligadura que contienen sitios de endonucleasa de restricción para el propósito de clonar el gen sintético en un vector, por ejemplo, un vector de expresión de proteína o un vector diseñado para la amplificación de las secuencias de ADN que codifican la proteína núcleo. Además, las secuencias de nucleótido adicionales que especifican elementos ADN funcionales se pueden ligar operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido. Los ejemplos de tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias de promotor diseñadas para facilitar la expresión de proteína intracelular, y las secuencias de secreción, por ejemplo secuencias de señal heteróloga, diseñadas para facilitar la secreción de proteína. Tales secuencias se conocen por aquellos de experiencia en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de señal heteróloga ejemplares incluyen, pero no se limitan a, secuencia de señal heteróloga IgG kappa humana establecida en la SEQ ID NO:2. Las secuencias de residuos de nucleótido adicionales tales como secuencias de bases que especifican regiones que enlazan proteína también se pueden ligar a

000173

moléculas de ácido nucleico que codifican enzima. Tales regiones incluyen, pero no se limitan a, secuencias de residuos que facilitan o codifican proteínas que facilitan la absorción de una enzima en células objetivo específicas, o de otra manera alteran farmacocinéticos de un producto de un gen sintético. Por ejemplo, las enzimas se pueden ligar a porciones PEG.

Además, las etiquetas u otras porciones se pueden agregar, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación de afinidad del polipéptido. Por ejemplo, las secuencias de residuos de nucleótido adicionales tales como secuencias de bases que especifican una etiqueta epítopo u otro marcador detectable también se pueden ligar a moléculas de ácido nucleico que codifican enzima. Ejemplar de tales secuencias incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican una etiqueta His (por ejemplo, 6xHis, HHHHHH; SEQ ID NO:235) o Etiqueta Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO:236).

Los ácidos nucleicos identificados y aislados se pueden luego insertar en un vector de clonación adecuado. Un gran número de sistemas hospederos de vector conocidos en la técnica se puede usar. Posibles vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula hospedera usada. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como derivados de plásmido pCMV4, pBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Otros vectores de expresión incluyen el vector de expresión HZ24 ejemplificado en la presente. La inserción en un vector de clonación puede, por

ejemplo, realizarse al ligar el fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene terminales cohesivas complementarias. La inserción se puede efectuar usando vectores de clonación TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no se presentan en el vector de clonación, los extremos de las moléculas ADN se pueden modificar enzimáticamente. Alternativamente, cualquier sitio deseado se puede producir al ligar secuencias de nucleótido (ligaduras) en las terminales de ADN; estas ligaduras ligadas pueden contener oligonucleótidos químicamente sintetizados específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En un método alternativo, el vector desdoblado y el gen de proteína se puede modificar por cola homopolimérica. Las moléculas recombinantes se pueden introducir en células hospederas por medio, por ejemplo, de transformación, transfección, infección, electroporación y sonoporación, de modo que muchas copias de la secuencia de gen se generan.

En modalidades específicas, la transformación de células hospederas con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen de proteína aislado, cADN, o secuencia de ADN sintetizado permiten la generación de copias múltiples del gen. De esta manera, el gen puede obtenerse en grandes cantidades por transformantes de crecimiento, que aísla las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando sea necesario, recuperar el gen insertado del ADN recombinante aislado.

1. Vectores y células

Para expresión recombinante de una o más de las proteínas

deseadas, tales como cualquiera descrita en la presente, el ácido nucleico que contiene todo o una porción de la secuencia de nucleótido que codifica la proteína se puede insertar en un vector de expresión adecuado, esto es, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la proteína insertada que codifica la secuencia. Las señales de transcripción y de traducción necesarias también se pueden suministrar por el promotor nativo para genes de enzima, y/o sus regiones que flanquean.

También se proporcionan vectores que contienen un ácido nucleico que codifica la enzima. Las células que contienen los vectores también se proporcionan. Las células incluyen células eucarióticas y procarióticas, y los vectores son los adecuados para usar en la presente.

Se proporcionan las células eucarióticas y procarióticas, que incluyen células endoteliales, que contienen los vectores. Tales células incluyen células bacterianas, células de levadura, células de hongos, Archea, células de plantas, células de insecto y células de animal. Las células se usan para producir una proteína de los mismos al crecer las células descritas anteriormente bajo condiciones por las cuales la proteína codificada se expresa por la célula, y recupera la proteína expresada. Para propósitos en la presente, por ejemplo, la enzima se puede secretar en el medio.

Se proporcionan vectores que contienen una secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido de proenzima acoplado a la secuencia de señal nativa o heteróloga, así como múltiples copias de los mismos. Los vectores se pueden seleccionar para

expresión de la proteína de enzima en la célula o de tal manera la proteína de enzima se expresa como una proteína secretada. La forma de proenzima (esto es,. zimógeno) de la enzima se puede purificar para usar como una enzima activable en la presente. Alternativamente, sobre la secreción el prosegmento se puede desdoblar catalíticamente o autocatalíticamente para generar una enzima madura. Si es necesario, la enzima se puede purificar de tal manera que el prosegmento se remueve de la preparación. Tales formas maduras, si están inactivas, también se pueden usar en la presente como enzima activable ya sea en una cadena sencilla o forma de dos cadenas.

Una variedad de sistemas de vector hospedero se puede usar para expresar la proteína que codifica la secuencia. Estos incluyen pero no se limitan a sistemas de célula de mamífero infectada con virus (por ejemplo, virus de la vacuna, adenovirus y otros virus); sistemas de célula de insecto infectada con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levadura que contiene vectores de levadura; o bacterias transformadas con bateriófago, ADN, ADN de plásmido, o ADN cósmido. Los elementos de expresión de vectores varían en sus fortalezas y especificidades. Dependiendo del sistema de vector hospedero usado, cualquiera de un número de elementos de transcripción y traducción adecuados se puede usar.

Cualquiera de los métodos conocidos por aquellos de experiencia en la técnica para la inserción de fragmentos de ADN en un vector se pueden usar para construir vectores de expresión que contienen un gen quimérico que contiene señales de control de transcripción/traducción adecuadas y secuencias

000178

que codifican proteína. Estos métodos pueden incluir ADN recombinante in vitro y técnicas sintéticas y recombinantes in vivo (recombinación genética). La expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican proteína, o dominios, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos, se puede regular por una segunda secuencia de ácido nucleico de manera que los genes o fragmentos de los mismos se expresan en un hospedero transformado con las moléculas de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las proteínas se pueden controlar por cualquier promotor/aumentador conocido en la técnica. En una modalidad específica, el promotor no es nativo a los genes para una proteína deseada. Los promotores que se pueden usar incluyen pero no se limitan a el promotor temprano SV40 (Bernoist and Chambon, Nature 290:304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición de terminal larga 3' de virus de sarcoma Rous (Yamamoto et al. Cell 22:787-797 (1980)), el promotor de herpes timidina cinasa (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441 -1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneina (Brinster et al., Nature 296:39-42 (1982)); vectores de expresión procarióticos tales como el promotor β-lactamasa (Jay et al, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5543) o el promotor tac (DeBoer et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)); ver también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": in Scientific American 242:79-94 (1980)); vectores de expresión de planta que contienen el promotor de sintetasa de nopalina (Herrar-Estrella et al., Nature 303: 209-213 (1984)) o el promotor de ARN de virus 35S de mosaico de coliflor (Gardner et al., Nucleic Acids

Res. 9:2871 (1981)), y el promotor de la carboxilasa de bisfosfato de ribulosa de enzima fotosintética (Herrera-Estrella et al., Nature 370:115-120 (1984)); elementos promotores de levadura y otros hongos tales como el promotor Gal4, el promotor de deshidrogenasa de alcohol, el promotor de cinasa de fosfoglicerol, el promotor de fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de control transcripcional de animal que exhiben especificidad de tejido y se han usado en animales transgénicos: la región de control de gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., Cell 35:639-646 (1984); Ornitz et al, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7:425-515 (1987)); las región de control de gen de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan et al, Nature 375:115-122 (1985)), la región de control de gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al, Cell 35:647-658 (1984); Adams et al, Nature 375:533-538 (1985); Alexander et al, Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987)), la región de control de virus de tumor mamario de ratón que es activa en células madre linfoide, de testículos, de mama (Leder et al, Cell 45:485-495 (1986)), la región de control de gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinckert et al, Genes and Devel 7:268-276 (1987)), la región de control de gen de alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al, Mol Cell. Biol 5:1639-1648 (1985); Hammer et al, Science 235:53-58 1987)), la región de control de gen de alfa-1 antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al, Genes and Devel 7: 161-171 (1987)), región de control de gen de beta globina que es activa en

células mieloides (Magram et al, Nature 375:338-340 (1985); Kollias et al, Cell 46:89-94 (1986)), la región de control de gen de proteína de mielina básica que es activa en las células de oligodendrocito del cerebro (Readhead et al, Cell 48:703-712 (1987)), la región de control de gen de 2 cadenas ligeras de miosina que es activa en músculo esqueletal (Shani, Nature 374:283-286 (1985)), y la región de control de gen de hormona de liberación gonadotrófica que es activa en ganodotrofas del hipotálamo (Mason et al, Science 234:1372-1378 (1986)).

En una modalidad específica, un vector se usa que contiene un promotor operativamente ligado a ácidos nucleicos que codifican una proteína deseada, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo, de los mismos, uno o más orígenes de replicación, y opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia al antibiótico). Los vectores de plásmido ejemplares para la transformación de células *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pQE (disponibles de Qiagen, Valencia, CA; ver también literatura publicada por Qiagen que describe el sistema). Los vectores pQE tienen un promotor T5 de fago (reconocido por polimerasa de ARN *E. coli*) y un módulo de represión de operador lac doble para proporcionar extremadamente regulada, expresión de alto nivel de proteínas recombinantes en *E. coli*, un sitio de enlace ribosomal sintético (RBS II) para traducción eficiente, una secuencia que codifica etiqueta 6XHis, terminadores transcripcionales t_0 y T1, origen ColE1 de replicación, y un gen de beta lactamasa para conferir resistencia a la ampicilina. Los vectores pQE

permiten la colocación de una etiqueta 6xHis en ya sea la terminal N o C de la proteína recombinante. Tales plásmidos incluyen pQE 32, pQE 30, y pQE 31 que proporcionan múltiples sitios de clonación para todos los tres marcos de lectura y proporcionan la expresión de proteínas etiquetadas 6xHis de terminal N. Otros vectores de plásmido ejemplares para la transformación de células *E. coli*, incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (ver, Patente de E.U.A. 4,952,496; disponible de Novagen, Madison, WI; ver, también literatura publicada por Novagen que describe el sistema). Tales plásmidos incluyen pET 11a, que contienen el promotor T71ac, terminador T7, el operador lac *E. coli* inducible, y el gen represor lac; pET 12a-c, que contiene el promotor T7, terminador T7, y la señal de secreción ompT de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (NOVAGEN, Madison, WI), que contiene una secuencia líder His-Tag™ para usar en la purificación con una columna His y un sitio de desdoblamiento de trombina que permite el desdoblamiento después de la purificación sobre la columna, la región de promotor T7-lac y el terminador T7.

Ejemplar de un vector para expresión celular de mamífero es el vector de expresión HZ24. El vector de expresión HZ24 se derivó de la estructura de vector pCI (Promega). Esto contiene ADN que codifica el gen de resistencia a beta lactama (AmpR), un origen F1 de replicación, una región de aumentador/promotor temprano inmediato de Citomegalovirus (CMV), y una señal de poliadenilación tardía SV40 (SV40). El vector de expresión también tiene un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) del virus ECMV (Clontech) y el gen de reductasa de

000181

dihidrofolato de ratón (DHFR).

2. Expresión

Las enzimas que degradan matriz se pueden producir por cualquier método conocido por aquellos de experiencia en la técnica incluyendo métodos in vivo e in vitro. Las proteínas deseadas se pueden expresar en cualquier organismo adecuado para producir las cantidades requeridas y formas de las proteínas, tales como por ejemplo, necesarios para la administración y tratamiento. Los hospederos de expresión incluyen organismos procarióticos y eucarióticos tales como *E. coli*, levadura, plantas, células de insecto, células de mamífero, incluyendo líneas de célula humana y animales transgénicos. Los hospederos de expresión pueden diferir en sus niveles de producción de proteína así como los tipos de modificaciones post-traduccionales que se presentan en las proteínas expresadas. La elección de hospedero de expresión se puede hacer con base en estos y otros factores, tales como consideraciones reglamentarias y de seguridad, costos de producción y la necesidad y métodos para producción.

Muchos vectores de expresión están disponibles y son conocidos por aquellos de experiencia en la técnica y se pueden usar para expresión de proteínas. La elección de vector de expresión se verá influido por la elección de sistema de expresión hospedero. En general, los vectores de expresión pueden incluir promotores transcripcionales y opcionalmente aumentadores, señales de transcripción, y señales de terminación transcripcional y traduccional. Los vectores de expresión que se usan para transformación estable típicamente

000182

tienen un marcador seleccionable que permite la selección y mantenimiento de las células transformadas. En algunos casos, un origen de replicación se puede usar para amplificar el número de copia del vector.

Las enzimas que degradan matriz también se pueden utilizar o expresar como fusiones de proteína. Por ejemplo, una fusión de enzima se puede generar para agregar funcionalidad adicional a una enzima. Los ejemplos de proteínas de fusión de enzima incluyen, pero no se limitan a, fusiones de una secuencia de señal, una etiqueta tal como para localización, por ejemplo, una etiqueta his6 o una etiqueta myc, o una etiqueta para purificación, por ejemplo, una fusión GST, y una secuencia para dirigir la secreción de proteína y/o asociación de membrana.

Generalmente, las enzimas que degradan matriz se expresan en una forma de zimógeno inactivo. La conversión de zimógeno se puede lograr por la exposición a otras proteasas o a autocatálisis para generar una enzima madura. Cualquier forma de una enzima se contempla en la presente, siempre y cuando se inactive en la ausencia de un activador.

a. Células Procarióticas

Las Procariotas, especialmente *E. coli*, proporciona un sistema para producir grandes cantidades de proteínas. La transformación de *E. coli* es de técnica simple y rápida bien conocida por aquellos de experiencia en la técnica. Los vectores de expresión para *E. coli* pueden contener promotores inducibles, tales promotores son útiles para inducir altos niveles de expresión de proteína y para proteínas de expresión que inhiben alguna toxicidad a las células hospederas. Los

ejemplos de promotores inducibles incluyen el promotor lac, el promotor trp, el promotor tac híbrido, los promotores de ARN T7 y SP6 y el promotor λPL regulado por temperatura.

Las proteínas, tales como cualquiera proporcionada en la presente, se pueden expresar en el medio ambiente citoplásmico de *E. coli*. El citoplasma es un ambiente de reducción y para algunas moléculas, esto puede resultar en la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Los agentes de reducción tales como ditiotreitol y β-mercaptoetanol y desnaturalizantes, tales como guanidina-HCl y urea se pueden usar para re-solubilizar las proteínas. Un enfoque alternativo es la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de bacterias que proporciona un medio ambiente de oxidación y tipo chaperonina e isomerasas de disulfuro y pueden llevar a la producción de proteína soluble. Típicamente, una secuencia líder se fusiona a la proteína a expresarse que dirige la proteína al periplasma. El líder luego se remueve por peptidasas de señal dentro del periplasma. Los ejemplos de las secuencias líder dirigidas periplásmicas incluyen el líder pelB del gen de liasa pectato y el líder derivado del gen de fosfatasa alcalina. En algunos casos, la expresión periplásmica permite la salida de la proteína expresada en el medio de cultivo. La secreción de proteínas permite la purificación rápida y sencilla del sobrenadante de cultivo. Las proteínas que no se secretan se pueden obtener del periplasma por lisis osmótica. Similar a la expresión citoplásmica, en algunos casos las proteínas se pueden volver insolubles y desnaturalizantes y los agentes de reducción se pueden usar para facilitar la solubilización y

replegamiento. La temperatura de inducción y crecimiento también pueden influenciar los niveles de expresión y solubilidad, típicamente las temperaturas entre 25°C y 37°C se usan. Típicamente, la bacteria produce proteínas aglicosiladas. De esta manera, si las proteínas requieren glicosilación para funcionar, la glicosilación se puede agregar in vitro después de la purificación de células hospederas.

b. Células de Levadura

Las levaduras tales como *Saccharomyces cerevisae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* son hospederos de expresión de levadura bien conocidos que se pueden usar para la producción de proteínas, tales como cualquiera de las descritas en la presente. La levadura se puede transformar con vectores de replicación episomal o por integración cromosomal estable por recombinación homóloga. Típicamente, los promotores inducibles se usan para regular la expresión de gen. Los ejemplos de tales promotores incluyen GAL1, GAL7 y GAL5 y promotores de metalotioneina, tales como CUP1, AOX1 u otro *Pichia* u otro promotor de levadura. Los vectores de expresión frecuentemente incluyen un marcador seleccionable tal como LEU2, TRP1, HIS3 y URA3 para selección y mantenimiento del ADN transformado. Las proteínas expresadas en levadura son frecuentemente solubles. La co-expresión con chaperoninas tal como Bip e isomerasa de disulfuro de proteína puede mejorar los niveles de expresión y la solubilidad. Adicionalmente, las proteínas expresadas en levadura se pueden dirigir para secreción usando fusiones de péptido de señal de secreción tales como la levadura que aparea

la señal de secreción de factor tipo alfa de *Saccharomyces cerevisae* y las fusiones con proteínas de superficie de célula de levadura tales como el receptor de adhesión de apareamiento Aga2p o la glucoamilasa *Arxula adeninivorans*. Un sitio de desdoblamiento de proteasa tal como para la proteasa Kex-2, se puede fabricar por ingeniería para remover las secuencias fusionadas de los polipéptidos expresados a medida que sale la trayectoria de secreción. La levadura también es capaz de la glicosilación en las porciones Asn-X-Ser/Thr.

c. Células de Insecto

Las células de insecto, particularmente usando expresión de baculovirus, son útiles para polipéptidos de expresión tales como enzimas que degradan matriz. Las células de insecto expresan altos niveles de proteína y son capaces de la mayoría de las modificaciones post-traduccionales usadas por eucariotas superiores. El baculovirus tiene una gama de hospederos restrictivos que mejoran la seguridad y reducen las preocupaciones reguladoras de la expresión eucariótica. Los vectores de expresión típicos usan un promotor para la expresión de alto nivel tal como el promotor de polihedrina de baculovirus. Los sistemas de baculovirus comúnmente usados incluyen los baculovirus tales como virus de polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV), y el virus de polihedrosis nuclear *Bombyx mori* (BmNPV) y una línea de célula de insecto tal como Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1). Para la expresión de alto nivel, la secuencia de nucleótido de la molécula a expresarse se fusiona inmediatamente cadena debajo

del codón de iniciación de polihedrina del virus. Las señales de secreción de mamífero se procesan exactamente en las células de insecto y se pueden usar para secretar la proteína expresada en el medio de cultivo. Además, las líneas de célula *Pseudaletia unipuncta* (A7S) y *Danaus plexippus* (DpN1) producen proteínas con patrones de glicosilación similares a los sistemas de célula de mamífero.

Un sistema de expresión alternativo en células de insecto es el uso de células transformadas establemente. Las líneas de célula tales como las células Schneider 2 (S2) y Kc (*Drosophila melanogaster*) y las células C7 (*Aedes albopictus*) se pueden usar para expresión. El promotor de metalotioneina *Drosophila* se puede usar para inducir altos niveles de expresión en la presencia de inducción de metal pesado con cadmio o cobre. Los vectores de expresión se mantienen típicamente por el uso de marcadores seleccionables tales como neomicina e higromicina.

d. Células de Mamífero

Los sistemas de expresión de mamíferos se pueden usar para expresar proteínas que incluyen enzimas que degradan matriz. Los constructos de expresión se pueden transferir a las células de mamífero por infección viral tal como adenovirus o por transferencia directa de ADN tal como liposomas, fosfato de calcio, dextrano DEAE y por medios físicos tales como electroporación y microinyección. Los vectores de expresión para células de mamífero típicamente incluyen un sitio de tapón de mARN, una caja de TATA, una secuencia de iniciación traduccional (secuencia de consenso Kozak) y elementos de poliadenilación. Los elementos IRES también se pueden agregar

000189

para permitir expresión bicistrónica con otro gen, tal como un marcador seleccionable. Tales vectores frecuentemente incluyen aumentadores de promotor traduccional para expresión de alto nivel, por ejemplo el aumentador de promotor SV40, el promotor de citomegalovirus humano (CMV) y la repetición terminal larga de virus de sarcoma Rous (RSV). Estos aumentadores de promotor son activos en muchos tipos de célula. Los promotores de tejido y tipo celular y regiones de aumentador también se pueden usar para la expresión. Las regiones de promotor/aumentador ejemplares incluyen, pero no se limitan a, aquellas de genes tales como elastasa I, insulina, inmunoglobulina, virus de tumor de mama de ratón, albumina, fetoproteína alfa, antitripsina alfa 1, globina beta, proteína básica de mielina, cadena 2 ligera de miosina, y control de gen de hormona de liberación gonadotrópica. Los marcadores seleccionables se pueden usar para seleccionar por y mantener células con el constructo de expresión. Los ejemplos de genes de marcador seleccionable incluyen, pero no se limitan a, fosfotransferasa de higromicina B, deaminasa de adenosina, transferasa de fosforibosilo de xantina-guanina, fosfotransferasa de aminoglicósido, reductasa de dihidrofolato (DHFR) y cinasa de timidina. Por ejemplo, la expresión se puede realizar en la presencia de metotrexato para seleccionar solamente aquellas células que expresan el gen DHFR. La fusión con moléculas de señalización de superficie celular tales como TCR-ζ y $Fc_{\epsilon}RI$-γ pueden dirigir la expresión de las proteínas en un estado activo en la superficie de célula.

Muchas líneas celulares están disponibles para expresión

de mamífero que incluyen células de ratón, rata, humano, mono, pollo y hámster. Las líneas celulares ejemplares incluyen pero no se limitan a CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NSO de ratón (son secreción) y otras líneas de célula de mieloma, hibridoma y líneas de célula de heterohibridoma, linfocitos, fibroblastos, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8, y células HKB. Las líneas celulares también están disponibles adaptadas a medio libre de suero que facilita la purificación de proteína secretadas del medio de cultivo celular. Los ejemplos incluyen células CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, cat # 11619-012) y la línea celular EBNA-I libre de suero (Pham et al, (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42.). Las líneas celulares también están disponibles para adaptarse a crecer en medios especiales optimizados para expresión máxima. Por ejemplo, las células DG44 CHO se adaptan para crecer en cultivo de suspensión en un medio libre de producto animal, químicamente definido.

e. Plantas

Las células de plantas transgénicas y plantas se pueden usar para expresar proteínas tales como cualquiera de las descritas en la presente. Los constructos de expresión se transfieren típicamente a plantas usando transferencia de ADN directa tal como bombardeo de micropartículas y transferencia mediada por PEG en los protoplastos, y con transformación mediada por agrobacteria. Los vectores de expresión pueden incluir promotor y secuencias de aumentador, elementos de terminación transcripcional y elementos de control traduccional. Los vectores de expresión y las técnicas de transformación se dividen usualmente entre hospederos de

dicotiledónea, tales como *Arabidopsis* y tabaco, y hospederos de monocotiledónea, tales como maíz y arroz. Los ejemplos de promotores de planta usados para expresión incluyen el promotor de virus de mosaico de coliflor, el promotor de sintetasa de nopalina, el promotor de carboxilasa de bifosfato de ribosa y la ubiquitina y promotores UBQ3. Los marcadores seleccionables tales como higromicina, isomerasa de fosfomanosa y fosfotransferasa de neomicina se usan frecuentemente para facilitar la selección y mantenimiento de células transformadas. Las células de plantas transformadas se pueden mantener en cultivo como células, agregadas (tejido de callo) o regeneradas en todas las plantas. Las células de plantas transgénicas también pueden incluir algas producidas por ingeniería para producir enzimas que degradan matriz. Debido a que las plantas tienen diferentes patrones de glicosilación que las células de mamífero, esto puede influenciar la elección de proteína producida en estos hospederos.

3. Técnicas de Purificación

El método para purificación de polipéptidos, que incluyen enzimas que degradan matriz u otras proteínas, de las células hospederas dependerá de la elección de células hospederas y los sistemas de expresión. Para moléculas secretadas, las proteínas se purifican generalmente del medio de cultivo después de remover las células. Para expresión intracelular, las células se pueden lisar y las proteínas purificar del extracto. Cuando los organismos transgénicos tales como plantas transgénicas y animales se usan para la expresión, los tejidos u órganos se pueden usar como material de partida para hacer un extracto

celular lisado. Adicionalmente, la producción animal transgénica puede incluir la producción de polipéptidos en leche o huevos, que se puede colectar, y si es necesario, las proteínas se pueden extraer y además purificar usando métodos estándar en la técnica.

Generalmente, las enzimas que degradan matriz se expresan y purifican para estar en una forma inactiva (forma de zimógeno) para activación posterior como se describe en los sistemas y métodos proporcionados en la presente. En algunas aplicaciones, las enzimas que degradan matriz son inactivas en su forma madura en la ausencia de un activador como se describe en la presente. Por lo tanto, después de la expresión, las formas maduras se pueden generar por autocatálisis para remover el prosegmento. Para muchas enzimas, el autocatálisis requiere la presencia del activador. Si es necesario, las etapas de purificación adicional se pueden realizar para remover el prosegmento de la preparación purificada. En algunas circunstancias, tales como para usar como controles, las enzimas expresadas que degradan matriz se pueden purificar en una forma activa, por autocatálisis para remover el prosegmento o por adición de un activador. En tales ejemplos, la autoactivación puede ocurrir durante el proceso de purificación, o por incubación a temperatura ambiente durante 24-72 horas. La velocidad y grado de activación depende de la concentración de proteína y la enzima específica, de tal manera que por ejemplo, una muestra más diluida puede necesitar que se incube a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo más largo. La activación se puede vigilar por SDS-PAGE (por

ejemplo, un cambio de 3 kilodalton) y por actividad de enzima (desdoblamiento de un substrato fluorogénico). Donde una enzima activa se desea, típicamente, una enzima se permite que alcance >75% de activación antes de la purificación.

Las proteínas, tales como enzimas que degradan matriz, se pueden purificar usando técnicas de purificación de proteína estándar conocidas en la técnica que incluyen pero no se limitan a, SDS-PAGE, cromatografía de tamaño de fracción y tamaño de exclusión, precipitación de sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, tal como intercambio de anión. Las técnicas de purificación de afinidad también se pueden utilizar para mejorar la eficacia y pureza de las preparaciones. Por ejemplo, anticuerpos, receptores y otras moléculas que enlazan enzimas que degradan matriz se pueden usar en la purificación de afinidad. Los constructos de expresión también se pueden fabricar por ingeniería para agregar una etiqueta de afinidad a una proteína tal como un epítopo myc, fusión GST o FHs6 y afinidad purificada con anticuerpo myc, la resina de glutationa y resina Ni, respectivamente. La pureza se puede evaluar por cualquier método conocido en la técnica que incluye electroforesis de gel y tinción y técnicas espectrofotométricas.

F. Preparación, Formulación y Administración de Enzimas activables que degradan matriz

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente contienen enzimas activables que degradan matriz proporcionadas en una forma inactiva. También se proporcionan composiciones que contienen un activador. Los compuestos se

pueden formular en preparaciones farmacéuticas adecuadas tales como soluciones, suspensiones, geles, comprimidos, comprimidos dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida o elíxires, para administración oral, parental, así como preparación de parche transdérmico e inhaladores de polvo seco. Típicamente, los compuestos se formulan en composiciones farmacéuticas usando técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica (ver por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Fourth Edition, 1985, 126).

Una enzima que degrada la matriz seleccionada se incluye en una cantidad suficiente que, cuando se activa, ejerce un efecto terapéuticamente útil en la ausencia de efectos secundarios no deseados en el paciente tratado. La composición que contiene la enzima activable que degrada la matriz puede incluir un portador farmacéuticamente aceptable. La concentración terapéuticamente efectiva se puede determinar empíricamente al probar los compuestos en sistemas conocidos in vitro e in vivo, tales como los ensayos proporcionados en la presente. La concentración de un enzima que degrada la matriz seleccionada en la composición depende de la absorción, inactivación y velocidades de excreción del complejo, las características fisicoquímicas del complejo, el horario de dosificación, y cantidad administrada así como otros factores conocidos por aquellos de experiencia en la técnica. Por ejemplo, se entiende que la dosificación precisa y duración de tratamiento es una función del tejido que se trata y se puede determinar empíricamente usando protocolos de las pruebas

conocidas o por extrapolación de datos de prueba in vivo o in vitro. Cabe mencionar que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo tratado. Se debe entender además que para muchos sujetos en particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar con el tiempo de acuerdo con la necesidad del individuo y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones, y que los rangos de concentración establecidos en la presente se ejemplifican solamente y no se pretende que limiten el alcance de los mismos. La cantidad de una enzima que degrada la matriz seleccionada a administrarse para el tratamiento de una enfermedad o afección, por ejemplo una enfermedad mediada por ECM o afección tal como celulitis o linfoedema, se puede determinar por técnicas clínicas estándar. Además, los ensayos in vitro y modelos animales se pueden emplear para ayudar a identificar rangos de dosificación óptima. La dosificación precisa, que se puede determinar empíricamente, puede depender de la enzima en particular, la vía de administración, el tipo de enfermedad a tratarse y la gravedad de la enfermedad. Las dosificaciones ejemplares van desde o alrededor de 10 µg hasta 100 mg, particularmente 50 µg hasta 75 mg, 100 µg hasta 50 mg, 250 µg hasta 25 mg, 500 µg hasta 10 mg, 1 mg hasta 5 mg, o 2 mg hasta 4 mg. La dosificación en particular y formulación de los mismos depende de la indicación y del individuo. Si es necesaria la dosificación se puede determinar empíricamente. Típicamente la dosificación se administra para indicaciones descritas en la presente en un volumen de 1-100 ml,

particularmente, 1-50 ml, 10-50 ml, 10-30 ml, 1-20 ml, o 1-10 ml volúmenes después de la reconstitución, tal como por adición de un activador. Típicamente, tales dosificaciones son desde o alrededor de 100 µg hasta 50 mg, generalmente 1 mg hasta 5 mg, en un volumen final 10-50 ml.

Un activador típicamente seleccionado se proporciona como una solución amortiguada en una cantidad que, cuando se expone a la enzima que degrada la matriz, activa la enzima que degrada la matriz. Típicamente, la cantidad de activador en la solución amortiguadora es una que temporalmente altera las cantidades fisiológicas de tal activador presente en el intersticio a un nivel suficiente para activar temporalmente la enzima que degrada la matriz seleccionada activable. Por ejemplo, donde el pH ácido es la condición de activación, el activador en la forma de una composición de solución amortiguadora ácida contiene al menos un ácido, que cuando se administra a la ECM, juntos o separados de la enzima que degrada la matriz, temporalmente disminuye el pH de la ECM por debajo del pH fisiológico, esto es, por debajo de la neutralidad. Como se describe en otra parte en la presente, la solución amortiguadora ácida es una que tiene un pH efectivo en el rango dentro del pH óptimo de la enzima seleccionada. La neutralización de la solución amortiguadora ácida ocurrirá durante la administración debido al medio ambiente del pH neutral del intersticio, y es una función de la capacidad amortiguadora. Otras soluciones amortiguadas también se contemplan en la presente dependiendo de la enzima que degrada la matriz seleccionada activable y activador elegido. Por

ejemplo, las soluciones amortiguadoras se pueden preparar en diversas temperaturas, o con diversas cantidades de sal, agente de reducción, o iones de metal. La solución de activador amortiguada que contiene la condición de activación de bajo pH también puede contener un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente.

Una enzima que degrada la matriz se puede administrar de una vez, o se puede dividir en un número de dosis más pequeñas a administrarse en intervalos de tiempo. Las enzimas que degradan matriz seleccionadas se pueden administrar en una o más doses durante el curso de un tiempo de tratamiento por ejemplo durante varias horas, días, semanas, o meses. En algunos casos, la administración continua es útil. Se entiende que la dosificación precisa y el curso de administración depende de los métodos y sistema de activación contemplado. Por ejemplo, la enzima que degrada la matriz se puede administrar junta o separada del activador. Típicamente, si se administran juntos, el activador se expone a la enzima que degrada la matriz justo antes de usar, por ejemplo, por reconstitución de un polvo liofilizado. En otras presentaciones, el activador puede ser un componente de la formulación de AMDE o se puede mezclar con una forma de dosificación basada en líquido de la AMDE. También, la AMDE se puede diluir con un diluyente apropiado antes de mezclar el activador. Si se administra de forma separada, la composición de enzima que degrada la matriz se puede administrar secuencialmente, simultáneamente o intermitentemente de la preparación del activador.

También, se entiende que la dosificación precisa y la

duración de tratamiento es una función de la enfermedad que se trata y se puede determinar empíricamente usando protocolos de las pruebas conocidas o por extrapolación de datos de prueba in vivo o in vitro. Cabe mencionar que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la severidad de la condición para ser aliviado. Se debe entender además que para muchos sujetos en particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar con el tiempo de acuerdo con la necesidad del individuo y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de concentración establecidos en la presente se ejemplifican solamente y no se pretende que limiten el alcance o uso de las composiciones y combinaciones que las contiene. Las composiciones se pueden administrar cada hora, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o una vez. Generalmente, los regímenes de dosificación se eligen para limitar la toxicidad. Cabe señalar que el médico tratante sabría cómo y cuándo terminal, interrumpir o ajustar la terapia para bajar la dosificación debido a la toxicidad, o disfunciones de médula ósea, hígado o riñón u otro tejido. A la inversa, el médico tratante también sabría cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no es adecuada (descartar efectos secundarios tóxicos).

Las composiciones farmacéuticamente aceptables se preparan en vista de aprobaciones para una agencia reguladora u otra agencia preparada de acuerdo con generalmente farmacopea reconocida para usar en animales y en humanos. Las

composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, geles, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, y formulaciones de liberación sostenida. Una composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes tradicionales y portadores tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándares tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, y otros de tales agentes. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir portadores tales como un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el cual una enzima o activador se administra. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto, generalmente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador con el fin de proporcionar la forma para la administración adecuada al paciente. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuate, aceite de soya, aceite mineral, y aceite de ajonjolí. El agua es un portador típico cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol también se pueden emplear como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las composiciones pueden contener junto

con un ingrediente activo: un diluyente tal como salina, lactosa, sacarosa, dextrosa, lactato de Ringers, difosfato de calcio, o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tales como gelatina de goma acacia, glucosa, melazas, polvinilpirrolidina, celulosas y derivados de los mismos, povidona, crospovidones y otros de tales aglutinantes conocidos por aquellos de experiencia en la técnica. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, manosa, trehalosa, manitol, sorbitol, gelatina, malta, arroz, flúor, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propilen glicol, agua, y etanol. Una composición, si se desea, también puede contener menores cantidades de agentes humectantes o emulsificantes, o agentes amortiguadores de pH, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, maleato, glicinato, histidina, succinato, lactato, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato de trietanolamina de sodio, oleato de trietanolamina, poli etilen glicol y otros de tales agentes. Otros excipientes en la formulación pueden incluir agentes de oxidación o de reducción tales como cisteina, glutationa oxidada o cisteina, glutationa reducida; tensoactivos tales como polisorbato 80, polisorbato 20, pluronic (F68), o conservadores. Como se observa, para propósitos en la presente, agentes de amortiguación ácidos se pueden proporcionar como activadores, que generalmente se proporcionan en combinaciones separadas de la enzima que

000199

degrada la matriz hasta que se usa.

Los agentes de reducción pueden aumentar la actividad de enzimas que degradan matriz, y por lo tanto se pueden proporcionar en formulaciones para la administración. Por ejemplo, un agente de reducción se requiere para probar la actividad de enzima usando un sustrato de péptido fluorogénico (ver por ejemplo, Ejemplo 25). También, un agente de reducción aumenta la actividad de catepsina L para sustratos tales como colágeno, HSA y una composición PH20 designada rHuPH20 (ver por ejemplo, Ejemplo 26). Los agentes de reducción ejemplares incluyen, pero no se limitan a, cisteina o TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina). Generalmente, un agente de reducción no se incluye en una formulación líquida para almacenamiento de larga duración debido a que esto puede aumentar la auto degradación y hacer la formulación menos estable. Se contempla en la presente que un agente de reducción se agrega a una forma de dosificación líquida o se agrega para reconstituir una forma liofilizada de una enzima antes de usar, generalmente inmediatamente antes de usar. Por ejemplo, una enzima liofilizada, tal como catepsina L, se puede reconstituir con un diluyente que contiene un agente de reducción. Alternativamente, una enzima se puede formular como una enzima liofilizada que contiene un agente de reducción presente en la formulación, siempre y cuando la proteína resultante mantenga la estabilidad de uno a dos años. En tal formulación, la enzima liofilizada se reconstituye en un diluyente adecuado sin agente de reducción. La cantidad de agente de reducción se puede determinar empíricamente y es una función del agente de

reducción en particular. Las cantidades ejemplares para administración de dosificación sencilla son desde alrededor de 1 mM hasta 30 mM, por ejemplo, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM o 30 mM.

Las formulaciones se proporcionan para administración a humanos y animales en formas de dosificación unitaria, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones parenterales estériles o suspensiones, y soluciones orales o suspensiones, y emulsiones de agua de aceite que contienen cantidades adecuadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos farmacéuticamente terapéuticamente activos y derivados de los mismos se formulan típicamente y se administran en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiple. Cada dosificación de unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador farmacéutico requerido, vehículo o diluyente. Los ejemplos de formas de dosificación unitaria incluyen ampolletas, viales y jeringas y comprimidos individualmente envasados o cápsulas. Las formas de dosificación unitaria se pueden administrar en fracciones o múltiplos de los mismos. Una forma de dosificación múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitaria idénticas envasadas en un recipiente sencillo a administrarse en forma de dosificación unitaria segregada. Los ejemplos de formas de dosis múltiple incluyen viales, botellas de comprimidos o cápsulas o botellas de pintas o galones. Por lo tanto, la forma de dosificación múltiple es un múltiplo de

dosis unitarias que no se segregan en los envases. Generalmente, las formas de dosificación o composiciones que contienen ingrediente activo en el rango de 0.005% hasta 100% con el equilibrio hecho de portador no tóxico se pueden preparar.

Las composiciones se pueden formular para la administración por cualquier vía conocida por aquellos de experiencia en la técnica que incluyen administración intramuscular, intravenosa, intradermal, intralesional, intraperitoneal por inyección, subcutánea, sub-epidermal, epidural, nasal, oral, vaginal, rectal, tópica, local, ótica, por inhalación, bucal (por ejemplo, sublingual), y transdérmico o cualquier vía. La administración puede ser local, tópica o sistémica dependiendo del lugar de tratamiento. La administración local a un área que necesita de tratamiento se puede lograr por, por ejemplo, pero no se limita a, infusión local durante la cirugía, la aplicación tópica, por ejemplo, en conjunto con un apósito después de la cirugía, por inyección, por medio de un catéter, or medio de un supositorio, o por medio de un implante. Las composiciones también se pueden administrar con otros agentes biológicamente activos, ya sea secuencialmente, intermitentemente o en la misma composición. La administración también puede incluir sistemas de liberación controlada que incluyen formulaciones de liberación controlada y dispositivos de liberación controlada, tal como por medio de una bomba.

La vía más adecuada en cualquier caso dado depende de una variedad de factores, tales como la naturaleza de la

enfermedad, el progreso de la enfermedad, la severidad de la enfermedad la composición en particular que se usa. Para propósitos en la presente, se desea que las enzimas que degradan matriz y el activador se administra de modo que alcanzan el intersticio de la piel o tejidos. De esta manera, la administración directa bajo la piel, tal como por métodos de administración sub-epidermal, se contempla. Estos incluyen, por ejemplo, vías de administración subcutánea, intradermal e intramuscular. De esta manera, en un ejemplo, la administración local se puede lograr por inyección, tales como de una jeringa u otro artículo de fabricación que contiene un dispositivo de inyección tal como una aguja. Otros modos de administración también se contemplan. La composición farmacéutica se puede formular en formas de dosificación adecuada para cada vía de administración.

En un ejemplo, la preparación farmacéutica puede ser en forma líquida, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones. Si se proporciona en forma líquida, la preparación farmacéutica de una enzima activable que degrada la matriz se puede proporcionar como una preparación concentrada para diluirse a una concentración terapéuticamente efectiva sobre la adición del activador. El activador se puede agregar a la preparación antes de la administración, o el activador se puede agregar simultáneamente, intermitentemente o secuencialmente con la enzima que degrada la preparación de matriz. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol,

derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsificantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos, o aceites vegetales fraccionados); y conservadores (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico).

En otro ejemplo, las preparaciones farmacéuticas se pueden presentar en forma liofilizada para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de usar. Por ejemplo, las preparaciones farmacéuticas de enzimas que degradan matriz se puede reconstituir con una solución que contiene un activador adecuado. La reconstitución de la preparación produce una mezcla que contiene una cantidad terapéuticamente efectiva de enzima que degrada la matriz en un activador adecuado, que se pueden administrar juntos usando cualquier vía de administración deseada.

Los métodos de administración se pueden emplear para disminuir la exposición de enzimas que degradan matriz seleccionadas a procesos de degradación, tales como degradación proteolítica e intervención inmunológica por medio de respuestas antigénicas e inmunogénicas. Los ejemplos de tales métodos incluyen administración local en el sitio de tratamiento. La pegilación de terapéuticos se ha reportado para incrementar la resistencia a proteolisis, incrementar la vida media de plasma, y disminuir la antigenicidad e inmunogenicidad. Los ejemplos de metodologías de pegilación son conocidos en la técnica (ver por ejemplo, Lu and Felix, Int. J. Peptide Protein Res., 43: 127-138, 1994; Lu and Felix, Peptide

Res., 6: 142-6, 1993; Felix et al., Int. J. Peptide Res., 46: 253-64, 1995; Benhar et al., J. Biol. Chem., 269: 13398-404, 1994; Brumeanu et al., J Immunol., 154: 3088-95, 1995; ver también, Caliceti et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55(10): 1261-77 and Molineux (2003) Pharmacotherapy 23 (8 Pt 2):3S-8S). La pegilación también se puede usar en el suministro de moléculas de ácido nucleico in vivo. Por ejemplo, la pegilación de adenovirus puede aumentar la estabilidad y transferencia de genes (ver, por ejemplo, Cheng et al. (2003) Pharm. Res. 20(9): 1444-51).

1. Inyectables, soluciones y emulsiones

La administración parenteral, generalmente caracterizada por la inyección, ya sea subcutáneamente, intramuscularmente o intradermalmente se contempla en la presente. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas a administrarse pueden también contener un activador en la forma de un solvente tal como agentes amortiguadores de pH, agentes de reducción u oxidación, sales de iónes de metal, u otras de tales soluciones amortiguadoras. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener otras menores cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsificantes, agentes amortiguadores de pH, estabilizadores, aumentadores de solubilidad, y otros de tales agentes, tales como por ejemplo,

acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. La implantación de un sistema de liberación lenta o liberación sostenida, de manera que un nivel constante de dosificación se mantiene (ver, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 3,710,795) también se contempla en la presente. El porcentaje de compuesto activo contenido en tales composiciones parenterales es altamente dependiente de la naturaleza específica de los mismos, así como la actividad del compuesto y las necesidades del sujeto.

La administración parenteral de las composiciones generalmente incluye vías sub-epidérmicas de administración tales como administraciones intradermal, subcutánea e intramuscular. Si se desea, la administración intravenosa también se contempla. Los inyectables se diseñan para administración local y sistémica. Para propósitos en la presente, la administración local se desea para administración directa al intersticio afectado. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listo para inyección, productos solubles secos estériles, tales como polvos liofilizados, listos para combinarse con un solvente justo antes de usar, que incluyen comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles lastas para inyección, productos insolubles secos estériles listos para combinarse con un vehículo justo antes de usar y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser ya sea acuosas o no acuosas. Si se administra intravenosamente, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina amortiguada con fosfato (PBS), y soluciones que contienen agentes espesantes y

solubilizantes, tales como glucosa, polietilen glicol, y polipropilen glicol y mezclas de los mismos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables usados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, soluciones amortiguadoras, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersantes, agentes emulsificantes, agentes de secuestro o quelantes, aminoácidos, péptidos y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección Ringers, Inyección de Dextrosa Isotónica, Inyección de Agua Estéril, Inyección de Dextrosa y Ringers Lactado. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de algodón, aceite de maíz, aceite de ajonjolí y aceite de cacahuate. Los agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas y fungistáticas se pueden agregar a preparaciones parenterales envasadas en recipientes de dosis múltiple, que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol de bencilo, clorobutanol, parabenos tales como ésteres de ácido de metil- y propil-p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de benzetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Las soluciones amortiguadoras incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen clorohidrato de procaina. Los agentes de suspensión y dispersantes incluyen carboximetilceluosa de sodio, hidroxipropil metilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes

003208

emulsificantes incluyen Polisorbato 80 (TWEEN 80), polisorbato 20 (TWEEN 20), pluronic (F68). Un agente de secuestro o quelante de iones de metal incluyen EDTA. Los portadores farmacéuticos también incluyen alcohol de etilo, polietilen glicol y propilen glicol para productos miscibles en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajuste de pH.

La concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de manera que una inyección proporciona una cantidad efectiva para producir el efecto farmacológico deseado. La dosis exacta depende de la edad, peso y condición del paciente o animal como se conoce en la técnica. Las preparaciones parenterales de dosis unitaria se envasan en una ampolleta, un vial o una jeringa con una aguja. El volumen de solución líquida o preparación en polvo reconstituida, que contiene el compuesto farmacéuticamente activo, es una función de la enfermedad a tratarse y el artículo en particular de fabricación elegida para el envase. Por ejemplo, para el tratamiento de celulitis, se contempla que para inyección parenteral el volumen inyectado es ó está alrededor de 10 hasta 50 mililitros. Generalmente, este volumen representa el volumen de activador y la enzima que degrada la matriz donde los dos se administran juntos. De esta manera, en un ejemplo, un recipiente doble o jeringa de cámara doble se proporciona conteniendo una preparación de enzima liofilizada separada de un segundo compartimiento que contiene 10 hasta 50 mililitros de activador. Después de la reconstitución de la enzima con el activador, la mezcla se puede administrar. Todas las

000208

preparaciones para la administración parenteral deben ser estériles, como se conoce y practica en la técnica. La formulación inyectable se puede almacenar bajo condiciones adecuadas tales como en o alrededor de -80°C, -40°C, -20°C, 2-8°C, 15°C, temperatura ambiente o temperatura ambiente controlada.

Polvos Liofilizados

Son de interés en la presente polvos liofilizados, que se pueden reconstituir para la administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. También se pueden reconstituir y formular como sólidos o geles.

El polvo estéril, liofilizado se prepara al disolver un compuesto de enzima inactiva en una solución amortiguadora. La solución amortiguadora puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituida, preparada del polvo. La filtración estéril posterior de la solución después de la liofilización bajo condiciones estándar conocidas por aquellos de experiencia en la técnica proporciona la formulación deseada. Brevemente, el polvo liofilizado se prepara al disolver un excipiente, tal como dextrosa, sorbital, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa, manosa, sorbitol, trehalosa, manitol, sorbitol, almidón de hidroxietilo u otro agente adecuado, en una solución amortiguadora adecuada, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otras soluciones amortiguadoras conocidas por aquellos de experiencia en la técnica. Otros excipientes que se pueden agregar incluyen aminoácidos tales como glicina, alanina, prolina, aminas tales

como betainas, trimetil amina N-óxido, y sales de amonio, sodio o magnesio. Entonces, una enzima seleccionada se agrega a la mezcla resultante, y se agita hasta que esto se disuelve. La mezcla resultante se filtra estéril o se trata para remover partículas y para asegurar la esterilidad, y repartir en viales para liofilización. Cada vial contendrá una dosificación sencilla (1 mg - 1 g, generalmente 1-100 mg, tal como 1-5 mg) o dosificaciones múltiples del compuesto. El polvo liofilizado se puede almacenar bajo condiciones adecuadas, tales como a alrededor de 4°C a temperatura ambiente.

La reconstitución de este polvo liofilizado con una solución amortiguadora proporciona una formulación para usar en la administración parenteral. La solución elegida para reconstitución puede ser cualquier solución amortiguadora, pero típicamente es una solución amortiguadora que contiene el activador. El activador se elige como una función de la enzima a ser reconstituida. Por ejemplo, una preparación liofilizada de catepsina L es reconstituida con una solución amortiguadora ácida a alrededor de pH 5.5. Para reconstitución alrededor de 1 µg-20 mg, preferiblemente 10 µg-1 mg, más preferiblemente alrededor de 100 µg se agrega por mL de solución amortiguadora u otro portador adecuado. La cantidad precisa depende de la indicación tratada y compuesto seleccionado. Tal cantidad se puede determinar empíricamente.

2. Administración tópica

Las mezclas tópicas se preparan como se describe para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsiones o similares y se

000210

formulan como cremas, geles, ungüentos, emulsiones, soluciones, elíxires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, rociadores, supositorios, vendajes, parches dermales o cualquiera de otras formulaciones adecuadas para administración tópica.

Los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden formular como aerosoles para aplicación tópica, tales como por inhalación (ver, por ejemplo, Patente de E.U.A. Nos. 4,044,126; 4,414,209; y 4,364,923, que describe aerosoles para suministro de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma). Estas formulaciones para administración al tracto respiratorio pueden ser en la forma de un aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solo o en combinación con un portador inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación serán típicamente de diámetros de menos que 50 micrones, preferiblemente menos que 10 micrones.

Los compuestos se pueden formular para aplicación local o tópica, tal como para aplicación tópica a la piel y membranas mucosas, tales como en el ojo, en la forma de geles, cremas, y lociones y para aplicación al ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. La administración tópica se contempla para suministro transdérmico y también para administración a los ojos o mucosa, o para terapias de inhalación. Las soluciones nasales del compuesto activo solo o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables también se pueden administrar.

Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica se proporcionan. Estas se pueden proporcionar en cualquier formato adecuado, tal como parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor por un periodo prolongado de tiempo. Tales parches contienen el compuesto activo en solución acuosa opcionalmente amortiguada de, por ejemplo, concentración 0.1 hasta 0.2M con respecto al compuesto activo. Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica también se pueden suministrar por iontoforesis (ver, por ejemplo, Pharmaceutical Research 3(6), 318 (1986)) y típicamente toman la forma de una solución acuosa opcionalmente amortiguada del compuesto activo.

3. Composiciones para otras vías de administración

Dependiendo de la condición tratada otras vías de administración, tales como aplicación tópica, parches transdérmicoes, administración oral y rectal también se contemplan en la presente. Por ejemplo, formas de dosificación farmacéuticas para administración rectal son supositorios rectales, cápsulas y comprimidos para efecto sistémico. Los supositorios rectales incluyen cuerpos sólidos para inserción en el recto que se funden o suavizan en la temperatura corporal liberando uno o más ingredientes farmacológicamente o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en los supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para elevar el punto de fusión. Los ejemplos de bases incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, carbocera (polietilen glicol) y mezclas adeucadas de mono-, di- y triglicéridos de ácidos

006212

grasos. Las combinaciones de las diversas bases se pueden usar. Los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios incluyen esperma de ballena y cera. Los supositorios rectales se pueden preparar ya sea por el método comprimido o por moldeo. El peso típico de un supositorio rectal es alrededor de 2 hasta 3 gm. Los comprimidos y cápsulas para administración rectal se fabrican usando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y por los mismos métodos como para formulaciones para administración oral.

Las formulaciones adecuadas para administración rectal se pueden proporcionar como supositorios de dosis unitaria. Estos se pueden preparar al mezclar el compuesto activo con uno o más portadores sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y luego formando la mezcla resultante.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de enlace (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinil pirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); rellenadores (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato de hidrógeno de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de papa o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, sulfato de laurilo de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica.

Las formulaciones adecuadas para administración bucal (sublingual) incluyen, por ejemplo, pastillas que contienen el

compuesto activo en una base de sabor, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; y pastillas que contienen el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar por formulaciones de liberación controlada y/o dispositivos de suministro (ver, por ejemplo, en Patentes de E.U.A. Nos. 3,536,809; 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,847,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,687,610; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5,120,548; 5,354,566; 5,591 ,767; 5,639,476; 5,674,533 y 5,733,566).

Diversos sistemas de liberación se conocen y se pueden usar para administrar enzimas que degradan matriz seleccionadas, tales como pero no se limitan a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor, y suministro de moléculas de ácido nucleico que codifican enzimas que degradan matriz seleccionadas tales como sistemas de suministro de retrovirus.

Por lo tanto, en ciertas modalidades, liposomas y/o nanopartículas también se pueden emplear con administración de enzimas que degradan matriz. Los liposomas se forman de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (también llamadas vesículas multilamelares (MLVs)). Las MLV generalmente tienen diámetros desde 25 nm hasta 4 µm. Típicamente, liposomas también se preparan conteniendo colesterol para estabilizar las nanopartículas. La sonicación

000214

de los MLV resulta en la formación de pequeñas vesículas unilamelares (SUV) con diámetros en el rango de 200 hasta 500 angstroms que contiene una solución acuosa en el núcleo.

Los fosfolípidos pueden formar una variedad de estructuras diferentes a liposomas cuando se dispersa en agua, dependiendo de la relación molar de lípido a agua. En relaciones bajas, la forma de liposomas. Las características físicas de liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden mostrar baja permeabilidad para sustancias iónicas y polares, pero a temperaturas elevadas experimenta una transición de fase que marcadamente altera su permeabilidad. La transición de fase implica un cambio de una estructura ordenada, estrechamente envasada, conocida como el estado de gel, a una estructura menos ordenada, libremente envasada, conocida como el estado líquido. Esto ocurre en una temperatura de transición de fase caracterítica y resulta en un incremento en la permeabilidad a iones, azúcares y fármacos.

Los liposomas interactúan con células por medio de diferentes mecanismos: endocitosis por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial tal como macrófagos y neutrófilos; adsorción a la superficie celular, ya sea por fuerzas hidrofóbicas o electroestáticas débiles no específicas, o por interacciones específicas con componentes de superficie celular; la fusión con la membrana de célula de plasma por inserción de la bicapa de lípido del liposoma en la membrana de plasma, con liberación simultánea de contenidos liposomales en el citoplasma; y por transferencia de lípidos liposomales a membranas celulares o subcelulares, o vice versa, sin ninguna

asociación de los contenidos de liposoma. Variando la formulación de liposoma puede alterar que mecanismo opera, aunque más de uno puede funcionar al mismo tiempo. Las nanocápsulas pueden generalmente atrapar compuestos en una forma estable y reproductiva. Para evitar efectos secundarios debido a sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (tamaño alrededor de 0.1 µm) se deben diseñar usando polímeros capaces de degradarse in vivo. Las nanopartículas biodegradables polialquil-cianoacrilato que cumplen estos requisitos se contemplan para usar en la presente, y tales partículas se pueden hacer fácilmente.

4. Terapias de Combinación

Cualquiera de las enzimas activables que degradan matriz y combinaciones activadoras descritas en este documento se pueden co-formular o co-administrar adicionalmente junto con, antes de, intermitentemente con, o subsecuente a, otros agentes o procedimientos terapéuticos o farmacológicos. Estos agentes incluyen, pero no se limitan a, otros productos biológicos, compuestos de moléculas pequeñas, agentes dispersantes, anestésicos, vasoconstrictores y cirugía, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, para cualquier enfermedad o condición, que incluye todas aquellas ejemplificadas anteriormente, por lo cual otros agentes y tratamientos son disponibles, la enzima degradante de matriz activable y la combinación activadora seleccionada para estas enfermedades y condiciones se pueden usar en combinación con las mismas. En otro ejemplo, un anestésico local, por ejemplo, lidocaína se puede administrar para proporcionar alivio del dolor. En algunos ejemplos, el

anestésico se puede proporcionar en combinación con un vasoconstrictor para incrementar la duración de los efectos anestésicos. Cualquiera de los agentes farmacológicos proporcionados en este documento se puede combinar con un agente de dispersión que facilita el acceso dentro del tejido de los agentes farmacológicos, por ejemplo, después de la administración subcutánea. Estas sustancias son conocidas en el campo e incluyen, por ejemplo, enzimas de glicosaminoglicanasa solubles tales como las enzimas degradante de hialuronano, por ejemplo, miembros de la familia de la glicoproteína de hialuronidasa (véase, *por ejemplo*, Las Publicaciones de E.U.A. Nos. 20050260186 y 20060104968).

Las composiciones de las enzimas activables que degradan matriz proporcionadas en este documento se pueden co-formular o co-administrar con una anestesia local. Por ejemplo, donde el pH se proporciona como la condición de activación, la administración de una anestesia local se desea para minimizar el dolor asociado con la exposición a pH ácido. Las anestesias incluyen formulaciones de fármacos anestésicos locales de acción rápida y de larga duración. Las formulaciones de fármacos anestésicos locales de acción rápida contienen lidocaína o un fármaco anestésico local relacionado disuelto en solución salina u otro vehículo de inyección adecuado. Típicamente, la anestesia local con anestésicos locales de acción rápida duran aproximadamente 20-30 minutos. Los anestésicos ejemplares incluyen, por ejemplo, anestésicos locales no de inhalación tales como ambucainas; amoxecainas; amilocainas; aptocainas; articainas; benoxinatos; alcoholes

bencílicos; benzocaínas; betoxicainas; bifenaminas; bucricainas; bumecainas; bupivacainas; butacainas; butambenos; butanilicainas; carbizocainas; cloroprocaina; clibucainas; clodacainas; cocainas; dexivacainas; diamocainas; dibucainas; dicloninas; elucainas; etidocainas; euprocinas; fexicainas; fomocainas; heptacainas; hexilcainas; hidroxiprocainas; hidroxitetracainas; isobutambenos; cetocainas; leucinocainas; lidocainas; mepivacainas; meprilcainas; octocainas; ortocainas; oxetacainas; oxibuprocainas; fenacainas; pinolcainas; piperocainas; piridocainas; polidocanoles; pramocainas; prilocainas; procainas; propanocainas; propipocainas; propoxicainas; proximetacainas; pirrocainas; quatacainas; quinisocainas; risocainas; rodocainas; ropivacainea; alcoholes salicílicos; suicainas; tetracainas; trapencainas; y trimecainas; así como también varios otros anestésicos no de inhalación tales como alfaxalonas; amolanonas; etoxadroles; fentanilos; cetaminas; levoxadroles; metiturales; metohexitales; midazolamas; minaxolonas; propanididos; propoxatos; pramoxinas; propofoles; remifentanilos; sufentanilos; tiletaminas; y zolamina. La cantidad efectiva de la formulación variará dependiendo del paciente particular, enfermedad que se trata, vía de administración y otras consideraciones. Estas dosificaciones se pueden determinar empíricamente.

Debido a la vida media corta de los anestésicos locales, es frecuentemente deseable co-administrar o co-formular estos anestésicos con un vasoconstrictor. Ejemplos de vasoconstrictores incluyen agonistas del receptor adrenérgico

alfa que incluye catecolaminas y derivados de catecolamina. Ejemplos particulares incluyen, pero no se limitan a, levonordefrina, epinefrina y norepinefrina. Por ejemplo, una formulación anestésica local tal como lidocaína, se puede formular para contener bajas concentraciones de epinefrina u otro agonista del receptor adrenérgico tal como levonordefrina. La combinación de anestésicos locales con agonistas del receptor adrenérgico es común en las preparaciones farmacéuticas (véase por ejemplo, las Patentes de E.U.A. Nos. 7,261,889 y 5,976,556). El vasoconstrictor es necesario para incrementar la vida media de los anestésicos. El vasoconstrictor, tal como epinefrina, estimula los receptores adrenérgicos alfa en los vasos sanguíneos en el tejido inyectado. Esto tiene el efecto de construcción de los vasos sanguíneos en el tejido. La construcción del vaso sanguínea causa que el anestésico local permanezca en el tejido mucho más tiempo, dando por resultado un gran incremento en la duración del efecto anestésico.

Generalmente, un vasoconstrictor se usa en este documento en combinación con un anestésico. El agente anestésico y el vasoconstrictor se pueden administrar juntos como parte de una sola composición farmacéutica o como parte de composiciones farmacéuticas separadas siempre y cuando el vasoconstrictor actúe para reducir los vasos sanguíneos en la vecindad y el agente anestésico se ha administrado para dar por resultado una prolongación de la anestesia. En un ejemplo, el agente anestésico y vasoconstrictor se administran juntos en solución. Además, el agente anestésico y el vasoconstrictor se pueden

formular juntos o separados de la enzima degradante de matriz activable y activador. Se prefieren formulaciones solas. El agente anestésico y el vasoconstrictor se pueden administrar por inyección, por infiltración o por administración tópica, por ejemplo, como parte de un gel o pasta. Típicamente, el agente anestésico y el vasoconstrictor se administran por inyección directamente dentro del sitio que se anestesia, por ejemplo, mediante la administración subcutánea. La cantidad efectiva en la formulación variará dependiendo del paciente particular, enfermedad que se trata, vía de administración y otras consideraciones. Estas dosificaciones se pueden determinar empíricamente. Por ejemplo, las cantidades ejemplares de lidocaína están o son aproximadamente 10 mg a 1000 mg, 100 mg a 500 mg, 200 mg a 400 mg, 20 mg a 60 mg, o 30 mg a 50 mg. La dosificación de lidocaína administrada variará dependiendo del individuo y la vía de administración. La epinefrina se puede administrar en cantidades tales como, por ejemplo, 10 µg a 5 mg, 50 µg a 1 mg, 50 µg a 500 µg, 50 µg a 250 µg, 100 µg a 500 µg, 200 µg a 400 µg, 1 mg a 5 mg o 2 mg a 4 mg. Típicamente, la epinefrina se puede combinar con lidocaína en una dilución de 1:100,000 a 1:200,000, lo cual significa que 100 ml de anestésico contiene 0.5 a 1 mg de epinefrina. Los volúmenes administrados se pueden ajustar dependiendo de la enfermedad que se trata y la vía de administración. Se contempla en este documento que 1-100 ml, 1-50 ml, 10-50 ml, 10-30 ml, 1-20 ml, o 1-10 ml, típicamente 10-50 ml de una formulación de anestésico/vasoconstrictor se puede administrar subcutáneamente para el tratamiento de una

enfermedad o condición mediada por ECM tal como celulitis. La administración puede ser subsecuente, simultánea o intermitentemente con la administración de una enzima degradante de matriz activable y activador.

Las composiciones de las enzimas activables que degradan matriz proporcionadas en este documento también se pueden co-formular o co-administrar con un agente de dispersión. El agente de dispersión también se puede co-formular o co-administrar con otros agentes farmacológicos, tales como anestésicos, vasoconstrictores, u otros agentes biológicos. Ejemplares de los agentes de dispersión son las glicosaminoglicanasas, tales como las enzimas degradantes de hialuronano, por ejemplo, hialuronidasas, que abren los canales en el espacio intersticial a través de la degradación de los glicosaminoglicanos. Estos canales pueden permanecer relativamente abiertos durante un período de 24-48 horas dependiendo de la dosis y formulación. Estos canales se pueden usar para facilitar la difusión de moléculas exógenamente agregadas tales como fluidos, moléculas pequeñas, proteínas (tales como enzimas degradantes de matriz), ácidos nucleicos y vectores de terapia génica y otras moléculas menores que aproximadamente 500 nm en tamaño. Además, se piensa que la formación de estos canales puede facilitar el flujo de fluido de volumen dentro de un espacio intersticial, el cual puede a su vez promover la dispersión o movimiento de un soluto (tal como una molécula detectable u otro agente de diagnóstico, un anestésico u otro agente modificador de tejido, un agente farmacológico o agente farmacéuticamente efectivo, o un

cosmético u otro agente estético) que se lleva efectivamente por el fluido en un proceso algunas veces referido como "transporte convectivo" o simplemente convección. Este transporte convectivo puede exceder sustancialmente la velocidad y efectos acumulativos de difusión molecular y de esta manera puede causar el agente terapéutico y otra molécula administrada se perfusiona más rápida y efectivamente a un tejido. Adicionalmente, cuando un agente, tal como una enzima degradante de matriz, anestésico u otro agente, se co-formula o co-administra con una glicosaminoglicanasa y ambos se inyectan en un sito local relativamente confinado, tal como un sitio de administración parenteral no intravenosa (por ejemplo, intradérmica, subcutánea, intramuscular, o dentro o alrededor de otros tejidos internos, órganos u otros espacios relativamente confinados dentro del cuerpo), luego, el fluido asociado con la dosis administrada puede proporcionar tanto una fuerza de accionamiento local (es decir presión hidrostática) así como también impedancia más baja al flujo (al abrir canales dentro de la matriz intersticial), ambos de los cuales podrían incrementar el flujo del fluido, y con el transporte convectivo del agente terapéutico u otra molécula contenida dentro del fluido. Como resultado, el uso de glicosaminoglicanasas puede tener utilidad sustancial para mejorar la biodisponibilidad así como también manipular otras características farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de los agentes co-formulados o co-administrados, tales como enzimas degradantes de matriz.

a. Enzimas Degradantes de Hialuronano

Ejemplos de las glicosaminoglicanasas son las enzimas

degradantes de hialuronano. Las enzimas degradantes de hialuronano incluyen cualquier enzima que degrade el hialuronano. Las enzimas degradantes de hialuronano ejemplares incluyen, pero no se limitan a hialuronidasas y condroitinasas particulares y liasas que tienen la capacidad de escisar el hialuronano. Ejemplares de las enzimas degradantes de hialuronano en las composiciones, combinaciones y métodos proporcionados en este documento son las enzimas degradantes de hialuronano solubles. Por ejemplo, ejemplares de las glicosaminoglicanasas son las hialuronidasas. Las enzimas degradantes de hialuronano, tales como hialuronidasas, son una familia de enzima que degrada el ácido hialurónico. Al catalizar la hidrólisis del ácido hialurónico, un constituyente principal de la barrera intersticial, la hialuronidasa disminuye la viscosidad del ácido hialurónico, incrementando en consecuencia la permeabilidad del tejido.

El hialuronano, también llamado ácido hialurónico o hialuronato, es un glicosaminoglicano no sulfatado que se distribuye ampliamente por todo los tejidos conjuntivos, epiteliales y neurales. El hialuronano es un componente esencial de la matriz extracelular y un constituyente principal de la barrera intersticial. Al catalizar la hidrólisis del hialuronano, las enzimas degradantes de hialuronano disminuyen la viscosidad del hialuronano, incrementando en consecuencia la permeabilidad del tejido e incrementando la velocidad de absorción de los fluidos administrados parenteralmente. Como tal, las enzimas degradantes de hialuronano, tales como hialuronidasas, se han usado, por ejemplo, como agentes de

difusión o dispersión en conjunción con otros agentes, fármacos y proteínas para mejorar su dispersión y suministro.

Las enzimas degradantes de hialuronano actúan para degradar el hialuronano al escisar los polímeros de hialuronano, los cuales se componen de unidades de disacáridos de repetición, ácido D-glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), enlazados juntos por la vía de los enlaces glicosídicos β-1 → 4 y β-1→ 3 alternantes. Las cadenas de hialuronano pueden alcanzar aproximadamente 25,000 repeticiones de disacáridos o más en longitud y polímeros de hialuronano pueden variar en tamaño de aproximadamente 5,000 a 20,000,000 Da in vivo. Por consiguiente, las enzimas degradantes de hialuronano para los usos y métodos proporcionados incluyen cualquier enzima que tenga la capacidad de catalizar la escisión de una cadena de disacáridos de hialuronano o polímero. En algunos ejemplos la enzima degradante de hialuronano escisa el enlace glicosídico β-1→ 4 en la cadena de hialuronano o polímero. En otros ejemplos, la enzima degradante de hialuronano cataliza la escisión del enlace glicosídico β- 1→ 3 en la cadena de hialuronano o polímero.

i. Hialuronidasas

Existen tres clases generales de hialuronidasas: hialuronidasas de tipo de mamífero, (EC 3.2.1.35) las cuales son endo-beta-N-acetilhexosaminidasas con tetrasacáridos y hexasacáridos como los productos finales principales; Hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.99.1), degradan el hialuronano y, y a varios grados, los sulfatos de condroitina

(CS) y sulfatos de dermatan (DS), los cuales son endo-beta-N-acetilhexosaminidasas que operan por una reacción de eliminación beta que produce principalmente productos finales de disacárido; e Hialuronidasas (EC 3.2.1.36) de sanguijuelas, otros parásitos, y crustáceos que son endo-beta-glucuronidasas que generan productos finales de tetrasacárido y hexasacárido a través de la hidrólisis del enlace β-1-3.

1) Hialuronidasas de tipo de mamífero

Las hialuronidasas de tipo de mamífero tienen actividades tanto hidrolíticas como transglicosidasa, y pueden degradar el hialuronano y los sulfatos de condroitina (CS), generalmente C4-S y C6-S. Las hialuronidasas de este tipo incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasas de vacas (bovino) (SEQ ID NOS:237, 266 y 272 y BH55 (Patentes de E.U.A. Nos. 5,747,027 y 5,827,721), oveja (ovis aries) (SEQ ID NO:252, 267, 271 y 272), avispa chaqueta amarilla (SEQ ID NOS:238 y 239), abeja de la miel (SEQ ID NO:240), avispón cara blanca (SEQ ID NO:241), avispa de papel (SEQ ID NO:242), ratón (SEQ ID NOS:243-245, 257), cerdo (SEQ ID NOS:246, 247), rata (SEQ ID NOS:248-250, 256), conejo (SEQ ID NO:251), orangután (SEQ ID NO:253), mono cynomolgus (SEQ ID NO:254), cobayo (SEQ ID NO:255), e hialuronidasas humanas. Ejemplares de las hialuronidasas en las composiciones, combinaciones y métodos proporcionados en este documento son las hialuronidasas solubles.

Existen seis genes similares a la hialuronidasa en el genoma humano, HYAL1 (SEQ ID NO:262), HYAL2 (SEQ ID NO: 263), HYAL3 (SEQ ID NO:264), HYAL4 (SEQ ID NO:265) y PH20/SPAM1 (SEQ ID NO:232). Entre las hialuronidasas, la PH20 es la enzima

activa neutra prototípica, mientras que las otras no exhiben actividad catalítica hacia el hialuronano o cualquiera de los substratos conocidos, o son activos únicamente bajo condiciones de pH. Las enzimas similares a hialuronidasa también se pueden caracterizar por aquellas que se fijan generalmente a la membrana plasmática por la vía de un ancla de inositol de glicosilfosfatidilo tal como la HYAL2 humana y PH20 humana (Danilkovitch-Miagkova, y colaboradores (2003) Proc Natl Acad Sci EUA. 100(8):4580-5), y aquellas que son generalmente solubles tales como la HYAL1 humana (Frost y colaboradores, (1997) Biochem Biophys Res Commun. 236(1):10-5). La glicosilación enlazada a N de algunas hialuronidasas puede ser muy importante para su actividad y estabilidad catalítica. Al alterar el tipo de modificación de glicano una glicoproteína puede tener efectos notables sobre una antigenicidad de la proteína, plegamiento estructural, solubilidad, y estabilidad, muchas enzimas no se cree que requieran glicosilación para la actividad enzimática óptima. Las hialuronidasas son, por lo tanto, únicas en este aspecto, en que la remoción de la glicosilación enlazada a N puede dar por resultado inactivación casi completa de la actividad de la hialuronidasa. Para estas hialuronidasas, la presencia de los glicanos enlazados a N es crítica para generar una enzima activa.

Por consiguiente, las hialuronidasas de mamífero se pueden subdividir adicionalmente en aquellas que son activas neutras, encontradas predominantemente en extractos de testículos, y activas ácidas, encontradas predominantemente en órganos tal como el hígado. Las hialuronidasas activas neutras ejemplares

incluyen PH20, que incluye pero no se limita a, PH20 derivadas de diferentes especies tales como ovino (SEQ ID NO:267), bovino (SEQ ID NO:266) y humano (SEQ ID NO:232).

La PH20 humana (también conocida como proteína de superficie del espermatozoide PH20) se implica naturalmente en la adhesión del espermatozoide-óvulo y ayuda a la penetración por el espermatozoide de la capa de la célula del cumulus al digerir el ácido hialurónico. El transcripto PH20 ARNm (que corresponde los nucleótidos 1058-2503 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO:224) se traduce normalmente para generar una proteína precursora de 509 aminoácidos que contiene una secuencia de señal de 35 aminoácidos en la N-terminal (posiciones de residuos de aminoácidos 1-35) y una ancla GPI de 19 aminoácidos en la C-terminal (que corresponde a los residuos de aminoácidos 491-509). La secuencia de precursores se expone en SEQ ID NO:232. Un transcripto de ARNm que contiene una mutación de C a T en la posición de nucleótidos 2188 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:224 también existe y es una mutación silenciosa que da por resultado el producto traducido expuesto en SEQ ID NO: 232. El PH20 maduro es, por lo tanto, un polipéptido de 474 aminoácidos expuesto en SEQ ID NO:233). Existen sitios de glicosilación enlazada a N potenciales requeridos para la actividad de las hialuronidasas en N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 de PH20 humano ejemplificado en SEQ ID NO: 232. Los enlaces de disulfuro se forman entre los residuos de cisteína C60 y C351 y entre C224 y C238 (que corresponden a los aminoácidos expuestos en SEQ ID NO:232) para formar el dominio de hialuronidasa de núcleo. Sin

embargo, las cisteínas adicionales son requeridas en la carboxi terminal para la actividad catalítica enzimática neutra tal que los aminoácidos 36 a 464 de SEQ ID NO:232 contiene aluminio de hialuronidasa PH20 humano mínimamente activo.

El PH20 bovino es un polipéptido precursor de 553 aminoácidos (SEQ ID NO:266). La alineación del PH20 bovino con el PH20 humano muestra únicamente homología débil, con múltiples espacios que existen desde el aminoácido 470 hasta el carboxi-terminal respectivo debido a la ausencia de un ancla GPI en el polipéptido bovino (véase *por ejemplo*, Frost GI (2007) *Expert Opin. Drug. Deliv.* 4: 427-440). No se predice un ancla GPI clara en otras especies PH20 además de los humanos. Por ejemplo, los polipéptidos PH20 producidos de ovino y bovino existen como formas solubles. Aunque el PH20 bovino existe adherido muy sueltamente a la membrana plasmática, no se ancla por la vía de un ancla sensible de fosfolipasa (Lalancette y colaboradores. (2001) *Biol Reprod.* 65(2):628-36). Esta característica única de las hialuronidasa bovina ha permitido el uso de la enzima de hialuronidasa de testículos de bovino solubles como un extracto para el uso clínico (Wydase^{MR}, Hyalase^{MR}).

2) Hialuronidasas Bacterianas

Las hialuronidasas bacterianas (EC 4.2.2.1 o EC 4.2.99.1) degradan el hialuronano y, a varios grados, los sulfatos de condroitina y sulfatos de dermatano. Las liasas de hialuronano aisladas de bacterias difieren de las hialuronidasas (de otras fuentes, por ejemplo, hialuronoglucosaminidasas, EC 3.2.1.35) por su modo de acción. Son endo-β-N-acetilhexosaminidasas que

catalizan una reacción de eliminación, antes que de hidrólisis, del enlace glicosídico β1 → 4 entre la N-acetil-beta-D-glucosamina y residuos de ácido D-glucurónico en el hialuronano, produciendo tetra y hexasacáridos de 3-(4-desoxi-β-D-gluc-4-enuronosil)-N-acetil-D-glucosamina, y productos finales de disacárido. La reacción da por resultado la formación de oligosacáridos con residuos de ácido hexurónico insaturado en sus extremos no de reducción.

Las hialuronidasas ejemplares de bacterias para el uso en sus composiciones, combinaciones y métodos por proporcionados incluyen, pero no se limitan a, enzimas degradantes de hialuronano en microorganismos, que incluyen cepas de *Arthrobacter, Bdellovibrio, Clostridium, Micrococcus, Streptococcus, Peptococcus, Propionibacterium, Bacteroides,* y *Streptomyces.* Ejemplos particulares de estas enzimas incluyen, pero no se limitan *Arthrobacter sp.* (cepa FB24) (SEQ ID NO:275), *Bdellovibrio bacteriovorus* (SEQ ID NO:276), *Propionibacterium acnes* (SEQ ID NO:277), *Streptococcus agalactiae* ((SEQ ID NO:278); 18RS21 (SEQ ID NO:279); serotipo Ia (SEQ ID NO:280); serotipo III (SEQ ID NO:281), *Staphylococcus aureus* (cepa COL (SEQ ID NO:282); cepa MRSA252 (SEQ ID NOS:283 y 284); cepa MSSA476 (SEQ ID NO:285); cepa NCTC 8325 (SEQ ID NO:286); cepa de RF122 de bovino (SEQ ID NOS:287 y 288); cepa USA300 (SEQ ID NO:289), *Streptococcus pneumoniae* ((SEQ ID NO:290); cepa ATCC BAA-255 / R6 (SEQ ID NO:291); serotipo 2, cepa D39 / NCTC 7466 (SEQ ID NO:292), *Streptococcus pyogenes* (serotipo M1) (SEQ ID NO:293); serotupo M2, cepa MGAS 10270 (SEQ ID NO:294); serotipo M4, cepa MGAS 10750 (SEQ ID

NO:295); serotipo M6 (SEQ ID NO:296); serotipo M1 2, cepa MGAS2096 (SEQ ID NOS:297 y 298); serotipo M 12, cepa MGAS9429 (SEQ ID NO:299); serotipo M28 (SEQ ID NO:300); *Streptococcus suis* (SEQ ID NOS:301-303); *Vibrio fischeri* (cepa ATCC 700601/ ES114 (SEQ ID NO:304)), y la enzima de hialuronidasa *Streptomyces hyaluronolyticus*, la cual es específica para el ácido hialurónico y no escisa la condroitina o el sulfato de condroitina (Ohya, T. y Kaneko, Y. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 198:607).

3) Hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos

Las hialuronidasas de sanguijuelas, otros parásitos y crustáceos (EC 3.2.1.36) son endo-β- glucuronidasas que generan productos finales de tetra y hexasacáridos. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces β1 → 3 entre el β-D-glucuronato y los residuos de N-acetil-D-glucosamina en el hialuronato. Las hialuronidasas ejemplares de sanguijuelas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasa de Hirudinidae (*por ejemplo, Hirudo medicinalis*), Erpobdellidae (*por ejemplo, Nephelopsis obscura* y *Erpobdella punctata*), Glossiphoniidae (*por ejemplo, Desserobdella picta, Helobdella stagnalis, Glossiphonia complanata, Placobdella ornata* y *Theromyzon sp.*) y Haemopidae (*Haemopis marmorata*) (Hovingh y colaboradores. (1999) *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 124(3):319-26). Una hialuronidasa ejemplar de bacterias que tiene el mismo mecanismo de acción como la hialuronidasa de sanguijuela es aquella de la cianobacteria, *Synechococcus sp.* (cepa RCC307, SEQ ID NO:305).

000230

ii. Otras enzimas degradantes de hialuronano

Además de la familia de hialuronidasa, otras enzimas degradantes de hialuronano se pueden usar en conjunción con las enzimas activables que degradan matriz en las composiciones, combinaciones y métodos proporcionados. Por ejemplo, las enzimas, que incluyen condroitinasas y liasas particulares, que tienen la capacidad de escisar el hialuronano se pueden emplear. Las condroitinasas ejemplares que pueden degradar el hialuronano incluyen, pero no se limitan a, condroitina ABC liasa (también conocida como condroitinasa ABC), condroitina AC liasa (también conocida como sulfato de condroitina liasa o sulfato de condroitina eliminasa) y condroitina C liasa. Los métodos para la producción y purificación de estas enzimas para el uso en las composiciones, combinaciones, y métodos proporcionados son conocidos en el campo (*por ejemplo*, patente de E.U.A. No. 6,054,569; Yamagata, y colaboradores. (1968) *J. Biol. Chem.* 243(7): 1523-1535; Yang y colaboradores. (1985) *J. Biol. Chem.* 160(30):1849-1857).

La condroitina ABC liasa contiene dos enzimas, sulfato de condroitina ABC endoliasa (EC 4.2.2.20) y sulfato de condroitina ABC exoliasa (EC 4.2.2.21) (Hamai y colaboradores. (1997) *J Biol Chem.* 272(14):9123-30), los cuales degradan una variedad de glicosaminoglicanos del tipo de sulfato de condroitina y sulfato de dermatano. El sulfato de condroitina, proteoglicano de sulfato de condroitina y sulfato de dermatano son los substratos preferidos para el sulfato de condroitina ABC endoliasa, pero la enzima también puede actuar sobre el hialuronano a una velocidad más lenta. La sulfato de

condroitina ABC endoliasa degrada una variedad de glicosaminoglicanos del tipo de sulfato de condroitina y sulfato de dermatano, produciendo una mezcla de oligosacáridos Δ4-insaturados de diferentes tamaños que se degradan finalmente a tetra- y disacáridos Δ4-insaturados. La sulfato de condroitina ABC exoliasa tiene la misma especificidad de substrato pero remueve los residuos de polisacáridos de los extremos no de reducción de ambos sulfatos de condroitina polimérica y sus fragmentos de oligosacáridos producidos por la sulfato de condroitina ABC endoliasa (Hamai, A. y colaboradores. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:9123-9130). Una sulfato de condroitina ABC endoliasas ejemplares y sulfato de condroitina ABC exoliasas incluyen pero no se limitan a, aquellas de *Proteus vulgaris* y *Flavobacterium heparinum* (el sulfato de condroitina ABC endoliasa de *Proteus vulgaris* se expone en SEQ ID NO: 306 (Sato y colaboradores. (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41(1):39-46).

La condroitina AC liasa (EC 4.2.2.5) es activa en los sulfatos de condroitina A y C, condroitina y ácido hialurónico, pero no es activa en el sulfato de dermatano (sulfato de condroitina B). Las enzimas de condroitinasa AC ejemplares de las bacterias incluyen pero no se limitan a, aquellas de *Flavobacterium heparinum* y *Victivallis vadensis*, expuestas en SEQ ID NOS:307 y 308, respectivamente, y *Arthrobacter aurescens* (Tkalec y colaboradores. (2000) *Applïed and Environmental Microbiology* 66(1):29-35; Ernest y colaboradores. (1995) *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30(5):387-444).

La condroitinasa C escisa el sulfato de condroitina C produciendo tetrasacáridos más un disacárido sulfatado-6 insaturado (delta Di-6S). También escisa el ácido hialurónico que produce disacárido no sulfatado insaturado (delta Di-OS). Las enzimas de condroitinasa C ejemplares de las bacterias incluyen, peo no se limitan a, aquellas de *Streptococcus* y *Flavobacterium* (Hibi y colaboradores. (1989) *FEMS-Microbiol-Lett.* 48(2):121-4; Michelacci y colaboradores. (1976) *J. Biol. Chem.* 251:1 154-8; Tsuda y colaboradores (1999) *Eur. J. Biochem.* 262: 127-133).

iii. Enzimas degradantes solubles de hialuronano

Las enzimas degradantes de hialuronano solubles, que incluyen hialuronidasas solubles se pueden usar en los métodos, combinaciones o composiciones proporcionadas en este documento para la coadministración o co-formulación con las enzimas degradantes de matriz, activadores, anestésicos, vasoconstrictores, otros agentes farmacológicos o terapéuticos, o combinaciones de los mismos, para permitir la difusión dentro de los tejidos. Las enzimas degradantes de hialuronano solubles incluyen cualquiera de las enzimas degradantes de hialuronano que existen en forma soluble, que incluyen, pero no se limitan a hialuronidasas tales como PH20 bovina y PH20 ovina, variantes alélicas de las mismas y otras variantes. También se incluyen entre las enzimas degradantes de hialuronano solubles cualquiera de las enzimas degradantes de hialuronano que se han modificado para ser solubles. Por ejemplo, las enzimas degradantes de hialuronano que contienen un ancla GPI se pueden hacer solubles mediante el truncamiento de y remoción de todo o

una porción del ancla GPI. En un ejemplo, la PH20 de hialuronidasa humana, la cual se ancla a la membrana normalmente por la vía de un ancla GPI, se puede hacer soluble mediante el truncamiento de y remoción de todo o una porción del ancla GPI en la C-terminal.

Las enzimas degradantes de hialuronano solubles también incluyen hialuronidasas activas neutras y activas ácidas. Dependiendo de los factores, tales como, pero no se limitan a, el nivel deseado de actividad de la enzima después de la administración y/o sitio de administración, se pueden seleccionar hialuronidasas activas neutras y activas ácidas. En un ejemplo particular, la enzima degradante de hialuronano para el uso de las composiciones, combinaciones y métodos es una hialuronidasa activa neutra soluble.

Ejemplar de una hialuronidasa soluble es la PH20 de cualquier especie, tal como cualquiera expuesta en cualquiera de SEQ ID NOS:232, 233, 266, 251 , 267, 255, 257, 271-274, o formas truncadas de las mismas que carecen todo o una porción del ancla GPI C-terminal, siempre y cuando la hialuronidasa sea soluble y retenga una actividad de hialuronidasa. También se incluyen entre las hialuronidasas solubles variantes alélicas u otras variantes de cualquiera de SEQ ID NOS:232, 233, 266, 251 , 267, 255, 257, 271-274, o formas truncadas de las mismas. Las variantes alélicas y otros variantes son conocidas por una persona de experiencia en el campo, e incluyen polipéptidos que tienen 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% o más de identidad de secuencia para cualquiera de SEQ ID NOS:232, 233, 266, 251, 267, 255, 257, 271-274, o formas truncadas de las

mismas.

Típicamente, para el uso en las composiciones, combinaciones y métodos en este documento, se usa una PH20 humana soluble. Aunque la PH20 de otros animales se puede usar, estas preparaciones son potencialmente inmunogénicas, puesto que son proteínas de animal. Por ejemplo, una proporción significativa de pacientes demuestran sensibilización previa secundaria a alimentos ingeridos, y puesto que estos son proteínas de animal, todos los pacientes tienen un riesgo de sensibilización subsecuente. De esta manera, las preparaciones no humanas pueden no ser adecuadas para el uso crónico. Si las preparaciones no humanas se desean, se contempla en este documento que estos polipéptidos se pueden preparar para tener inmunogenicidad reducida. Estas modificaciones están dentro del nivel de una persona experta en el campo y pueden incluir, por ejemplo, la remoción y/o reemplazo de uno o más epítopos antigénicos sobre la molécula.

Las enzimas degradantes de hialuronano, que incluyen hialuronidasas (por ejemplo, PH20), usadas en los métodos en este documento se pueden producir recombinantemente o se pueden purificar o purificar parcialmente de fuentes naturales, tales como, por ejemplo, de extractos de testículos. Los métodos para la producción de proteínas recombinantes, que incluyen enzimas degradantes de hialuronano recombinantes, se proporcionan en cualquier lugar en este documento y son bien conocidas en el campo.

1) PH20 Humano Soluble

Por ejemplo, las formas solubles de PH20 humano

recombinante se han producido y se pueden usar en los métodos descritos en este documento para la co-administración o co-formulación con las enzimas degradantes de matriz, activadores, anestésicos, vasoconstrictores, otros agentes farmacológicos terapéuticos, o combinaciones de los mismos, para permitir la difusión dentro de los tejidos. La producción de estas formas solubles de PH20 se describe en la solicitud relacionada Nos. De Serie 11/065,716 y 11/238,171, y en los Ejemplo s 12-15 posteriormente. Las formas solubles incluyen, pero no se limitan a, cualquiera que tenga truncaciones C-terminal para generar polipéptidos que contienen un aminoácido a 347, 372, 394, 413, 430, 447, 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:232. Cuando se expresa en las células de mamífero, la secuencia de señal N-terminal de 35 aminoácidos se escisa durante el procesamiento, y se secreta la forma madura de la proteína. De esta manera, los polipéptidos solubles maduros contienen 36 a 347, 372, 394, 413, 430, 447, 467, 477, 478, 479, 480, 481, 482 y 483 aminoácidos de SEQ ID NO:232. Los mutantes de supresión que determinan en la posición 477 a 483 de aminoácidos (que corresponde al polipéptido precursor expuesto en SEQ ID NO:232) exhiben actividad de hialuronidasa secretada más alta que la forma anclada a GPI de longitud completa. Por consiguiente las formas solubles incluyen, pero no se limitan a, cualquiera que tenga truncaciones C-terminal para generar los polipéptidos que contienen un aminoácido a 442, 443, 444, 445, 446 y 447 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOS 226-231,

respectivamente, o variantes alélicas o especies u otras variantes de las mismas. Generalmente las formas solubles de PH20 se producen usando sistemas de expresión de proteínas que facilita la N-glicosilación correcta para asegurar que el polipéptido retenga la actividad, puesto que la glicosilación es importen para la actividad catalítica y estabilidad de las hialuronidasas. Estas células incluyen, por ejemplo células de ovario de Hámster Chino (CHO) (*por ejemplo* DG44 CHO).

2) rHuPH20

Las formas solubles recombinantes del PH20 humano se han generado y se pueden producir y purificar usando los métodos descritos en este documento. La generación de estas formas solubles de PH20 recombinante se describen en la Solicitud relacionada Nos de Serie 11/065,716 y 11/238,171, y en los Ejemplos 12-15 posteriormente. Ejemplares de este polipéptido son aquellos generados de una molécula de ácido nucleico que codifica 1-482 aminoácidos expuestos en SEQ ID NO:225. La generación, producción y purificación de este PH20 se describe en los Ejemplos 12-15 posteriormente. El rHuPH20 purificado resultante puede ser heterogéneo debido a las peptidasas presentes en el medio de cultivo en la producción y purificación. Como se produce en el medio de cultivo existe heterogeneidad en la C-terminal de modo que el producto, llamado rHuPH20, incluye una mezcla de especies que pueden incluir cualquiera de una o más de SEQ ID NOS. 226-231 en varias abundancias. Generalmente las formas solubles de PH20, al como rHuPH20, se producen usando los sistemas de expresión de proteínas que facilitan la N-glicosilación correcta para

asegurar que el polipéptido retenga la actividad, puesto que la glicosilación es importante para la actividad catalítica y la estabilidad de las hialuronidasas. Estas células incluyen, por ejemplo células de Ovario de Hámster Chino (CHO) (*por ejemplo* células DG44 CHO).

Las enzimas degradantes de hialuronano, tal como cualquier hialuronidasa, en particular un PH20 soluble tal como rHuPH20, se puede administrar por cualquiera vía adecuada como se describe en otra parte en este documento. Típicamente, la administración es mediante administración parenteral, tal como mediante administración intradérmica, intramuscular, subcutánea o intravascular. Los compuestos proporciona en este documento se pueden formular para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para la inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampolletas o en envases de múltiples dosis, con un conservador adicionado. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, aguas sin pirógeno estéril u otros solventes, antes del uso. Por ejemplo, se proporcionan en este documento formulaciones parenterales que contienen una cantidad efectiva de PH20 soluble, tal como 10 Unidades a 500,000 Unidades, 100 Unidades a 100,000 Unidades, 500 Unidades a 50,000 Unidades, 1000 Unidades a

10,000 Unidades, 5000 Unidades a 7500 Unidades, 5000 Unidades a 50,000 Unidades, o 1,000 Unidades a 10,000 Unidades, generalmente 10,000 a 50,000 Unidades, in una solución o suspensión estabilizada o una forma liofilizada las formulaciones se pueden proporcionar en formas de dosis unitaria tales como, pero no se limitan a, ampolleta, jeringas y tabletas o cápsulas individualmente empaquetadas. El agente de dispersión se puede administrar solo, o con otros agentes farmacológicamente efectivos en un volumen típicamente 1-100 ml, 1-50 ml, 10-50 ml, 10-30 ml, 1-20 ml, o 1-10 ml, típicamente 10-50 ml.

En un ejemplo de una terapia de combinación, se contempla en este documento un anestésico, vasoconstrictor y agente de dispersión se co-administran o co-formulan con una enzima degradante de matriz activable y activador que se administra subsecuentemente, simultáneamente o intermitentemente con los mismos. Una formulación ejemplar es una que contiene lidocaína, epinefrina y un PH20 soluble, por ejemplo, un PH20 soluble expuesto en SEQ ID NO:226. El PH20 soluble se puede mezclar directamente con lidocaína (Xilocaína), y opcionalmente con epinefrina. La formulación se puede preparar en una forma de dosificación unitaria, tal como en una jeringa. Por ejemplo, la formulación de lidocaína/epinefrina/PH20 soluble se puede proporcionar en un volumen, tal como 1-100 ml, 1-50 ml, 10-50 ml, 10-30 ml, 1-20 ml, o 1-10 ml, típicamente 10-50 ml, empaquetada en una jeringa para el uso.

En las terapias de combinación, los otros agentes farmacológicos, tal como una formulación de

lidocaína/epinefrina/PH20 soluble, se puede co-administrar junto con o en proximidad temporal cercana a la administración de una enzima degradante de matriz activable (y activador). Típicamente se prefiere que el anestésico y/o agente de dispersión se administren poco antes (*por ejemplo* 5 a 60 minutos antes) o, por conveniencia máxima, junto con el agente farmacológico. Como se apreciará por aquellas personas expertas en el campo, la proximidad deseada de la co-administración depende en parte significativa en las vidas medias efectivas de los agentes en la configuración del tejido particular, y la enfermedad particular que se trata, y se puede utilizar fácilmente al someter a prueba los efectos de la administración de los agentes en tiempos variantes en modelos adecuados, tal como en modelos animal adecuados.

iv. Modificaciones de enzimas degradantes del hialuronano para mejorar sus propiedades farmacocinéticas

Las enzimas degradantes de hialuronano se pueden modificar para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, tal como al incrementar su vida media *in vivo* y/o actividades. Las modificación de las enzimas degradantes de hialuronano para el uso en las composiciones, combinaciones y/o métodos proporcionados pueden incluir unir, directa o indirectamente por la vía de un enlazador, tal como covalentemente o mediante otro enlace adecuado, un polímero, tal como dextrano, un polietilenglicol (pegilación (PEG)) o porción de sialilo, u otro de estos polímeros, tal como polímeros naturales o de azúcar.

La pegilación de los agentes terapéuticos se sabe que

incrementa la resistencia a la proteólisis, incrementa la vida media plasmática, y disminuye la antigenicidad de inmunogenicidad. La unión covalente u otra estable (conjugación) de las moléculas poliméricas, tal como la porción de polietilenglicol (PEG), a la enzima degradante de hialuronano puede impartir de esta manera propiedades benéficas a la composición de enzima-polímero resultante. Estas propiedades incluyen biocompatibilidad mejorada, extensión de la vida media de la proteína (y actividad enzimática) en la sangre, células y/u otros tejidos dentro de un sujeto, protección efectiva de la proteína de las proteasas y la hidrólisis, biodistribución mejorada, farmacocinética y/o farmacodinámica mejorada, y solubilidad al agua incrementada.

Los polímeros ejemplares que se pueden conjugar a la enzima degradante de hialuronano, incluyen homopolímeros naturales y sintéticos, tales como polioles (es decir poli-OH), poliaminas (es decir poli-NH2) y ácidos policarboxílicos (es decir poli-COOH), y heteropolímeros adicionales es decir polímeros que comprenden uno o más grupos de acoplamiento diferentes por ejemplo un grupo hidroxilo y grupos amina. Ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas de entre óxidos de polialquileno (PAO), tal como polialquilenglicoles (PAG), que incluyen polipropilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (mPEG) y polipropilenglicoles, éteres PEG-glicidílicos (Epox-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG) polietilenglicoles ramificados (PEGs), alcohol polivinílico (PVA), policarboxilatos, polivinilpirrolidona, ácidos poli-D,L-amino, anhídrido de ácido

polietilen-co-maleico, anhídrido de ácido poliestiren-co-maleico, dextranos que incluyen carboximetil-dextranos, heparina, albúmina homóloga, celulosas, que incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboxietilcelulosa e hidroxipropilcelulosa, hidrolisados de quitosan, almidones tales como almidones de hidroxietilo y almidones de hidroxipropilo, glicógeno, agarosas y derivados de los mismos, goma de guar, pululan, inulina, goma de xantano, carragenano, pectina, hidrolisados de ácido algínico y biopolímeros.

Típicamente, los polímeros son óxidos de polialquileno (PAO), tal como óxidos de polietileno, tal como PEG, típicamente mPEG, los cuales en comparación con los polisacáridos tales como dextrano, pululan y los similares, tienen pocos grupos reactivos capaces de la reticulación. Típicamente, los polímeros son moléculas poliméricas no tóxicas tal como (m)polietilenglicol (mPEG) el cual se puede conjugar covalentemente a la enzima degradante de hialuronano (*por ejemplo*, a los grupos de unión sobre la superficie de la proteína) usando una química relativamente simple.

Las moléculas poliméricas adecuadas para la unión a la enzima degradante de hialuronano incluyen pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG) y derivados de PEG tales como metoxi-polietilenglicoles (mPEG), éteres PEG-glicidílicos (Epox-PEG), PEG-oxicarbonilimidazol (CDI-PEG), PEGs ramificados, y óxido de polietileno (PEO) (véase *por ejemplo* Roberts y colaboradores., Advanced Drug Delivery Review 2002, 54: 459-476; Harris y Zalipsky, S (eds.) "Polyethylene glycol), Chemistry and

Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar y colaboradores., *J. Pharm. Pharmaceut. Sci*, 3(1):125-136, 2000; Harris, Nature Reviews 2:215 et seq. (2003); y Tsubery, *J Biol. Chem* 279(37):381 18-24, 2004). La molécula polimérica puede ser de un peso molecular que varía típicamente de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 60 kDa. En algunas modalidades la molécula polimérica que se conjuga a una proteína, tal como rHuPH20, tiene un peso molecular de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más de 60 kDa.

Varios métodos para modificar polipéptidos la unir (conjugar) covalentemente un PEG o derivado de EG (es decir "PEGilación") se conocen en el campo (véase *por ejemplo*, Patentes de E.U.A. Nos. 5,672,662 y U.S. 6,737,505; y Publicaciones de E.U.A. Nos. 2006/0104968 y 2004/0235734). Las técnicas para la PEGilación incluyen, pero no se limitan a, enlazadores especializados y químicas de acoplamiento (véase *por ejemplo*, Harris, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:459-476, 2002), unión de porciones de PEG múltiples a un solo sitio de conjugación (tal como por la vía del uso de PEGs ramificados; véase *por ejemplo*, Veronese y colaboradores, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002), PEGilación específica de sitio y/o mono-PEGilación (véase *por ejemplo*, Chapman y colaboradores., *Nature Biotech.* 17:780-783, 1999), y PEGilación enzimática dirigida al sitio (véase *por ejemplo*, Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:487-504, 2002) (véase, también, por ejemplo, Lu y Felix (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.* 43: 127-138; Lu y Felix (1993) Peptide Res. 6:142-6, 1993; Felix y colaboradores. (1995) *Int. J. Peptide Res.* 46:253-64; Benhar y colaboradores.

(1994) *J. Biol. Chem.* 269:13398-404; Brumeanu y colaboradores. (1995) *J Immunol.* 154:3088-95; véase también, Caliceti y colaboradores. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10): 1261-77 y Molineux (2003) Pharmacotherapy 23 (8 Pt2):3S-8S). Los métodos y técnicas descritos en el campo pueden producir proteínas que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 PEG o derivados de PEG unidos a una sola molécula de proteína (véase *por ejemplo*, Publicación de E.U.A. No. 2006/0104968).

Se han descrito numerosos reactivos para la PEGilación en el campo. Estos reactivos incluyen, pero no se limitan a, PEG activado con N-hidroxisuccinimidilo (NHS), succinimidil mPEG, mPEG2-N-hidroxisuccinimida, mPEG succinimidil-alfa-metilbutanoato, mPEG succinimidil-propionato, mPEG succinimidil-butanoato, éster succimidílico de ácido mPEG carboximetil-3-hidroxibutanoico, PEG-succinimidil-propionato homobifuncional, PEG propionaldehído homobifuncional, PEG butiraldehído homobifuncional, PEG maleimida, PEG hidrazida, PEG de p-nitrofenil-carbonato, mPEG-benzotriazol-carbonato, propionaldehído PEG, mPEG butrialdehído, mPEG2 butiraldehído ramificado, mPEG acetilo, mPEG piperidona, mPEG metilcetona, mPEG "sin enlace" maleimida, mPEG vinil-sulfona, mPEG tiol, mPEG ortopiridiltioéster, disulfuro de mPEG ortopiridilo, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, vinilsulfona PEG-NHS, acrilato PEG-NHS, fluoresceína PEG-NHS, y biotina PEG-NHS (véase *por ejemplo*, Monfardini y colaboradores., *Bioconjugate Chem.* 6:62-69, 1995; Veronese y colaboradores., J. Bioactive Compatible Polymers 12:197-207, 1997; U.S. 5,672,662; U.S. 5,932,462; U.S. 6,495,659; U.S. 6,737,505; U.S. 4,002,531; U.S. 4,179,337; U.S.

000249

5,122,614; U.S. 5,183,550; U.S. 5,324, 844; U.S. 5,446,090; U.S. 5,612,460; U.S. 5,643,575; U.S. 5,766,581; U.S. 5,795, 569; U.S. 5,808,096; U.S. 5,900,461; U.S. 5,919,455; U.S. 5,985,263; U.S. 5,990,237; U.S. 6,113,906; U.S. 6,214,966; U.S. 6,258,351; U.S. 6,340,742; U.S. 6,413,507; U.S. 6,420,339; U.S. 6,437,025; U.S. 6,448,369; U.S. 6,461 ,802; U.S. 6,828,401; U.S. 6,858,736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; U.S. 2005/000360; U.S. 2005/01 14037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; y WO 0187925).

En un ejemplo, la enzima degradante de hialuronano para el uso en los métodos, composiciones, y combinaciones proporcionadas es una hialuronidasa soluble que está PEGilada. En un ejemplo particular, la hialuronidasa soluble es una hialuronidasa PH20 PEGilada. En otro ejemplo particular, la hialuronidasa soluble es rHuPH20 PEGylado.

G. Empaquetamiento y Artículos de Manufactura de las Enzimas activables que degradan matriz

Las composiciones farmacéuticas de las enzimas degradantes de matriz seleccionadas o ácidos nucleicos que codifican las enzimas degradantes de matriz seleccionadas, o un derivado o variante de las mismas se puede empacar como artículos de manufactura que contienen material de empaquetamiento, una composición farmacéutica que es efectiva para tratar la enfermedad o desorden, y una etiqueta que indica la enzima

degradante de matriz seleccionada o molécula de ácido nucleico se va a usar para tratar la enfermedad o desorden. Combinaciones de una enzima degradante de matriz seleccionada, o derivado o variante de la misma y un activador también se pueden empacar en un artículo de manufactura.

Los artículos de manufactura proporcionados en este documento contienen materiales de empaquetamiento. Los materiales de empaquetamiento para el uso en los productos farmacéuticos de empaquetamiento son bien conocidos para aquellas personas expertas en el campo. Véase, por ejemplo, las Patentes de E.U.A. Nos. 5,323,907, 5,052,558 y 5,033,252, cada una de las cuales se incorpora en este documento en su totalidad, Ejemplos de materiales de empaquetamiento farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, paquetes de ampolla, botellas, inhaladores, bombas, bolsas, frasquitos, envases, jeringas, botellas, y cualquier material de empaquetamiento adecuado para una formulación seleccionada y modo propuesto de administración y tratamiento. Los artículos de manufactura pueden incluir una aguja u otro dispositivo de inyección para facilitar la administración (*por ejemplo* administración sub-epidérmica) para propósitos de inyección local. Es contemplado un amplio arreglo de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionados en este documento como son una variedad de tratamientos para cualquier enfermedad o desorden mediado por ECM.

La selección de paquete depende de la enzima degradante de matriz y activador, y si estas composiciones se empacarán juntas o separadamente. En general, el empaquetamiento no es

reactivo con las composiciones contenidas en el mismo tal que la activación de la enzima degradante de matriz activable no ocurre antes de la adición del activador. En un ejemplo, la enzima degradante de matriz activable se puede empacar como una mezcla con el activador. De esta manera, por ejemplo, una enzima lisosomal (*por ejemplo*, catepsina L) que requiere pH bajo para la activación se puede empacar como una mezcla con una solución ácido amortiguada.

En otro ejemplo, los componentes se pueden empacar como composiciones separadas que, en el mezclado, dan por resultado la activación de la enzima degradante de matriz. Por ejemplo, una composición que contiene una enzima degradante de matriz se puede proporcionar separadamente de, y para el uso con, una composición separada que contiene un activador, tal como una solución ácida amortiguada. De esta manera, en estos ejemplos, la enzima degradante de matriz activable se empaca en un envase separado del activador, y la activación se logra por la exposición al activador en la petición del usuario. La exposición al activador puede ocurrir en cualquier momento precedente a la administración por la adición del activador a la enzima. Por ejemplo, el contendor puede tener un solo compartimiento que contiene la enzima degradante de matriz y es susceptible a la adición del activador por el usuario, por ejemplo a través de un orificio en el compartimiento. Cualquier envase u otro artículo de manufactura que sea susceptible a tener un espacio de definición para el contenimiento de la enzima degradante de matriz y que sea susceptible a simple manipulación para permitir la adición de los componentes

finales necesarios para la activación es contemplado. El activador se agrega antes del uso. La exposición al activador también puede ocurrir después de la administración al intersticio. Por ejemplo, si el calor es el activador, se puede administrar una enzima degradante de matriz y el sitio de inyección local se somete al calor. En un ejemplo alterno, una solución amortiguada ácida se puede administrar al intersticio seguido por la administración de una enzima degradante de matriz, por ejemplo cualquiera que requiera un pH ácido para la activación tal como una catepsina.

En otros ejemplos, la enzima degradante de matriz activable se empaca en un envase con el activador tal que la activación de la enzima degradante de matriz es susceptible a la activación por el usuario a petición en el envase. Generalmente, ejemplos de estos envases incluyen aquellos que tienen un espacio definido, encerrado que contiene la enzima degradante de matriz, y un espacio definido, encerrado separado que contiene el activador tal que los dos espacios se separan por una membrana fácilmente removible la cual, en la remoción, permite los componentes mezclarse y reaccionar por consiguiente, dando por resultado la activación de la proteasa. Cualquiera envase u otro artículo de manufactura es contemplado, siempre y cuando la enzima degradante de matriz se separe del activador. La exposición del activador a la enzima degradante de matriz es antes del uso. Por ejemplo, los medios de separación físicos son aquellos que se remueven fácilmente por el usuario, para permitir el mezclado, dando por resultado la activación de la enzima. Por ejemplo, un artículo de

manufactura puede contener una enzima degradante de matriz en un compartimiento y un activador en un compartimiento adyacente. Los compartimientos se separan por un miembro de división, tal como una membrana, que, en la compresión del artículo o manufactura se rompe permitiendo que los componentes separados se mezclen. Para las modalidades adecuadas véase por ejemplo, los envases descritos en las Patentes de E.U.A. Nos. 3,539,794 y 5,171,081.

Después hay algunos ejemplos de los requerimientos de empaquetamiento de varios usos finales de las enzimas activables que degradan matriz. Se ofrecen como ejemplos únicamente de ninguna manera se proponen como limitantes.

1. Aparato de Una Cámara

Entre las modalidades más simples en este documento, son aquellas en las cuales el aparato contiene una sola cámara o envase y, si es necesario, un medio de inyección. Los alojamientos o envases de una sola cámara incluyen cualquier artículo en el cual una enzima degradante de matriz se incluye en el envase. La enzima degradante de matriz se aloja en el recipiente en fase líquida o como un polvo u otra pasta u otra composición conveniente. El componente activador se introduce justo antes del uso. Antes del uso el activador, proporcionado típicamente con una solución amortiguada, se agrega y se pone en contacto con la enzima degradante de matriz para permitir el mezclado y/o reconstitución de la enzima degradante de matriz. Por ejemplo, cuando se desee dependiendo de la enzima degradante de matriz, un líquido que contiene Ca^{2+}, tal como una mezcla que contiene el Ca^{2+} en una solución amortiguadora

apropiada, o una solución amortiguada ácida, u otra solución que contiene una condición de activación, se agrega al envase. Los kits que contienen el artículo y el activador también se proporcionan.

2. Aparato de Doble Cámara

Un ejemplo de un aparato contemplado para el uso en este documento es un envase de doble cámara. En general, este aparato tiene dos cámaras o compartimientos que mantienen en consecuencia la enzima degradante de matriz separada del activador hasta que la activación se desea. El aparato puede incluir una cámara de mezclado para permitir el mezclado de los componentes antes de la dosificación del aparato. Alternativamente, el mezclado puede ocurrir mediante la eyección del activador de una cámara dentro de una segunda cámara que contiene la enzima degradante de matriz activable. Por ejemplo, la enzima degradante de matriz activable se puede proporcionar en forma liofilizada, y se puede lograr la reconstitución mediante la eyección del activador, tal como una solución amortiguada ácida, desde una primera cámara hasta la segunda cámara que contiene la enzima liofilizada.

En una modalidad, un aparato de doble cámara emplea un mecanismo de bomba mecánica en la operación. En este ejemplo, el aparato de dosificación mantiene los componentes en cámaras separadas. Un mecanismo de bomba operado para retirar los contenidos de cada cámara y dentro de una cámara de mezclado, o de una cámara dentro de la segunda cámara. En el mezclado, la composición mezclada se activa por la reacción de los componentes en las cámaras. El mecanismo de bomba se puede

operar manualmente, por ejemplo, por un émbolo. Ejemplar de este aparato de doble cámara incluyen jeringas de doble cámara (véase *por ejemplo*, Patentes de E.U.A. Nos. 6,972,005, 6,692,468, 5,971,953, 4,529,403, 4,202,314, 4,214,584, 4,983,164, 5,788,670, 5,395,326; y Solicitudes de Patente Internacionales Nos. WO2007006030 y WO2001047584).

Otra modalidad de un aparato de dosificación de fluido de doble cámara contemplado para el uso en este documento toma la forma de una botella compresible o tubo u otro dispositivo similar. El dispositivo tiene dos compartimientos dentro de él que mantiene los componentes separados. La tapa del dispositivo puede servir como una cámara de mezclado, una cámara de mezclado se puede posicionar entre las dos cámaras y la tapa, o el mezclado se puede lograr dentro de una de las cámaras. Los componentes se llevan por la compresión de los compartimientos separados dentro de la cámara de mezclado. Luego se dispensan de la cámara de mezclado. Por ejemplo, los contenidos mezclados se pueden remover del dispositivo al fijar un aparato de émbolo/jeringa al extremo de dosificación y retirar los contenidos a través de los mismos. Estos dispositivos son conocidos en el campo (véase *por ejemplo*, Solicitud de Patente Internacional. No. WO1994015848).

3. Kits

Las enzimas degradantes de matriz seleccionadas, activadores y/o artículos de manufactura de las mismas también se pueden proporcionar como kits. Los kits pueden incluir una composición farmacéutica descrita en este documento y un artículo para la administración proporcionado como un artículo

de manufactura. Por ejemplo, una enzima degradante de matriz seleccionada se puede suministrar con un dispositivo para la administración, tal como una jeringa, un inhalador, un vaso de dosificación, un gotero, o un aplicador. Las composiciones se pueden contener en el artículo para la administración o se pueden proporcionar separadamente para ser agregados posteriormente. Generalmente, los kits contienen un artículo con una enzima degradante de matriz, y una composición activadora que contiene la condición de activación. El kit puede, opcionalmente, incluir instrucciones para la aplicación que incluyen dosificaciones, regímenes de dosificación e instrucciones para los modos de administración. Los kits también pueden incluir una composición farmacéutica descrita en este documento y un artículo para la diagnosis. Por ejemplo, estos kits pueden incluir un artículo para medir la concentración, cantidad o actividad de la proteasa seleccionada en un sujeto.

H. Métodos para Estimar la Actividad de las Enzimas Degradantes de Matriz

1. Métodos para Estimar la Estabilidad Enzimática

Las enzimas activables que degradan matriz se pueden someter a prueba para su actividad enzimática contra substratos conocidos. La estimación de la actividad se puede realizar en presencia o ausencia de un activador. La estimación de la actividad también se puede realizar bajo condiciones variantes, por ejemplo, al variar la cantidad de activador usado para la activación. En un ejemplo, los perfiles de pH se pueden realizar para determinar la actividad relativa de una enzima

bajo varias condiciones de pH (véase *por ejemplo*, Dehrmann y colaboradores. (1995) *Arch. Biochm. Biophys.*, 324:93-98). Las estimaciones de la actividad se pueden realizar en un medio acondicionado u otros sobrenadantes o en una proteína purificada.

La actividad enzimática se puede estimar mediante el ensayo para la escisión del substrato usando substratos conocidos de la enzima. Los substratos pueden estar en la forma de una proteína purificada o proporcionados como substratos de péptido. Por ejemplo, la actividad enzimática de la catepsina L se puede estimar por la escisión de las proteínas purificadas como Azocaseína, colágeno, elastina, albúmina de suero humano y rHuPH20 ya sea al incubarlas individualmente con el ADME o como una mezcla de dos o más proteínas purificadas. La escisión de una proteína purificada por una enzima se puede estimar usando cualquier método de detección de proteínas, que incluyen, pero no se limitan a, HPLC, CE, espectrometría de masas, análisis SDS-PAGE, ELISA, técnica Western blot, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, secuenciación NH2-terminal y etiquetado de proteína.

El uso de grupos fluorogénicos sobre los substratos facilita la detección de la escisión. Por ejemplo, los substratos se pueden proporcionar como tetrapéptidos fluorogénicamente etiquetados del substrato de péptido, tal como un ACC- o 7-amino-4-metil-coumarina (AMC)-tetrapéptido. Otros grupos fluorogénicos son conocidos y se pueden usar y acoplar a las proteínas o substratos de péptido. Estos incluyen, por ejemplo, 7-amino-4-metil-2-quinolinona (AMeq), 2-

naftilamina (NHNap) y 7-amino-4- metilcoumarina (NHMec) y fluorescein-5-isotiocianato (FITC) (Sarath y colaboradores. "Protease Assay Methods", in Proteolytic Enzymes: A Practical Approach. Ed. Robert J. Beynon y Judith S. Bond. Oxford University Press, 2001. pp. 45-76). Los substratos de péptidos son conocidos por una persona experta en el campo, como son substratos de péptido fluorogénicos ejemplares. Por ejemplo, los substratos ejemplares para la catepsina B incluyen, N-oBZ-Phe-Val-Arg-p-NA, DNA-Phe-Arg-Nph-Leu, Z-Ala-Arg-Arg-F^3MCA, Z-Arg-Arg-MBNA, Z-Arg-Arg-NHMec, Z-Phe-Arg-NHMec, y Z-Leu-Arg-AMC y variaciones de los mismos tal como con diferentes grupos fluorogénicos. En otro ejemplo, un substrato ejemplar poara la catepsina L incluyen Z-Phe-Arg-NHMec y Z-Leu-Arg-AMC, y Z-His-Arg-Tyr-Arg-AMC, y variaciones de los mismos tal como con diferentes grupos fluorogénicos. De esta manera, puesto que la catepsina B y catepsina L comparten el mismo substrato, por ejemplo, Z-Phe-Arg-NHMec y Z-Leu-Arg-AMC, la estimación de la actividad de la catepsina L se puede realizar en presencia de un inhibidor específico a la catepsina B. Ejemplar de este inhibidor es CA-074. Se ejemplifica en el Ejemplo 9 en este documento. Los ensayos de enzimas para medir la actividad enzimática mediante la intensidad de fluorescencia son estándar, y se realizan típicamente como una función de tiempo de incubación de la enzima y substrato (véase *por ejemplo*, Dehrmann y colaboradores. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, 324:93-98; Barrett y colaboradores. (1981) *Methods Enzymol*, 80:536-561).

Mientras que la detección de los compuestos fluorogénicos

006254

se puede lograr usando un fluorómetro, la detección se puede lograr por una variedad de otros métodos bien conocidos por aquellas personas expertas en el campo. De esta manera, por ejemplo, cuando las fluoróforas emiten en longitudes de onda visibles, la detección puede ser simplemente por inspección visual o fluorescencia en respuesta a la excitación por una fuente de luz. La detección también puede ser por medio de un sistema de análisis de imagen que usa una cámara de video conectada a un digitalizador u otro sistema de adquisición de imágenes. La detección también puede ser por visualización a través de un filtro, como bajo un microscopio de fluorescencia. El microscopio puede proporcionar una señal que se visualiza simplemente por el operador. Alternativamente, la señal se puede grabar en película fotográfica o usando un sistema de análisis de video. La señal también se puede cuantificar simplemente en tiempo real usando ya sea un sistema de análisis de imagen o un fotómetro.

De esta manera, por ejemplo, un ensayo básico para la actividad de la enzima en una muestra implica suspender o disolver la muestra en una solución amortiguadora (en el pH y resistencia iónica óptimas de la proteasa particular que se somete a ensayo) agregando a la solución amortiguadora un indicador de péptido de enzima fluorogénico, y supervisar el cambio resultante en la fluorescencia usando un espectrofotómetro a una temperatura específica para la incubación como se muestra en *por ejemplo* Harris y colaboradores, (1998) *J Biol Chem* 273:27364. El espectrofluorómetro se ajusta para excitar la fluoróforo en la

longitud de onda de excitación de la fluoróforа y detecta la señal en la longitud de onda de emisión de la fluoróforа. El indicador de enzima fluorogénico es una secuencia de substrato de una enzima (*por ejemplo* de una proteasa) que cambia en fluorescencia debido a que una proteasa escisa el indicador. La actividad enzimática se expresa típicamente como unidades estándar/ml con base en una curva de calibración generada con una concentración variante del substrato fluorogénico, y la actividad específica es representada como unidades/mg de proteína.

2. Métodos para Estimar la Degradación ECM

La degradación de las proteínas de matriz extracelular por las enzimas degradantes de matriz, que incluyen, pero no se limitan a, aquellas descritas anteriormente, tal como catepsina L, se pueden estimar *in vitro* o *in vivo*. Los ensayos para esta estimación son conocidos por aquellas personas expertas en el campo, y se pueden usar para someter a prueba las actividades de una variedad de enzimas degradantes de matriz sobre una variedad de proteínas de matriz extracelulares, que incluyen, pero no se limitan a colágeno (I, II, III y IV), fibronectina, vitronectina y proteoglicanos.

a. Ensayos *In vitro*

Ejemplar en los ensayos *in vitro* incluyen ensayos para estimar los productos de degradación de las proteínas de matriz extracelular después de la incubación con una enzima degradante de matriz. En algunos ejemplos, los ensayos detectan un solo producto de degradación específico. En otros ejemplos, los ensayos detectan múltiples productos de degradación, la

identidad de los cuales puede o no puede ser conocida. La estimación de los productos de degradación se puede realizar usando métodos bien conocidos en el campo que incluyen, pero no se limitan a, HPLC, CE, espectrometría de masas, análisis SDS-PAGE, ELISA, técnica de Western blot, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, secuenciación NH2-terminal y etiquetado de proteínas. Se pueden visualizar los productos de degradación de matriz extracelular, por ejemplo, mediante el análisis SDS-PAGE después de la incubación con las enzimas degradantes de matriz durante una cantidad apropiada de tiempo a una temperatura apropiada. Por ejemplo, el colágeno se puede incubar con catepsina L activada y se puede someter a SDS-PAGE usando, por ejemplo, un gel de Tris/glicina 4-20% para separar los productos. La tinción de coomassie del gel facilita la visualización de los productos de degradación más pequeños, o la desaparición de las bandas de colágeno, comparado con el colágeno intacto. La inmunotinción que usa, por ejemplo, un Ig policlonal específico a la proteína de matriz extracelular también se puede usar para visualizar los productos de degradación después de la separación con SDS-PAGE.

Los ensayos que detectan específicamente un solo producto después de la degradación de una proteína de matriz extracelular también son conocidos en el campo y se pueden usar para estimar la capacidad de una enzima degradante de matriz a degradar una proteína de matriz extracelular. Por ejemplo, el ensayo de hidroxiprolina (HP) se puede usar para medir la degradación del colágeno, 4-hidroxiprolina es un aminoácido modificado que constituye aproximadamente 12% del peso del

000254

colágeno. Los ensayos de HP miden la cantidad de colágeno solubilizado al determinar la cantidad de HP en el sobrenadante después de la incubación con una enzima degradante de matriz, tal como catepsina L activada (véase *por ejemplo*, Ejemplo 2, posteriormente, y Reddy y Enwemeka (1996) *Clinical Biochemistry* 29:225-229). La medición de la HP se puede efectuar por, por ejemplo, métodos colorimétricos, cromatografía líquida de alto desempeño, espectrometría de masas y métodos enzimáticos (véase *por ejemplo*, Edwards y colaboradores., (1980) *Clin. CHm. Acta* 104:161-167; Green (1992) *Anal Biochem.* 201:265-269; Tredget y colaboradores., (1990) *Anal. Biochem.* 190:259-265; Ito y colaboradores., (1985) *Anal. Biochem.* 151:510-514; Garnero y colaboradores. (1998) *J. Biol. Chem* 273:32347-32352).

La fuente de colágeno usada en estos ensayos in vitro se puede incluir, pero no se limita a, colágeno purificado comercialmente disponible, partículas óseas, piel, cartílago y tendón de cola de rata. La actividad colagenolítica de una enzima degradante de matriz tal como catepsina L se puede estimar al incubar la enzima activada con una suspensión de colágeno insoluble, soluble seguido por la hidrólisis, tal como con HCl. La cantidad de hidroxiprolina derivada del colágeno solubilizado (degradado) se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos, tal como la medición de la absorbencia a 550 nm después de la incubación con el reactivo de Ehrlich. En algunos ejemplo, el agente de colágeno es un explante de piel de rata o de cerdo que se remueve quirúrgicamente de los animales anestesiados, y luego se perfusiona con primero una solución ácida y luego la enzima degradante de matriz, tal como

catepsina L (véase *por ejemplo* Ejemplos 3-4, posteriormente). Los niveles de HP en las perfusiones luego se pueden estimar. En una modificación de esta método, el efecto de, por ejemplo, la catepsina L sobre los septos fibrosos en los explantes se puede estimar (véase *por ejemplo,* el Ejemplo 5). Brevemente, después de la perfusión con la enzima degradante de matriz, los explantes se cortan en piezas pequeñas y se incrustan en parafina y se analizan mediante microscopio después de la tinción Tri crome de Masson para la visualización de colágeno. El número de septos fibrosos de colágeno se puede visualizar y comparar con el tejido que no ha sido tratado con una enzima degradante de matriz.

Los ensayos para detectar la degradación de los colágenos específicos también son conocidos en el campo. Estos ensayos pueden emplear métodos inmunológicos para detectar un producto de degradación único al colágeno específico. Por ejemplo, la degradación del colágeno I por algunas enzimas degradantes de matriz libera telopéptidos con diferentes epítopos que se pueden detectar usando inmunoensayos. Estos ensayos detectan los N-telopéptidos reticulados (NTx) y los C-telopéptidos reticulados (CTx y ICTP), cada uno de los cuales contiene epítopos únicos. Típicamente, los ensayos CTx usan los anticueros CrossLaps (Nordic Biosciences) que reconocen el octapéptido EKAHD-β-GGR de secuencia de 8 aminoácidos, donde el ácido aspártico está en la configuración α-isomerizada, en la región de telopéptidos C-terminal de la cadena α1 (Eastell (2001) Bone Markers: Biochemical and Clinical Perspectives, pg 40). Los inmunoensayos para detectar el ICTP también son

conocidos en el campo y se pueden usar para detectar la degradación del colágeno I (Patente de E.U.A. No. 5,538,853). En otros ejemplos, los inmunoensayos, tales como, por ejemplo, ELISAs, se pueden usar para detectar el NTx después de la incubación del colágeno tipo I con proteasas tales como Catepsinas K, S, L y B (Atley y colaboradores., (2000) Bone, 26:241-247). Otros anticuerpos y ensayos específicos para los colágenos degradados son conocidos en el campo y se pueden usar para detectar la degradación por las enzimas degradantes de matriz. Estos incluyen anticuerpos y ensayos específicos para el colágeno I degradado (Hartmann y colaboradores (1990) *Clin. Chem.* 36:421-426), colágeno II (Hollander y colaboradores (1994) *J. Clin. Invest.* 93:1722-1732), colágeno III (Patente de E.U.A No. 5,34,2756), y colágeno IV (Wilkinson y colaboradores (1990) *Anal. Biochem.* 185:294-6).

b. Ensayos *in vivo*

Los ensayos para detectar la degradación *in vivo* del ECM también son conocidos en el campo. Estos ensayos pueden usar los métodos descritos anteriormente para detectar, por ejemplo, la hidroxiprolina y los N- y C-telopéptidos y los colágenos degradados u otro ECM en muestras biológicas tal como orina, sangre, suero y tejido. La detección del ECM degradado se puede realizar después de la administración al paciente de una o más enzimas degradantes de matriz. La detección de piridinolina (PYD) y desoxipiridinolina (DPYD), también se puede usar para estimar la degradación del colágeno. También conocidas como hidroxilisilpiridinolina y lisilpiridinolina, respectivamente, las PYD y DPYD son las dos reticulaciones trivalentes no

00[illegible]360

reducibles que estabilizan las cadenas de colágeno de tipo I y se liberan durante la degradación de los fibriles de colágeno maduros. La piridinolina es abundante en el hueso y cartílago, mientras que la desoxipiridinolina se confina grandemente al hueso. El colágeno tipo III también contiene reticulaciones de piridolina en la aminoterminal. Se puede medir la PYD y DPYD total, por ejemplo, en muestras de orina hidrolizadas o suero mediante la detección fluorométrica después de la HPLC de fase inversa (Hata y colaboradores (1995) *Clin. Chimica. Acta.* 235:221-227).

c. Modelos no humanos de animales

Los modelos de animal no humanos se pueden usar para estimar la actividad de las enzimas degradantes de matriz. Por ejemplo, los animales no humanos se pueden usar como modelos para una enfermedad o condición. Los animales no humanos se pueden inyectar con sustancias que inducen a enfermedad y/o fenotipo antes de la administración de las enzimas degradantes de matriz. También son útiles los modelos genéticos. Se pueden generar animales, tales como ratones, los cuales imitan una enfermedad o condición por la sobreexpresión, bajoexpresión o genéticamente deficiente de uno o más genes. Por ejemplo, los modelos de animal son conocidos en el campo para condiciones que incluyen, pero no se limitan a, Enfermedad de Peyronie (Davila y colaboradores. (2004) *Biol. Reprod.*, 71:1568-1577), tendinosis (Warden y colaboradores., (2006) *Br. J. Sports Med.* 41:232-240) y escleroderma (Yamamoto (2005) *Cur. Rheum. Rev.* 1:105-109).

Los animales no humanos también se pueden usar para

someter a prueba la actividad de las enzimas degradantes de matriz *in vivo* en un animal no enfermo. Por ejemplo, las enzimas degradantes de matriz se pueden administrar a, animales no humanos, tal como, un ratón, rata o cerdo, y el nivel de degradación ECM se puede determinar. En algunos ejemplos, los animales se usan para obtener explantes para la estimación *ex vivo* de la degradación ECM, tal como aquella descrita anteriormente y en los Ejemplos 3-5, posteriormente. En otros ejemplos, la degradación ECM se estima vivo. En un ejemplo, la degradación del colágeno de la piel de las ratas anestesiadas se estima (véase *por ejemplo*, el Ejemplo 6 posteriormente). Brevemente, una enzima degradante de matriz, tal como catepsina L en una solución amortiguadora con un pH de 5, se perfusiona por la vía de la inserción de una aguja dentro de la capa dérmica de la piel de la cola. Las fracciones de perfusión se recolectan de la piel de la cola y se analizan para la degradación del colágeno mediante el análisis de hidroxiprolina. Otros métodos se pueden usar para detectar la degradación incluyendo, pero no se limita a, cualquiera de los ensayos descritos anteriormente, tal como inmunoensayos para detectar los productos de degradación específicos. El efecto de la administración de una solución ácida, tal como la solución amortiguadora que contiene catepsina L que facilita la actividad óptima, a la piel también se puede estimar en un modelo de animal no humano (véase *por ejemplo,* el Ejemplo 7). Los tintes sensibles al cambio del pH, tal como rojo fenol, se puede usar para estos propósitos.

I. Métodos Ejemplares para Tratar Enfermedades o Defectos

de ECM

Las enzimas activables que degradan matriz proporcionadas en este documento se pueden usar para el tratamiento de cualquier condición mediada por cualquiera de uno o más componentes ECM. Esta sección proporciona usos ejemplares de, y métodos de administración para, enzimas activables que degradan matriz. Estas terapias descritas son ejemplares y no limitan las aplicaciones de las enzimas. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, método de tratamiento de cualquier condición o enfermedad ECM que es causada por la expresión de exceso, aberrante o acumulada de cualquiera de uno o más componentes de ECM. Ejemplar de enfermedades o condiciones que se tratan son cualquiera mediada por colágeno, elastina, fibronectina, o un glicosaminoglicano tal como un proteoglicano. Por ejemplo, ejemplar de enfermedades o desórdenes mediados por colágeno incluyen, pero no se limitan a, celulitis, enfermedad de Dupuytren (también llamada contractura de Dupuytren), enferemdad de Peyronie, hombro congelado, tendinosis crónica o tejido cicatricial de los tendones, escleroderma localizado y linfedema. Está dentro de la experiencia de un médico tratante identificar estas enfermedades o condiciones.

Las enfermedades o condiciones particulares que se tratan dictan la enzima degradante de matriz activable que se selecciona. Por ejemplo, el tratamiento de una enfermedad o desorden mediada por colágeno se puede afectar por la administración de una enzima degradante de matriz que escisa el colágeno. Estas enzimas degradantes de matriz se listan anteriormente en la Tabla 3, y/o son conocidas por una persona

de experiencia en el campo. Las enzimas activables que degradan matriz, y sistemas y métodos para la activación se pueden seleccionar por consiguiente para tratar una enfermedad o condición particular. Por ejemplo, las catepsinas de la cisteína y las familias aspárticas se pueden hacer temporalmente activas por las condiciones de pH ácidas como se describe en este documento. De esta manera, en un ejemplo, una catepsina que escisa un colágeno, por ejemplo, catepsina L, se puede administrar en presencia de una condición de activación, tal como pH ácido, para tratar una enfermedad o condición mediada por colágeno.

El tratamiento de enfermedades y condiciones con enzimas activables que degradan matriz se puede efectuar mediante cualquier vía de administración adecuada que usa formulaciones adecuadas como se describe en este documento que incluyen, pero no se limitan a, inyección subcutánea, administración intramuscular, intradérmica, oral y tópica y transdérmica. Como se describe anteriormente, una vía de administración de enzimas activables que degradan matriz se selecciona típicamente lo que da por resultado la administración bajo la piel directamente al sitio afectado. Ejemplar de estas vías de administración incluyen, pero no se limitan a, subcutánea, intramuscular o intradérmica.

Si es necesario, una dosificación particular y duración y protocolo de tratamiento se pueden determinar o extrapolar empíricamente. Por ejemplo, las dosis ejemplares de las enzimas degradantes de matriz activas recombinantes y nativas o enzimas activables que degradan matriz se pueden usar como un punto de

partida para determinar dosificaciones apropiadas. Los niveles de dosificación se pueden determinar con base en una variedad de factores, tal como peso corporal del individuo, salud general, edad, la actividad del compuesto específico empleado, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación del fármaco, la gravedad y curso de la enfermedad, y la disposición del paciente a la enfermedad y al juicio del médico tratante. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una sola forma de dosificación variará dependiendo de la enzima degradante de matriz particular, el hospedero tratado, el modo particular de administración, y la condición de activación requerida para la activación, y/o la duración de tiempo predeterminado en el cual la activación se desea. La composiciones farmacéuticas deben proporcionar típicamente una dosificación de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Generalmente, las dosis son de o aproximadamente 10 µg/ml a 1 mg/ml, típicamente de manera aproximada 100 µg/ml, por una sola administración de dosificación. Se entiende que la cantidad a administrar será una función de la enzima degradante de matriz activable y la condición de activación seleccionada, la indicación tratada, y posiblemente los efectos secundarios que se tolerarán. Las dosificaciones se pueden determinar empíricamente usando modelos reconocidos para cada desorden. También, como se describe en otra parte en este documento, las enzimas activables que degradan matriz se pueden administrar en combinación con otros agentes secuencialmente, simultáneamente o intermitentemente. Ejemplares de estos agentes incluyen, pero

no se limitan, lidocaína, epinefrina, un agente de dispersión tal como hialuronidasa y combinaciones de los mismos.

En la mejora de la condición de un paciente, una dosis de mantenimiento de un compuesto o composiciones se puede administrar, si es necesario; y la dosificación, forma de dosificación o frecuencia de de administración o una combinación de los mismos se puede modificar. En algunos casos, un sujeto puede requerir tratamiento intermitente sobre una base a largo plazo en cualquier recurrencia de síntomas de enfermedad.

Las descripciones de la participación del colágeno a enfermedades o condiciones mediadas por colágeno se proporcionan posteriormente como un ejemplo de la función de los componentes ECM en diversas enfermedades y condiciones. Estas descripciones se proponen para ser ejemplares únicamente y no se limitan a una enzima degradante de matriz activable particular o a unas enfermedades o condiciones mediadas por ECM particulares. Una persona experta en el campo puede seleccionar una enzima degradante de matriz activable y condición de activación para la activación de la misma, que se usan en el tratamiento de cualquier enfermedad mediada por ECM deseada, con base en la capacidad de una enzima particular a escisar o degradar un componente ECM implicado en enfermedad o condición particular. El tratamiento y dosificación particulares se pueden determinar por una persona de experiencia en el campo. Las consideraciones al estimar el tratamiento incluyen, por ejemplo, a la enfermedad que se trata, el componente ECM implicado en la enfermedad, la gravedad y curso de la

enfermedad, si la enzima degradante de matriz activable se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta a la terapia y la discreción del médico de cabecera.

1. Enfermedades o condiciones mediadas por colágeno

El colágeno es un constituyente estructural principal de organismos mamíferos y constituye una gran porción del contenido de proteína total de la piel y otras partes del cuerpo de animal. Numerosas enfermedades y condiciones son asociadas con el exceso de la deposición de colágeno, por ejemplo, debido a la acumulación errática de tejido fibroso rico en colágeno y otras causas. Las enfermedades o condiciones mediadas por colágeno (también referidas como desórdenes de tejido fibrótico) son conocidas por una persona de experiencia en el campo (véase *por ejemplo*, Solicitud de E.U.A. publicada No. 20070224183; Patentes de E.U.A. Nos. 6,353,028; 6,060,474; 6,566,331; 6,294,350). El exceso de colágeno se ha asociado con enfermedades y condiciones, tal como pero no se limita a, enfermedades o condiciones fibróticas que dan por resultado formación de cicatrices, celulitis, síndrome de Dupuytren, enfermedad de Peyronie, hombro congelado, escleroderma localizado, linfedema, cistis intersticial (IC), Telangrectasa, metaplasia de Barrett, Pneumatosis citoides intestinales, colitis colagenosa. Por ejemplo, las condiciones de desfiguración de la piel, tal como arrugas, formación de celulitis y fibrosis neoplásica resulta de la excesiva de posición de colágeno, lo cual produce el enlace y distorsión no deseada de la arquitectura del tejido normal.

Las enzimas activables que degradan matriz descritas en este documento, que incluyen pero no se limitan a catepsina L, se pueden usar para tratar enfermedades o condiciones mediadas por colágeno. Ejemplares de enzimas activables que degradan matriz para el tratamiento de enfermedades y condiciones descritos en este documento son aquellas que son activas en pH neutro, y requieren condiciones ácidas sostenidas para la actividad. Por ejemplo, la acidificación temporal de la matriz extracelular, tal como el intersticio de la piel, se puede lograr al infundir una solución ácida amortiguada directamente en el sitio afectado. En un ejemplo, una solución ácida amortiguada se puede administrar por la vía de administración del epitelio, es decir bajo la piel, tal que la administración se efectúa directamente en el sitio donde los componentes ECM están presentes y se acumulan. Se pueden emplear otros métodos de activación, y son conocidos por una persona experta en el campo en vista de las descripciones en este documento.

a. Celulitis

Las enzimas activables que degradan matriz, tales como aquellas descritas en este documento, que incluyen catepsina L, se pueden usar para tratar celulitis. En tejidos adiposos normales, una malla fina de vasos sanguíneos y vasos linfáticos suministra al tejido con nutrientes necesarios y oxígeno y toma cuidado de la remoción de los productos metabolizados. Por ejemplo, los triglicéridos, se almacenan en adipocitos individuales que se agrupan en lóbulos ricos capilares. Cada lóbulo de grasa está compuesto de adipocitos. Las hebras verticales de fibra de colágeno llamadas septos fibrosos

separan los lóbulos de grasa y enlazan la fascia superficial de traslapamiento al músculo subyacente.

La celulitis se caracteriza típicamente por el deterioro dérmico debido a un rompimiento en la integridad del vaso sanguíneo y una pérdida de redes capilares en los niveles dérmicos y subdérmicos de la piel. El deterioro vascular tiende a disminuir el metabolismo dérmico. Este metabolismo disminuido impide la síntesis de la proteína y los procesos de reparación, lo cual da por resultado adelgazamiento dérmico. La condición se caracteriza además por células de grasa que se llenan en exceso con líquido, hinchándose y aglutinándose conjuntamente, así como también exceso de retención de fluido en las regiones dérmicas y subdérmicas de la piel. La acumulación de glóbulos de grasa o células adiposas crea una necesidad por un suministro de sangre más grande para proporcionar extranutrición. Para proporcionar la sangre a los tejidos, se forman nuevos capilares, los cuales liberan más material filtrado que resulta en una saturación de tejidos con fluido intersticial que causa edema en los tejidos adiposos. Las fibras reticulares abundantes en los tejidos intersticiales se acumulan y se espesan alrededor de las células adiposas agregadas; forman cápsulas o septos, los cuales se transforman gradualmente en fibras de colágeno y se sienten como nódulos. La formación de estos septos ocluye además las células de grasa. Las fibras de colágeno también se sitúan en los espacios de tejido intersticial, volviendo el tejido conjuntivo esclerótico (duro).

Por consiguiente, conforme la condición progresa

adicionalmente, los nódulos duros de las células de grasa y los aglutinamientos de grasa circundados por los septos se forman en la región dérmica. Esto conduce a que la superficie de la piel muestre heterogeneicidad considerable y se caracteriza por tener una apariencia "de queso cottage" o "cáscara de naranja". La formación de hoyuelos ocurre cuando los septos fibrosos que conectan la piel a la dermis y las capas de tejido más profundas tensan y jalan la piel. De esta manera, la apariencia de "cáscara de naranja" de la celulitis es debido a la deformación de los lóbulos de grasa como resultado de fuerzas exteriores sobre el tejido adiposo. Los lóbulos de grasa pueden ser grandes, por ejemplo de hasta 1 cm de ancho, y sobresalen fácilmente dentro de la dermis superpuesta, que causa una deformación visible sobre la superficie de la piel. El resultado neto es la apariencia ondulante de la piel exterior conforme la grasa empuja hacia arriba. Conforme los septos conjuntivos corren en la misma dirección como estas fuerzas hacia afuera, no pueden ofrecer fuerza contraria para mantener el tejido adiposo de que sobresalga en la dermis.

La celulitis es más prevalente entre mujeres que en hombres. La prevalencia de la celulitis se estima entre 60% y 80% de la población femenina y su gravedad tiende a empeorarse con la obesidad. Recientemente, un estudio publicado mostrado por la formación de imágenes de resonancia magnética *in vivo* que las mujeres con celulitis tienen un porcentaje más alto de septos fibrosos perpendiculares que mujeres con celulitis u hombres (Querleux y colaboradores, (2002) *Skin Research and Technology*, 8:118-124). La celulitis ocurre más frecuentemente

en las caderas, muslos y brazos superiores. Por ejemplo, las mujeres premenopaúsicas tienden a acumular grasa subcutáneamente, principalmente en las áreas del glúteo/muslos donde la celulitis es más común. Clínicamente, la celulitis está acompañada por síntomas que incluyen adelgazamiento de la epidermis, reducción y rompimiento de la microvasculatura que conduce a acumulaciones subdérmicas de fluidos, y aglomeraciones subdérmicas de tejidos adiposos.

b. Enfermedad de Dupuytren

Las enzimas activables que degradan matriz, tales como aquellas descritas en este documento, se pueden usar para tratar el síndrome de Dupuytren (también llamado contractura de Dupuytren). La contractura de Dupuytren (también conocida como Morbus Dupuytren) es una contractura de flexión fija de la mano donde los dedos se doblan hacia la palma y no se pueden extender completamente. Una lesión similar ocurre algunas veces en los pies. El tejido conjuntivo dentro de la mano se vuelve anormalmente grueso y es acompañado con la presencia de nódulos que contienen fibroblastos y colágeno, particularmente de tipo III. El colágeno es intercala frecuentemente con un arreglo similar a septos de tejido adiposo. Estos se presentan clínicamente como "bultos" de tipo de colchón de tamaño variante y en la enfermedad de Dupuytren son llamados nódulos. Esto puede causar que los dedos se doblen y puede dar por resultado una función deteriorada de los dedos, especialmente los dedos meñique y anular. La enfermedad de Dupuytren ocurre predominantemente en hombres. Se encuentra generalmente en personas de edad media y de edad avanzada, aquellos de

ascendencia europea del norte y en aquellos con ciertas enfermedades crónicas tales como diabetes, alcoholismo y tabaquismo.

La enfermedad de Dupuytren es una enfermedad lentamente progresiva que ocurre a través de muchos años causando deformidades de flexión fijas en las articulaciones metacarpofalángicas (MP) y interfalángicas próximas (PIP) de los dedos. Los dedos meñique y anular son los más frecuentemente afectados. La enfermedad progresa a través de tres etapas (Luck y colaboradores. (1959) *J. Bone Joint Surg.*, 41 A:635-664). La etapa proliferativa inicial se caracteriza por la formación de nódulos en la facia palmar en la cual una célula conocida como el miofibroblasto se presenta y comienza a proliferar. La etapa involucional o de enfermedad media implica la proliferación de miofibroblastos y la formación de colágeno de tipo III activo. En la última fase o fase residual, el nódulo desaparece dejando tejido acelular y bandas gruesas de colágeno. La relación de colágeno de tipo III a colágeno de tipo I se incrementa. El tratamiento de la enfermedad de Dupuytren con una enzima degradante de matriz activable está típicamente en las etapas de enfermedad media y de enfermedad residual.

c. Enfermedad de Peyronie

Las enzimas activables que degradan matriz, tales como aquellas descritas en este documento, se pueden usar para tratar la enfermedad de Peyronie. La enfermedad de Peyronie es un desorden de tejido conjuntivo que implica el crecimiento de placas fibrosas en el tejido blando del pene que afecta tanto

como 1-4% de hombres. El colágeno es el componente principal de la placa en la enfermedad de Peyronie. Específicamente, el proceso fibrosante ocurre en la túnica albugínea, una envoltura fibrosa que circunda el penile corpora cavernosa. El dolor y la desfiguración asociados con la enfermedad de Peyronie se relaciona con la estructura física del pene en el cual se encuentran dos barras eréctiles llamadas la corpora cavernosa, un conducto (la uretra) a través de la cual la orina fluye de la vejiga, y la túnica que separa la cavernosa de las capas exteriores de la piel del pene. Una persona que exhibe la enfermedad de Peyronie tendrá formación(es) de placa o tejido cicatrizante entre la túnica y estas capas exteriores de la piel (referidas como "sub-dérmicas" en esta solicitud). La cicatrización o acumulación de placa de la túnica reduce su elasticidad tal que causa en el área afectada, no se estirará al mismo grado (en todo caso) como los tenidos no afectados, circundantes, de esta manera, el pene erecto se dobla en la dirección de la cicatriz o acumulación de placa, frecuentemente con dolor asociado de algún grado. En todas las manifestaciones menores de la enfermedad de Peyronie, el paciente tiene algún grado de disfunción sexual. En casos más graves, la relación sexual es ya sea imposible, o es muy dolorosa como para ser efectivamente prohibitiva.

La evidencia empírica indica una incidencia de la enfermedad de Peyronie en aproximadamente uno por ciento de la población masculina. Aunque la enfermedad ocurre principalmente en hombres de edad media, los hombres más jóvenes y de más edad pueden adquirirla. Aproximadamente 30 por ciento de hombres con

enfermedad de Peyronie también desarrollan fibrosis (células endurecidas) en otros tejidos elásticos del cuerpo, tal como sobre la mano o pie. Ejemplos comunes de estas condiciones incluyen contractura de Dupuytren de la mano y Fibrosis de Ledderhose del pie.

d. Fibrosis de Ledderhose

Las enzimas activables que degradan matriz, tales como aquellas descritas en este documento, se pueden usar para tratar la fibrosis de Ledderhose. La fibrosis de Ledderhose es similar a la enfermedad de Dupuytren y la enfermedad de Peyronie, excepto que la fibrosis debido a la proliferación de fibroblastos y deposición de colágeno ocurre en los pies. La enfermedad de Ledderhose se caracteriza por fibrosis y plantar sobre la planta media del pie, y es algunas veces referida como fibrosis plantar.

e. Articulaciones rígidas

Las enzimas activables que degradan matriz, tales como aquellas descritas en este documento, se pueden usar para tratar articulaciones rígidas, por ejemplo, hombro congelado. El hombro congelado (capsulitis adhesiva) es una condición fibrosante crónica de la cápsula de la articulación caracterizada por dolor y pérdida de movimiento o rigidez en el hombro. Afecta aproximadamente 2% de la población general. El hombro congelado resulta de la síntesis de la matriz de fibroblastos incrementada. La síntesis es causada por una respuesta inflamatoria excesiva que da por resultado la sobreproducción de citocinas y factores de crecimiento. Los fibroblastos y miofibroblastos depositan una matriz densa de

000279

colágeno en particular, colágeno de tipo I y tipo III dentro de la cápsula del hombro. Esto da por resultado una cápsula de hombro contraída cicatrizada y causa la rigidez de la articulación.

Otros ejemplos de articulaciones rígidas incluyen, pero no se limitan a, aquellos causados por contracturas capsulares, capsulitis adhesiva y artrofibrosis, las cuales resultan de la cirugía musculoesquelética. Estas articulaciones rígidas pueden ocurrir en articulaciones que incluyen, por ejemplo, articulaciones de las rodillas, hombros, codos, tobillos y caderas. Similar al hombro congelado, estas enfermedades articulares son causadas por síntesis de matriz incrementada y formación de cicatrices. Las articulaciones rígidas pueden causar inevitablemente que se transmitan fuerzas anormalmente altas al cartílago articular al área afectada. A través del tiempo, estas fuerzas dan por resultado el desarrollo de enfermedad y artritis articular degenerativa. Por ejemplo, en la artrofibrosis y la contractura capsular, los fibroblastos forman cantidades excesivas de matriz en respuesta a un trauma local, tal como dislocación de la articulación.

f. Cicatrices existentes

Las enzimas activables que degradan matriz, tales como aquellas descritas en este documento, se pueden usar para tratar cicatrices existentes. El colágeno es particularmente importante en el proceso de sanación de heridas y en el proceso de envejecimiento natural, donde se produce por las células de fibroblasto. En algunos casos, sin embargo, una respuesta de sanación exagerada puede dar por resultado la producción de

cantidades copiosas de tejido de sanación (sustancia fundamental), también llamado tejido cicatrizante. Por ejemplo, varios traumas de la piel tales como quemaduras, cirugía, infección, heridas y accidentes son frecuentemente caracterizados por la acumulación errática de tejido fibroso rico en colágeno. También existe frecuentemente un contenido de proteoglicano incrementado. Además del reemplazo del tejido normal que se ha dañado o destruido, los depósitos excesivos de desfiguración de nuevo tejido se forman algunas veces durante el proceso de sanación. El exceso de deposición de colágeno se ha atribuido a una interrupción en el equilibrio entre la síntesis del colágeno y la degradación del colágeno. Se incluyen entre las cicatrices, por ejemplo, la tendinosis crónica o tejido cicatrizante de los tendones, adhesiones quirúrgicas, queloides, cicatrices hipertróficas y cicatrices deprimidas.

i. Adhesiones quirúrgicas

Las adhesiones quirúrgicas son uniones de órganos o tejidos entre sí a través de la formación de cicatrices, lo cual puede causar problemas graves clínicos. La formación de algún tejido cicatrizante después de la cirugía o lesión de tejido es normal. En algunos casos, sin embargo, el tejido cicatrizante hace sobrecercer la región de la lesión y crea adhesiones quirúrgicas, lo cual tiende a restringir la movilidad y función normal de las partes corporales afectadas. En particular, la proliferación de fibroblastos y la síntesis de matriz se implementan localmente después de esta lesión del tejido blando. Las adhesiones luego se forman cuando el cuerpo

intenta reparar el tejido al inducir una respuesta de sanación. Por ejemplo, este proceso de sanación puede ocurrir entre dos o más estructuras separadas de otra manera sanas (tal como entre las asas del intestino después de una cirugía abdominal). Alternativamente, después del trauma local a un nervio periférico, se pueden formar adhesiones fibrosas, dando por resultado dolor severo durante el movimiento normal.

ii. Queloides

Los queloides son cicatrices de tejido conjuntivo que contienen masas hiperplásicas que ocurren en la dermis y el tejido subcutáneo adyacente, más comúnmente después del trauma. Los queloides son generalmente nódulos fibrosos que pueden variar en color de rosa a rojo a café obscuro. Los queloides se forman en el tejido cicatrizante como resultado del sobrecrecimiento del colágeno, el cual participa en la reparación de la herida. Las lesiones queloides se forman cuando los fibroblastos de la piel local se someten a hiperplasia vigorosa y proliferación en respuesta a los estímulos locales. La lesión resultante puede dar por resultado en un bulto muchas veces más grande que la cicatriz original. Además de ocurrir como un resultado de la herida u otro trauma, los queloides también pueden formarse de perforaciones, barros, un rasguño, acné severo, cicatrización de varicela, infección en un sitio herido, trauma repetido a un área, una tensión de la piel excesiva durante el cierre de la herida.

iii. Cicatrices hipertróficas

Las cicatrices hipertróficas son cicatrices elevadas que se forman en el sitio de las heridas. Generalmente no crecen

00127a

más allá de los límites de la herida original. Como las cicatrices queloides, las cicatrices hipertróficas son un resultado del colágeno de sobreproducción corporal.

iv. Cicatrices deprimidas

Las cicatrices deprimidas resultan generalmente de un episodio inflamatorio y son caracterizadas por contracciones de la piel, y dejan una cicatriz desagradable cosméticamente y permanente. El ejemplo más común es la cicatrización que ocurre después del acné inflamatorio. La depresión ocurre como una consecuencia normal de la sanación de la herida, y el tejido cicatrizante que causa la depresión está constituido predominantemente de colágeno que resulta de la proliferación de fibroblastos y el metabolismo.

g. Escleroderma

Las enzimas activables que degradan matriz, tales como aquellas descritas en este documento, se pueden usar para tratar escleroderma. El escleroderma se caracteriza por un engrosamiento del colágeno. La forma más común de la enfermedad, escleroderma localizado, afecta únicamente la piel, usualmente en solo pocos lugares, y algunas veces la cara. Algunas veces es referido como síndrome CREST. Los síntomas incluyen endurecimiento de la piel y cicatrización asociada. La piel también se presenta rojiza o escamosa, y los vasos sanguíneos pueden ser más visibles. En casos más serios, el escleroderma puede afectar los vasos sanguíneos y los órganos internos. El escleroderma difuso puede ser fatal como resultado de daño al corazón, riñones, pulmones o intestinales, debido a complicaciones musculoesqueléticas, pulmonares,

gastrointestinales, renales y otras complicaciones.

La condición es caracterizada por la acumulación de colágeno que conduce a la pérdida de elasticidad. La sobreproducción de colágeno se ha atribuido a la disfunción autoinmune, que da por resultado la acumulación de células T y la producción de citocinas y otras proteínas que estimulan la posición de colágeno de los fibroblastos.

h. Linfedema

Las enzimas activables que degradan matriz, tales como aquellas descritas en este documento, se pueden usar para tratar linfedema. El linfidema es una acumulación de fluido linfático que causa hinchamiento en los brazos y piernas. La linfidema puede progresar para incluir cambios en la piel tales como, por ejemplo, fibrosis linfostática, esclerosis y papilomas (tumores de la piel benignos) e hinchamiento. Estos cambios asociados con la linfidema incluyen la proliferación de células de tejido conjuntivo, tales como fibroblastos, producción de fibras de colágeno, incremento en los depósitos de grasa en los cambios fibróticos. Estos cambios ocurren primero en las extremidades inferiores, es decir los dedos y dedos del pie. La linfedema se puede identificar con base en el grado de agrandamiento de las extremidades. Por ejemplo, un método para estimar al linfedema se basa en la identificación de las diferencias de 2 cm o 3 cm entre cuatro puntos comparativos de las extremidades implicadas y no implicadas.

i. Colitis colagenosa

Las enzimas activables que degradan matriz, tales como aquellas descritas en este documento, se pueden usar para

000279

tratar colitis colagenosa. La colitis colagenosa primero se describió como diarrea acuosa crónica (Lindstrom y colaboradores. (1976) Pathol. Eur., 11:87-89). La colitis colagenosa se caracteriza por la deposición de colágeno, que resulta probablemente de un desequilibrio entre la producción de colágeno por los fibroblastos de la mucosa y la degradación del colágeno. Da por resultado diarrea secretora. La incidencia de la colitis colagenosa es similar a la cirrosis biliar primaria. La enfermedad tiene una incidencia anual de 1.8 por 100,000 y una prevalencia de 15.7 por 100,000, lo cual es similar a la cirrosis biliar primaria (12.8 por 100,000) y más baja que la colitis ulcerativa (234 por 100,000), enfermedad de Crohn (146 por 100,000) o enfermedad celiaca (5 por 100,000). En pacientes con diarrea crónica, aproximadamente 0.3 a 5% tienen colitis colagenosa. La colitis colagenosa es una enfermedad inflamatoria que da por resultado la producción incrementada de citocinas y otros agentes que estimulan la proliferación de fibroblastos, dando por resultado la acumulación incrementada de colágeno.

2. Patologías Vertebrales

Las enfermedades de ECM o que implican el ECM también incluyen patologías vertebrales, referidas típicamente como disco permeado o discos abultados, que se pueden tratar usando los métodos en este documento. Estos incluyen discos protruidos y extruidos. Un disco protruido es uno que está intacto pero abultado. En un disco extruido, la envoltura fibrosa se ha desgastado y el núcleo pulposo (NP) se ha exudado, pero aún está conectado al disco. Mientras que el NP no es la causa de

la herniación, el NP contribuye a la presión sobre los nervios causando dolor. El NP contiene ácido hialurónico, condrocitos, fibrillas de colágeno y proteoglican agrecanos que tienen cadenas largas hialurónicas las cuales atraen agua. Unidas a cada cadena hialurónica están las cadenas laterales de sulfato de condroitina y sulfato de queratan.

Los discos herniados se han tratados con fármacos quimionucleolíticos, tal como quimopapaína y una colagenasa, típicamente por la introducción local del fármaco en el disco. Un fármaco quimionucleolítico degrada uno o más componentes del NP, disminuyendo en consecuencia la presión. La quimionucleolisis es efectiva en los discos protruidos y extruidos. La la quimionucleolisis se ha usado para tratar hernias vertebrales lumbares (más bajas) y cervicales (vertebras superiores). Para los métodos en este documento, cualquier enzima que degrade un componente del NP y que se active acondicionadamente se puede administrar. Estas enzimas incluyen catepsina L. Además, cualquiera de las hialuronidasas, colagenasas, condroitinasas que no son acondicionadamente activables, se pueden modificar para volverlas así. Por ejemplo, las enzimas sensibles a la temperatura, como se describe en este documento, que incluyen MMPs modificadas, tal como MMP-1 modificada como se describe en este documento se pueden emplear los métodos en este documento.

J. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen para propósitos ilustrativos únicamente y no se proponen para limitar el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Preparación de la Catepsina-L Recombinante Activada

La catepsina-L humana recombinante purificada etiquetada con histidina (His) se compró de R&D systems (Minneapolis, MN. Cat# 952-CY) y se formuló en una concentración de 0.9 mg/mL en Acetato 50 mM, pH 4.0, NaCl 100 mM. Las alícuotas de 500 µL se almacenaron a -80°C hasta que se usaron.

La concentración e intercambio de solución amortiguadora se realizaron en alícuotas almacenados antes del uso. Brevemente, 2 mL de 0.9 mg/mL de catepsina-L se descongelaron sobre hielo y 500 µL se transfirieron a 4 tubos de membrana de filtro de centrífuga microcon que tienen 30 KDa de corte (Millipore; Bedford, MA, Cat#42410). Los tubos microcon se hicieron girar a 9000 rpm durante 5 minutos dando por resultado un volumen final de 50 µl. 450 µL de solución amortiguadora de concentración fría (Na-Formiato 100 mM pH 4, NaCl 100 mM, DTT 5 mM, EDTA 10 mM) se agregó a cada tubo micron. La adición de DTT 5 mM durante el procesamiento convierte la catepsina-L a una sola proteína de cadena de aproximadamente 36 KDa como se estima por el SDS-PAGE. Las etapas de intercambio de intercambio de concentración y solución amortiguadora remueven el propéptido 10-16 KDa inhibidor. Además, el DTT y EDTA se agregaron durante la concentración y el intercambio de solución amortiguadora minimiza la degradación proteolítica de la catepsina-L. El procedimiento de centrifugación se repitió tres veces. Los tubos y las soluciones de concentración se enfriaron para minimizar la degradación, puesto que la catepsina-L es sensible a la temperatura. Después del giro final, los tubos

microcon se invirtieron y el líquido se recolectó en el vaso de retención mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos. El volumen final recuperado fue de 400 µL, dando por resultado una concentración de cinco veces. La catepsina-L concentrada se repartió en alícuotas en volúmenes de 67 µL, las cuales contuvieron aproximadamente 300 µg de enzima activada. Las alícuotas se almacenaron a -80°C, y se descongelaron sobre hielo antes del uso.

Antes del uso, la catepsina-L se formuló en su pH óptimo de 5 al agregar una alícuota a 3 mL de solución amortiguadora de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) en pH 5, dando por resultado una concentración final de 100 µg/mL de catepsina-L activada. Como un control, la catepsina-L se formuló en solución amortiguadora HEPES a pH 7.4 donde la enzima es mínimamente activa.

Ejemplo 2

Ensayo de Hidroxiprolina

Un ensayo de hidroxiprolina se usó para medir los cambios del contenido de colágeno en las muestras de piel después de la perfusión con catepsina-L. Mientras que el contenido de hidroxiprolina de otras proteínas es insignificante, el colágeno contiene hidroxiprolina en una concentración de 8% (TV. Burjanadze, Hydroxyproline content and location in relation to collagen thermal stability. Biopolymers 18: 4931-4938 (2002)). El ensayo de hidroxiprolina (HP) usado fue una modificación del procedimiento de Reddy y Enwemeka (Clinical Biochemistry 29:225-229 (1996)).

En particular, los volúmenes de los reactivos se

modificaron para finalización de la reacción en tubos franja de 0.2 mL de 8 pocillos (Brandtech, Essex, CT) en un termociclador estándar thermocycler (Eppenforf Mastercycler, Westbury, NY). Todas las etapas que incluyen hidrolización, acidificación y detección con el reactivo de Ehrlich se llevaron a cabo en los tubos de 0.2 mL. Todos los productos químicos se compraron de Sigma (St. Louis, MO). Brevemente, las muestras perfundidas de los experimentos de perfusión se extrajeron mediante precipitación con 5 volúmenes de 200 de etanol de prueba y se centrifugaron. Los volúmenes del perfundido recolectado se midieron usando pipetas de 1 mL o 200 µL. Los perfundidos se transfirieron a tubos de centrífuga cónicos de 15 mL etiquetados. Las mezclas de perfundido de etanol se almacenaron en un congelador a -80°C durante 30 minutos antes de ser centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga de cubo oscilante Eppendorf. Después de la centrifugación, el precipitado se disolvió en 150-400 µL de NaOH 2N dependiendo del tamaño de la pelotilla. El sobrenadante se secó en un liofilizador, y se disolvió en 150-200 µL de NaOH 2N. Después de la disolución en NaOH, las muestras se transfirieron a tubos franja de 8 pocillos en un volumen de 200 µL o menos por tubo y se hidrolizaron a 99°C durante 12 horas en un termociclador para permitir la hidrólisis completa del colágeno y la liberación de la hidroxiprolina. Las muestras ses acidificaron con HCl concentrado (5.2 µL de HCl por cada 25 µL de muestra hidrolizada). 60 µL de cloramina-T (Sigma; Cat# C9887) se agregaron a un volumen igual de hidrolizado acidificado para completar la oxidación de la hidroxiprolina. Después de la

oxidación completa, 120 µL de reactivo de Ehrlich (Sigma, Saint Louis, MO, Cat# 39070(Fluka)) se agregaron y se incubaron a 65°C durante 25 minutos, dando por resultado un color purpura. La intensidad de la coloración es dependiente de la cantidad de la hidroxiprolina derivada del colágeno derivada del perfundido. Las muestras se leyeron en el intervalo visible a 550 nm en un lector de placas Spectramax 2E^{MR} (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Una curva estándar se estableció usando una solución de hidroxiprolina purificada (Sigma, Saint Louis, MO, Cat# H54409), y el contenido de hidroxiprolina en las muestras de la piel se determinaron a partir de la curva estándar.

Ejemplo 3

Degradación del Colágeno por la Perfusión de Explantes de Piel de Rata Ex Vivo con Catepsina-L Activada

Explantes de piel (2 cm x 2 cm) se removieron quirúrgicamente del sitio dorsolateral de ratas Sprague-Dawley macho de tres meses de edad (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) anestesiadas con isofluorano al 2%. Los explantes se inmovilizaron con agujas a una almohadilla Styrofoam^{MR} adherida con pegamento a una caja de petri de 100 mm y se mantuvieron a 37°C con una almohadilla térmica. Usando una bomba de infusión (Thermo Orion, model M361, Boston, MA), 6 mL de una solución que contiene solución amortiguadora MES (ácido 2-(N-morfolino-etanosulfónico) en pH 5 y rHuPH20 en 2500 Unidades/mL (manufactura interna de Halozima rHuPH20 lote # 056-100; actividad específica: 124,000 U/mL y contenido de proteína de 1.05 mg/mL) primero se perfusionaron durante 35

000286

minutos a través de los explantes de piel por la vía de una aguja de mariposa de calibre 27 insertada dentro de la capa dérmica de los explantes. Después de la finalización de la perfusión ácida, los explantes de piel se perfusionaron durante aproximadamente 30 minutos con o sin 100 µg/mL de catepsina-L activada en solución amortiguadora MES, pH 5 o catepsina-L de control en solución amortiguadora HEPES, pH 7.4. Las fracciones se recolectaron al aspirarlas con una micropipeta de 200 µL y al recolectar los contenidos en tubos Eppendorf 1.5 mL en intervalos de tiempo de 5-10 minutos durante el procedimiento de perfusión completo. Las fracciones se acumularon en tubos Eppendorf y se congelaron rápidamente hasta que el análisis de hidroxiprolina (HP) se realizó como se describe en el Ejemplo 2.

Los resultados de tres experimentos diferentes muestran que los niveles HP se incrementaron significativamente únicamente en las muestras perfusionadas con catepsina-L activada en el pH óptimo de 5. Los niveles de HP promedio (n=3) se incrementaron de menor que 1 µg/mL del perfusionado a aproximadamente 6 minutos a más de 30 µg/mL de perfusionado a aproximadamente 30 minutos. Nada o poco HP se midió en los perfusionados de las infusiones con solución amortiguadora MES de pH 5 únicamente; la solución amortiguadora HEPES de pH 7.4 únicamente; y la catepsina-L de control en pH 7.4.

Ejemplo 4

Degradación del Colágeno Mediante la Perfusión de los Explantes de Piel de Cerdo Ex Vivo con Catepsina-L Activada

Cerdos Yorkshire hembras de tres meses de edad (S y S

000286

Farm, Ramona, CA) se mantuvieron en ayudas durante toda la noche y se anestesiaron mediante inyección intramuscular de quetamina (20 mg/kg)/Xilazina (2 mg/kg) y atropina (0.04 mg/kg). Los animales luego se intubaron y la anestesia se mantuvo con isoflurano inhalado al 2% (Baxter, Deerfield, IL) en oxígeno (Airgas, San Diego, CA). Los explantes de piel completos (5 cm x 5 cm) se removieron quirúrgicamente de la espalda de los animales, se colocaron en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) a 4°C, y se usaron dentro de 2 horas después de la escisión. La perfusión de los explantes y el análisis de hidroxiprolina se llevaron a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 3, excepto que los explantes de piel de cerdo se perfusionaron con solución amortiguadora MES de pH 5, o solución amortiguadora MES de pH 5 que contiene 100 µg/ml de catepsina-L sin PH20. Inicialmente, los explantes, se perfusionaron con 6 mL de solución amortiguadora MES de pH 5 durante aproximadamente 30 minutos, y las fracciones se recolectaron cada 5-10 minutos. Después, los explantes se perfusionaron con 3 mL de 100 µg/ml de catepsina-L en solución amortiguadora MES de pH 5 o solución amortiguadora sola como un control recolectadas cada 5 minutos durante aproximadamente 25 minutos. El análisis HP mostró un incremento dependiente de tiempo en los niveles HP en las muestras perfusionadas con catepsina-L. El HP no detectable podría ser medido en las muestras perfusionadas con solución amortiguadora MES de pH 5 sin la catepsina-L. Los niveles más altos de HP se midieron en el tiempo de 15 minutos. Los niveles HP medidos en 25 minutos fueron similares a aquellos medidos en 15 minutos.

000288

Ejemplo 5

Disminución en los Septos Fibrosos en el Espacio Subcutáneo Mediante la Perfusión de Explantes de Cerdo con Catepsina-L Activada

Los explantes de piel de cerdo se procesaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 4 mediante la perfusión con solución amortiguadora MES, pH 5 que contiene 2500 U/mL de rHuPH20, a una velocidad de 0.17 mL por minuto durante 30 minutos, seguido por la perfusión con 3 mL de 100 µg/ml de catepsina-L en solución amortiguadora MES de pH 5 sn rHuPH20 a 0.12 mL/minutos durante 25 minutos. Después de la infusión con catepsina-L, los explantes se recortaron en piezas pequeñas que se fijaron en formalina amortiguada al 4% durante toda la noche. Los explantes de cerdo no tratados de control se procesaron similarmente. Los tejidos se lavaron en PBS, se deshidrataron en soluciones de etanol y xileno graduadas, y se incrustaron en parafina. Los bloques que se cortaron en secciones delgadas de 4 µm que se transfirieron a portaobjetos de microscopio y se tiñeron con tinción Trichrome de Masson para la visualización del colágeno. Brevemente, las secciones se desparafinizaron, se hidrataron en agua destilada y se trataron con mordiente en solución de Bouin (Sigma, Cat #HT10-132) durante 15 a 30 minutos a 56°C. Las secciones se enfriaron y se lavaron en agua corriente hasta que el color amarillo desapareció y se enjuagaron en agua destilada. Las secciones luego se tiñeron en solución de Trabajo de Hetatoxilina de Hierro de Weigert (Sigma Cat # HT107 y HT109) durante 5 minutos y se lavaron en agua corriente durante 10 minutos. Las

000289

secciones se lavaron en agua desionizada durante 5 minutos y se colocaron en Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin (Sigma, Cat # HT151) durante 5 minutos. Las secciones se transfirieron a la solución de ácido Fosfotungstico/Fosfomolibdico de Trabajo (Sigma Cat # HTl 52 y HTl 53) y finalmente se tiñeron en Solución Azul de Anilina (Sigma Cat # HT154) durante 5 minutos y se diferenciaron en ácido acético al 1% durante 2 minutos. Las secciones se enjuagaron en agua destiladas, se deshidrataron en alcohol a 95% y alcohol absoluto, y se clarificaron en xileno con dos cambios. Las secciones se montaron y se observaron en un microscopio invertido Nikon. Las imágenes se obtuvieron usando un objetivo 20x en un microscopio fluorescente Nikon acoplado a un escáner de cámara (Diagnostic Instrument Inc., Sterling Alturas, MI) que contiene el programa de formación de imágenes avanzado SPOT.

La hipodermis contiene predominantemente tejido adiposo. Las hebras de tejido conjuntivo densas hechas de septos fibrosos de colágeno se extienden desde la profundidad de la dermis en la hipodermis y anclan la piel a las estructuras adyacentes. Los resultados de la histología muestran que los septos fibrosos que separan las cámaras de células de grasa son visibles por toda la epidermis en la muestra no tratada. Después del tratamiento con catepsina-L en la solución amortiguadora MES, pH 5, el número de septos fibrosos de colágeno fue sustancialmente más bajo que en las muestras no tratadas, indicando que el tratamiento con catepsina-L altera notablemente la organización de la red de colágeno en la hipodermis.

000289

Ejemplo 6

A. Degradación del Colágeno en la Piel de Ratas Anestesiadas Vivas

Se realizaron experimentos de perfusión en ratas Sprague-Dawley macho de tres meses de edad (Harlan Sprague-Dawley, Inc. Indianapolis, IN) mantenidas bajo anestesia de isofurano al 2%. Los experimentos de perfusión se realizaron usando catepsina-L a pH 5, y como un control para la especificidad, en solución amortiguadora HEPES en pH 7.4. Brevemente, usando una bomba de infusión, aproximadamente 15 mL de una solución que contiene ya sea solución amortiguadora MES 25 de pH 5, o solución amortiguadora HEPES 25 mM de pH 7.4, y 2500 Unidades/ml de rHuPH20 (manufactura interna de Halozima lote # 056-100 con actividad específica de 124,000 U/mL y contenido de proteína de 1.05 mg/mL), primero se perfusionaron durante aproximadamente 60 minutos por la vía de la piel de la cola usando una aguja de mariposa de calibre 27 insertada en la capa dérmica de la piel. Después 3 mL de solución que contiene catepsina-L o control de solución amortiguadora se perfusionaron durante 25 minutos. Las soluciones de perfusión que contienen Cat-L contuvieron 100 µg/mL de Cat-L activado ya sea en su pH óptimo de 5 en MES 5 mM o en el pH de 7.4 en HEPES 20 mM. La resistencia iónica de la solución amortiguadora de pH 5 se redujo de 25 mM a 5 mM para facilitar la neutralización del pH por el medio ambiente del tejido local y limitan en consecuencia la propagación de la enzima activa. En caso de Cat-L en la solución amortiguadora HEPES en pH 7.4 una resistencia iónica de por lo menos 20 mM se mantuvo para asegurar que el Cat-L agregado, activado y

000290

formulado en una solución amortiguadora de alta consistencia iónica en pH 4, no alteraría sustancialmente el pH de la solución amortiguadora HEPES (pH7.4). Una alícuota pequeña de Cat-L agregada al HEPES 20 mM de pH 7.4 se verificó con papel de pH para asegurar que ese pH resultante, después de que el Cat-L se había agregado, de hecho se acercó al pH 7.4. Las soluciones de control amortiguadoras usadas para la perfusión fueron MES 5 mM de pH 5 o HEPES 20 mM de pH 7.4, sin enzimas agregadas. Las fracciones perfusionadas se recolectaron de la piel de la cola en intervalos de tiempo regulares, es decir en 20, 40 y 60 minutos durante la perfusión inicial y en 8 y 25 minutos durante la perfusión con Cat-L. Las fracciones se acumularon en tubos Eppendorf y se congelaron rápidamente para evitar la acción enzimática adicional. El análisis de hidroxiprolina se realizó como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados muestran que la HP se podría medir únicamente en las muestras perfusionadas con catepsina-L activada. Los niveles más altos de HP se midieron en las muestras perfusionadas de 25 minutos. No hubo HP detectable en las muestras perfusionadas con solución amortiguadora MES de pH 5 únicamente, o con solución amortiguadora HEPES de pH 7.4 únicamente, o con catepsina-L en la solución amortiguadora HEPES de pH 7.4.

B. Tratamiento con Catepsina-L Conduce a la Degradación del Colágeno Dependiente de pH *in vitro*

Las catepsinas B, D, L y S y la colagenasa bacteriana se estimaron para la degradación hacia el colágeno de rata a pH 5.0 y pH 8.0. Las catepsinas B, D, L y S se compraron de R&D systems y cada enzima se activó con base en las

000290

especificaciones individuales de la manufactura de enzimas. La colagenasa bacteriana se compró de Sigma Chemicals, y no requiere activación. El colágeno de Tipo I soluble de cola de rata se digirió durante 1 hora a 37°C mediante incubación con catepsina B, D, L o S activada o colagenasa bacteriana, en las soluciones amortiguadoras especificadas de la manufactura o en solución salina amortiguada de pH 8.0 Tris, seguido por geles SDS-Page y tinción Azul Coomassie. Otras catepsinas no se sometieron a prueba a pH 5, pero en pH y solución amortiguadora especificada de la manufactura. Los resultados muestran que la catepsina-L fue la única enzima que estuvo activa en pH 5.0, pero no en pH 8.0. Las catepsinas B, D y S mostraron alguna ligera degradación del colágeno de rata en el pH especificado de la manufactura y sin degradación del colágeno de rata en pH de 8.0, mientras que la colagenasa bacteriana degradó el colágeno de rata en tanto pH 5.0 como pH 8.0.

Ejemplo 7

A. Regreso de la Neutralidad Después de la Acidificación de la Piel en una Rata Viva

Cuando una solución de ácido acuoso diluido se inyecta en el intersticio de la piel, el cambio en el pH es temporal y el pH neutro de la piel se restara rápidamente debido a la capacidad amortiguadora significativa del intersticio. Se usó rojo fenol como un indicador visual del pH intersticial. La sal de sodio del rojo fenol se susa ampliamente en el medio de cultivo de células para identificar los cambio de los valores de pH de neutro a ácido. Una solución de rojo fenol tiene un color amarillo en un pH de 6.4 o abajo, color anaranjado en pH

000292

7.0, color rojo en pH 7.4 y arriba, color purpura en pH 7.8.

Ratas Sprague-Dawley macho de tres meses de edad (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) se mantuvieron bajo anestesia de isofluorano al 2%. La piel se afectó para fácil visualización del tinte rojo de fenol. 2-2.5 mL de MES 25 mM, pH 5 que contiene 500 U/ml de rHuPH20 se perfusionaron en la piel de la cola por la vía de una aguja de mariposa de calibre 27 insertada en la capa dérmica. Esto se siguió por una solución de 1-1.5 mL de rojo fenol al 0.05% (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, Cat # P0290) en solución amortiguadora en MES 10 mM, 25 mM, 50 mM y 100 mM, pH 5. La MES (ácido 2-(N-morfolino-etanosulfónico (C16H13NO4A)) tiene un peso molecular de 195.2. No incluyó rHuPH20 en la solución de rojo fenol. Usando micropinzas, el frente del rojo fenol se midió en diferentes puntos de tiempo, en dos dimensiones, y en las áreas se calcularon usando la fórmula: Area = (D1 x D2) x 7T/4. Se observó el cambio en el color y se registró el tiempo del regreso a la neutralidad. Los resultados de la Tabla 4A resumen el tiempo promedio en minutos al regreso de la neutralidad e indican que el regreso a la neutralidad se puede modular por la consistencia iónica de la solución amortiguadora.

Tabla 4A - tiempo promedio para neutralidad

Solución de consistencia amortiguadora en mM id MES	**Area inicial de Rojo Fenol**	**% de reducción después de 5 minutos**	**% de reducción después de 10 minutos**	**% de reducción después de 15 minutos**	**% de reducción después de 20 minutos**	**Tiempo promedio para neutralidad en minutos**
10; n=3	80	71	86	98	-	10

000292

25; n=3	123	59	78	91	-	10
50; n=2	115	38	100	100	-	10
100; n=2	191	15	38	55	71	20

B. Regreso a la Neutralidad Después de la Acidificación de la Piel de Ratón

El período de tiempo para el regreso a la neutralización, y la inactivación subsecuente de la catepsina-L depende de la consistencia de la solución amortiguadora inyectada. La capacidad reguladora intrínseca del intersticio se estimó al medir el tiempo de regreso a la neutralización usando un tinte indicador de rojo fenol en pH 5.0 con constitución amortiguadora de incremento (MES 10-100 mM) en ratones desnudos. Se inyectaron ratones desnudos anestesiados con 0.125 mL de solución amortiguadora MES (10 mM a 100 mM), pH 5 que contiene rojo fenol. El tiempo de la neutralización del rojo fenol en la dermis es midió visualmente. Los resultados se representan en la Tabla 4B a continuación.

TABLA 4B: Medición de la Capacidad Amortiguadora Intersticial en la Piel de Ratón

Solución amortiguadora	**Consistencia iónica (mM)**	**pH**	**Tiemp para neutralización (minutos)**	**SD**
Fosfato	10	7.4	0	-
MES	10	5.0	0	-
MES	25	5.0	0	-
MES	50	5.0	7.3	1.25
MES	100	5.0	7.8	2.1

De esta manera, mediante la inyección intradérmica de los indicadores de pH en consistencias amortiguadoras de incremento (MES 10-100 mM de pH 5.0), se estableció que un medio ambiente extracelular temporal-espacial ha sido de 1-20 minutos/100mm2

000299

de inyección se podrían obtener.

Ejemplo 8

Ingeniería de la Catepsina-L de Hígado Humano Recombinante

El Cat-L ADNc humano SEQ ID NO: 9 (codificado por una secuencia de nucleótidos expuestos en SEQ ID NO: 10) y Cat-L-His ADNc SEQ ID NO: 12 (codificado por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 13), se amplificaron por PCR del ADNc de hígado humano (Clon Clonetech QUICK ADNc 637205) usando los cebadores que se diseñaron de acuerdo con los datos de secuencia publicados para la procatepsina-L ADNc de riñón humano. Los sitios de restricción 5′ Nhel y 3′ BamHI se agregaron como parte de la síntesis del cebador de PCR. Los cebadores usados en amplificación se exponen en la Tabla 5.

TABLA 5: Cebadores

Cebador	**Secuencia**	**SEQ ID NO**	**Tm**	**longitud**	**Longitud de coincidencia**
Cat-L Humano 5′	5′-AAGGCCGCTAGCCACCATGGATCC TACACTCATCCTTGCTGC-3′	16	64° C	42 mer	22
3′ (con dos codones de detención)	5′-GAGCACGGATCCTCATCACACAGT GGGGTAGCTGG-3′	17	65° C	35 mer	20
Cat-L-His 5′	5′-AAGGCCGCTAGCCACCATGGATCC TACACTCATCCTTGCTGC-3′	16	64° C	42 mer	22
3′ (con	5′-	18	57°	49 mer	16

000296

6xHis tag) CCTGCCGGATCCTCAATGATG ATGA TGATGATGCACAGTGGGGTAG CTG C 3'

Ambos constructos basados en ADNc tienen el segundo aminoácido del péptido líder secretos Cat-L nativo mutado por una sola base para formar una secuencia Kozak consenso, cambiando en consecuencia el segundo aminoácido de N a D (como se expone en SEQ ID NO: 9 y 12). La identidad de los clones se verificó por la electroforesis en gel de agarosa estándar y el análisis de secuenciación de ADN.

El producto amplificado resultante se introdujo para clonación en el vector de expresión HZ24 (b/s). El vector de expresión es un casete bi-cistrónico basado en CMV para la expresión de tanto la proteína catepsina-L como el gen DHFR de murino separados por un sitio de entrada ribosomal interno (IRES) del virus de encefalomiocarditis. La secuencia resultante del vector de expresión HZ24-Cat-L se expone en SEQ ID NO: 11. La secuencia resultante del vector de expresión HZ24-Cat-L-His se expone en SEQ ID NO: 14.

Ambos plásmidos de expresión Cat-L y Cat-L-His se introdujeron en las células CHO-S (células CHO-K1 adaptadas al cultivo de suspensión sin suero, Invitrogen, Carlsbad, CA, cat # 11619-012) mediante la transfección usando el reactivo de transfección Genejuice (EMD Biosciences, San Diego, CA, cat # 70967). Los plásmidos de expresión también se introdujeron en las células DG44 CHO (obtenidas por la licencia del Dr. Lawrence Chasin, Columbia University), las cuales se adaptaron para desarrollarse en el cultivo de suspensión en un medio sin

000296

producto animal, químicamente definido (Invitrogen, Cat # 10743-029) mediante electroproación. Para la electroporación, mayor que 100 µg de plásmido linealizado ClaI se usó para cada electroporación de cada uno de los plásmidos. Veinte millones de células DG44 CHO por electroporación, en voltaje constante de 350 Voltios se transfectaron. La solución amortiguadora de electroporación contuvo 2X HeBS (HEPES 40 mM, pH 7.0; NaCl 274 mM; KCl 10 mM; Na2HPO4 1.4 mM; dextrosa 12 mM). Las células transfectadas se clonaron al limitar la dilución 72 horas después de la electroporación en medios CD-CHO estándar (Invitrogen #12610-010) sin hipoxantina y timidina de sodio para seleccionar las células que llevan el plásmido de DHFR. Los clones seleccionados que se desarrollan sin hipoxantina y timidina de sodio se subclonaron adicionalmente, con amplificación usando metotrexato para implementar el número de copias de injerto. Una transfección de simulacro sirvió como un control negativo.

Los sobrenadantes se cosecharon 72 horas después de la transfección y se hicieron girar a 1500 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes sin células de las células CHO-S y CHO-DG44 transfectadas con his-Cat-L, Cat-L y el simulacro se aplicaron a los concentradores de centrífuga de 10 kDa de corte de micra (Millipore; Bedford, MA. Cat# 42407) y se concentraron aproximadamente 10 veces por centrifugación a 12000 rpm a 4°C. La Catepsina-L Humana Recombinante secretada en los sobrenadantes de cultivo de tejido se clasificó por el ELISA de captura (Calbiochem Catepsina-L ELISA Kit #QIA94), el análisis Western Blot que usa el Mab 33/1 monoclonal (Bender MedSystems,

Burlingame, CA) como se describe en el Ejemplo 10 y para la actividad enzimática que usa el substrato de péptido fluorescente (Z-L-R-AMC) como se describe en el Ejemplo 9.

Ejemplo 9

Determinación de la Actividad Enzimática de catepsina-L usando un sustrato de péptido fluorogénico

La actividad enzimática de la catepsina-L se sometió a ensayo usando un sustrato fluorogénico comercialmente disponible, designado como Z-Leu-Arg-AMC (Z=:N-carbobenciloxi; AMC:7-Amino-4-Metil Coumarina, R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat# ES008). El sustrato de péptido contiene un grupo 7-amino-4-metil coumarina altamente fluorescente (AMC) que se enfría rápidamente por en enlace de amida formado entre su grupo amino y el grupo carboxilo del residuo Arg. La catepsina-L activada escisa este enlace de amida dando por resultado un incremento en la fluorescencia liberada. Mientras que el sustrato de péptido se puede escisar por otras catepsinas, prominentes entre las cuales está la catepsina-B, la actividad de la catepsina-L se determinó específicamente al usar inhibidores específicos adecuados para la catepsina-B y midiendo la actividad en la presencia y ausencia del inhibidor. Específicamente el inhibidor de catepsina-B selectivo CA-074 (Calbiochem, San Diego, CA, Cat# 205530) se usó en una concentración final de 1 µM y las muestras se sometieron a en ensayo en presencia y ausencia de CA-074. Los sobrenadantes de cultivo de células de 72 horas después de la transfección en células CHO se ajustaron a pH 5 al agregar una solución amortiguadora MES concentrada en pH 5 y se incubaron sobre

hielo durante 30 minutos. Esta etapa de activación ácida escisa el propéptido y genera catepsina-L madura. Para diluir el fragmento de propéptido el cual es un potente inhibidor de la actividad de la enzima catepsina-L (Carmona, E. y colaboradores. Potency and selectivity of the catepsina-L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. Biochemistry 35: 8149-8157 (1996)), las muestras se concentraron y la solución amortiguadora se intercambió con solución amortiguadora MES 50 mM de pH5 sobre un tubo microcon de 30 KDa tres veces. Las muestras luego se sometieron a ensayo para la actividad enzimática por el ensayo de sustrato de péptido fluorogénico sobre el sustrato Z-AMC.

Una preparación comercial de la catepsina-L (R&D Systems; Cat# 952-CY) se activó de una manera similar aquella de las muestras y se usó como un estándar por la dilución enserie. Después de la activación, las muestras y los estándares se diluyeron en enserie en solución amortiguadora MES 100 mM de pH 5 que contiene DTT 5 mM y EDTA 10 mM, en una microplaca de fondo opaco y se incubaron con el sustrato de péptido fluorogénico Z-AMC a 37°C durante 30 minutos. El sustrato Z-AMC se usó en una concentración final de 10 µM en un volumen total de 200 µL cuando se combinó con las muestras o estándares.

La fluorescencia resultante se leyó en la banda de excitación-emisión (380 nm-460 nm) optima recomendada para el sustrato en un lector de placa fluorescente (Molecular Devices, SpectraMax 3, Sunnyvale, CA). Los valores de la muestra se derivaron de la curva estándar retirada de la unidad de fluorescencia relativa (RFU) obtenidos de la serie de dilución

del estándar. Después de un ajuste de 4 parámetros con el software Softmax^{MR} (Molecular Devices, SpectraMax 3, Sunnyvale, CA), la curva estándar fue pseudo-lineal entre los intervalos de concentración de 10-100 ng/mL. Los resultados se muestran en la Tabla 6 a continuación. La actividad de la catepsina-L de células transfectadas CHO-S fue por lo menos 10-20 veces más alta que la actividad de fondo de las células hospederas transfectadas simuladas y mediante el ensayo en presencia del inhibidor de catepsina-B selectivo CA-074. La actividad enzimática incrementada en el medio de cultivo transfectado de catepsina-L se vuelve asignar de esta manera a la actividad específica de Cat-L.

Tabla 6: Mediciones de la actividad de la enzima Cat-L en presencia del inhibidor de la catepsina-B por ensayo Z-AMC en células transfectadas 72 horas después de la transfección

Descripción del clon	CHO-S transfectada de simulacro	CHO-S transfectado con Cat-L	CHO-S transfectado con His Cat-L
ng/mL de actividad Cat-L	20	723	248

Ejemplo 10

Análisis Western Blot de la Catepsina-L Recombinante Humana Expresada

Después de la expresión y concentración de los sobrenadantes sin células como se describe en el Ejemplo 8, el análisis Western Blot se realizó para confirmar la expresión. Brevemente, para cada una de las 6 diferentes muestras (cat-L, cat-L-His y simulada de cada una de las células CHO-S o CHO-

DG44), 30 µL de sobrenadantes concentrados se mezclaron con 10 µL de 4X (en lugar de la solución amortiguadora de muestra de carga de gel) para SDS-PAGE (EMD Bioscience, San Diego, CA, cat# 70607-3) y 2 µL de DTT 100 mM y se incubaron a 80°C durante 20 minutos. Como un control positivo, 750 ng de catepsina-L recombinante purificada comercial (R&D Systems) en 30 µL de PBS 1X se incluyeron y se procesaron idénticamente. El volumen total (42 µL) de las muestras se cargaron sobre geles de Tris-Glicina al 4-20% (Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat# EC6028BOX) y se llevó a cabo la electroforesis en solución amortiguadora corriente Tris-Glicina SDS hasta que el frente de tinte del marcador de peso molecular pre-teñido (Invitrogen, Cat# LC5925) alcanzó el fondo del gel. Las proteínas se transfirieron en la membrana PVDF por el aparato de tinción semi seca I-Blot (Invitrogen, Cat# IB1001) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transferencia se verificó por la ausencia casi complete de color de las bandas marcadoras pre-teñidas sobre el gel. La membrana se bloqueó en solución amortiguadora bloqueadora que consiste de leche en polvo sin grasa al 5% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. La catepsina-L se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón (Mab 33/1) a la catepsina-L humana (Bender MedSystems, Burlingame, CA, Cat# BMS 166) usada en 1 µg/mL de concentración final en el bloqueador y se incubó durante toda la noche 4°C seguido por un IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Calbiochem, San Diego, CA, Cat# DC02L) usado en una concentración de 33 ng/mL en un bloqueador durante 1 hora a temperatura ambiente. La señal HRP se desarrolló por la

solución de desarrollo de membrana TMB Insoluble (Calbiochem, Cat# 613548) y la reacción se detuvo después de 30 minutos a temperatura ambiente.

El análisis de Western blot mostró bandas de proteína específicas para Cat-L. NO se detecto banda específica en las células transfectadas de simulacro. El nivel de expresión de Cat-L y His-Cat-L pareció que es más alto en las células CHO-S que en las células DG44, probablemente debido a la eficiencia en la transfección en las dos líneas de células. Los resultados de los análisis de Western blot fueron consistentes con los resultados que usan el ensayo de actividad de enzimática con el sustrato de péptido fluorogénico Z-AMC como se describe en el Ejemplo 9. El peso molecular de la catepsina-L expresada en CHO-S y DG44 es 44-45 KDa que corresponde al tamaño esperado de la proteína que contiene aun el propéptido. El peso molecular de la catepsina comercial usado como un control positivo (R&D Systems) fue 36 KDa para la catepsina-L madura. La diferencia en el tamaño entre la proteína expresada en las células CHO-S y CHO-DG44 transfectadas y la catepsina-L comercial puede ser debido a la diferente glicosilación específica de célula hospedera o a la remoción del propéptido de la Cat-L comercial.

Ejemplo 11

A. Generación de la Catepsina-L Sintética y Catepsina-L-His

Un constructo de ADN que codifica la catepsina-L humana madura, (aminoácidos 18-333 de GenBank Acceso No. EAW62736; SEQ ID NO: 1) se sintetizó la optimización de codón para las células CHO. La optimización de codón se basó en la tabla de optimización de codón para Cricetulus griseus, listado por Blue

Heron Biotech (blueheronbio.com). El constructo se sintetizó para contener un péptido de señal heterólogo diseñado de la familia de genes IgG kappa humano (SEQ ID N0:2) para permitir la secreción de la proteína recombinante en el sobrenadante de cultivo de tejido. La secuencia de nucleótidos del constructo catepsina-L optimizado se expone en SEQ ID NO: 3 y codifica un polipéptido expuesto en SEQ ID NO:4. Un sitio de restricción 5' Nhe I y un sitio de restricción 3' BamH I se incorporaron como parte de la síntesis del constructo. El constructo sintético luego se introdujo en el vector de expresión HZ24 (b/s), como se describe en el Ejemplo 8. El vector de expresión Cat-L sintético se diseño HZ24 (B/S) - CAT-L y se expone en SEQ ID NO:5. Otro contracto Cat-L que contiene una etiqueta de 6 Histidina C-terminal separada por un enlazador (GGGGSG; SEQ ID NO: 15) también se sintetizó. La secuencia de nucleótidos del constructo Cat-L-His sintetizado se exponen en SEQ ID NO:6 y codifica un polipéptido expuesto en SEQ ID NO:7. Este constructo también contuvo un sitio de restricción 5' Nhe I y un sitio de restricción 3' BamH I, incorporado como parte de la síntesis del constructo, y se introdujo en el vector de expresión HZ24 (b/s). El vector de expresión Cat-L-His sintético se designo HZ24 (B/S) - CAT-L-His y se expone en SEQ ID NO: 8.

El vector de expresión Cat-L sintético expuesto en SEQ ID NO: 5 y el vector de expresión Cat-L-His sintético expuesto en SEQ ID NO:8 se transfectaron en células CHO-DG44 mediante electroporación, como se describe en el Ejemplo 8. Los sobrenadantes se cosecharon durante 72 horas después de la

transfección y se procesaron como se describe en el Ejemplo 8 (sin ajuste de pH) para generar catepsina-L no activada.

Los sobrenadantes de cultivo de tejido también se procesaron para dar por resultado la activación de la catepsina-L. Esto se logró usando un pH bajo, dando por resultado la escisión del propéptido de catepsina-L, dando por resultado la activación de la enzima. Los sobrenadantes de las células transfectadas con el constructo sintético y las células de control no transfectadas se ajustaron a pH 4 al agregar solución amortiguadora ácida concentrada (Formiato 1000 mM de pH 4, NaCl 1000 mM, DTT 50 mM, EDTA 100 mM) a los sobrenadantes en una relación de 1:10, respectivamente. Los sobrenadantes se incubaron sobre hielo durante 30 minutos para permitir la activación completa. Luego se concentraron mediante centrifugación a través de un dispositivo de concentración de centrifuga de peso molecular 30 KDa de corte (Microcon 30, Millipore, Bedford, MA. Cat# 42410), lo cual permitió el propéptido escisado (con un tamaño predicho de aproximadamente 12-14 KDa) para pasar a través, mientras que retiene la proteína madura (tamaño predicho de aproximadamente 36-40 kDa). Después de la concentración, los sobrenadantes activados y no activados se corrieron sobre un gel SDS-PAGE al 4-12% seguido por el análisis por la técnica Western Blot que usa el Mab 33/1 monoclonal como se describe en el Ejemplo 10. La catepsina-L sintética y Cat-L-His se detectaron en los sobrenadantes de cultivo de tejido de las células transfectadas en niveles similares. El peso molecular de la Catepsina-L y Cat-L-His en los sobrenadantes no activados fue de aproximadamente 44 kDa,

comparado con aproximadamente 36 a 40 kDa para los sobrenadantes activados, debido a la ausencia del pro-péptido.

Los sobrenadantes activados también se clasificaron para la actividad enzimática de la Catepsina-L usando el sustrato de péptido fluorescente (Z-L-R-AMC) como se describe en el Ejemplo 9. La actividad enzimática de Cat-L se midió en presencia del inhibidor de la catepsina-B (para bloquear la actividad enzimática similar a la catepsina-B hospedera) por ensayo Z-AMC en células CHO-DG44 transfectadas 72 horas después de la transfección. Los resultados se exponen en la Tabla 7 a continuación. La actividad de la catepsina-L de las células transfectadas CHO-DG44 72 horas después de la transfección fue de aproximadamente 6-17 veces más alta que la actividad de fondo de las células hospederas transfectadas de simulacro. Mediante ensayo en la presencia del inhibidor de la catepsina-B selectiva CA-074, la contribución de la actividad enzimática similar a la catepsina-B hospedera se bloqueó. De esta manera, la actividad enzimática incrementada en medio de cultivo de tejido transfectado con catepsina-L se puede asignar a la actividad específica de Cat-L expresada de los clones Cat-L transfectados

TABLA: 7

Descripción del clon	transfectado simulada	transfectada con Cat-L	transfectada con Nis Cat-L
ng/mL de la actvidad del cAt-L	Menor que 100	1700	600

B. Selección de los clones de Catepsina-L sintética en metotrexato

Las células de Catepsina-L sintética, producidas como se

describe en la sección A, anteriormente, se clonaron al imitar la dilución después de la electroporación en un medio CD-CHO estándar sin hipoxantina de sodio y timidina para seleccionar las células que llevan un plásmido con el gen DHFR, luego se sub-clonaron y se expandieron adicionalmente en presencia de metotrexato 50 mM para incrementar el número de copias de inserto. Las corridas subsecuentes de la sub-clonación y la expansión en 200 mM y 1000 mM luego se realizaron para identificar las líneas de células amplificadas con metotrexato adecuadas para el uso en la producción a gran escala de la catepsina-L.

1. Clonación e identificación de los clones de la célula Cat-L en no metotrexato

Para seleccionar las células e identificar los clones de células Cat-L que se desarrollaron en la ausencia de metotrexato, las células de las transfección descrita anteriormente se recolectaron y se lavaron dos veces con un medio CD-CHO estándar (GIBCO; Invitrogen) que contiene GlutaMAX-I^{MR} 4 mM (GIBCO; Invitrogen), y sin suplementos de hipoxantina y timidina, mediante breve centrifugación a 500 x g. Después del lavado final, las células se contaron, y se diluyeron a 10,000 a 20,000 células viables por mL. Una alícuota de 0.1 mL de la suspensión de célula se transfirió a cada pocillo de frecuentemente, placas de tejido de fondo rondado de 96 pocillos. Todas las placas se suplementaron con 0.1 mL adicional de lo mismo. Las células se dejaron desarrollar 37°C, CO_2 al 5% en una incubadora humidificada.

Los pocillos que contienen colonias en desarrollo de

células bajo selección sin hipoxantina y timidina se identificaron por una combinación de ensayos de enzima de Catepsina-L y apariencia visual del crecimiento celular en los pocillos de cultivo. La actividad enzimática en el sobrenadante de cultivo de tejido de cada pocillo se estimó como se describe en el Ejemplo 9. Se identificaron veinte de clones (Tabla 7a).

Tabla 7a.

ID del Clon (Placa/pocillo)	**Actividad relativa del Cat-L (rfu)**	**ID del Clon (Placa/pocillo)**	**Actividad relativa del Cat-L (rfu)**
IC5	8957	6E3	9393
IF6	9161	6G11	5214
2F2	8722	7B2	6792
2C8	8487	7G9	9619
3E4	4952	8E4	3124
3F8	8599	8D7	3085
4F4	9540	9A5	6226
4D10	3374	9E12	7653
5B2	10065	10D3	2053
5B10	11709	10F6	3895

Los clones identificados se expandieron en pocillos individuales de placas de cultivo de tejido de 24 pocillos, que contienen 1 mL de medio CD-CHO suplementado con GlutaMAX-I^{MR} 4 mM, y sin hipoxantina y timidina. Las células se desarrollaron a 37°C, CO_2 al 5% en una incubadora humidificada. Las células se expandieron además en matraces de cultivo de tejido T-75 en el mismo medio. Tres frasquitos de de cada clon se archivaron por congelación en DMSO al 10%, medio acondicionado al 45%.

2. Clonación e identificación de las células en metotrexato 50 nM

Los 20 sub-clones de la línea de células que demuestran la proliferación y expresión de la actividad enzimática de Cat-L

se sub-clonaron de placas de 24 pocillos en placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos, usando una estrategia de dilución infinita bi-dimensional, en la cual las células se diluyen 1 en 3 a través de la placa, y 1 en 2 debajo de la placa. Los sub-clones diluidos se desarrollaron en un fondo de 500 células DG44 CHO no transfectadas por pocillo, para proporcionar factores de crecimiento necesarios para los días iniciales en el cultivo. Se hicieron cinco placas por sub-clon, que contiene una concentración final de metotrexato 50 nM en medio CD-CHO suplementado con GlutaMAX-I^{MR} 4 mM, y sin hipoxantina y timidina. Las células se desarrollaron a 37°C, CO_2 al 5% en una incubadora humidificada.

Los sub-clones que se desarrollan en metotrexato 50 nM que expresaron la Cat-L humana recombinante (sintética) se identificaron al medir la actividad enzimática de Cat-L como se describe en el Ejemplo 9. Los pocillos que demuestran la actividad enzimática sustancialmente más alta se compararon con los pocillos vecinos microscópicamente, y los clones periféricos de expresión alta se seleccionaron para expansión. Un total de 96 clones individuales se expandieron en placas de cultivo de tejido de 12 pocillos que contienen una concentración final de metotrexato 50 nM en medio CD-CHO suplementado con GlutaMAX-I^{MR} 4 mM, y sin hipoxantina y timidina. Las células se desarrollaron a 37°C, CO_2 al 5% en una incubadora humidificada. Estos 96 sub-clones se sometieron a prueba para la actividad enzimática de Cat-L secretada como se describe en el Ejemplo 9 en dos puntos de tiempos diferentes, entre 7 días. Los sub-clones que demuestran los incrementos más

grandes en la actividad enzimática de Cat-L durante el período de 7 días y la apariencia microscópica sana se seleccionaron para propagación. Los 7 sub-clones que se propagaron incluyeron 9E12 (#16), 7G9 (#50), 1C5 (#69), 4F4 (#76), 1F6 (#77), 5B10 (#90) y 2F2 (#92). Estos sub-clones se expandieron en presencia de metotrexato 50 nM en matraces T-25 y T-75 y se archivaron por congelación.

3. Clonación e identificación de las células en metotrexato 200 nM

Los sub-clones 9E12 (#16), 7G9 (#50), 1C5 (#69), 4F4 (#76), 1F6 (#77), 5B10 (#90) and 2F2 (#92) luego se sub-clonaron en medio que el contiene metotrexato 200 nM. Cinco, placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos se ajustaron usando la estrategia de dilución infinita bi-dimensional para cada uno de los siete sub-clones. Los sub-clones diluidos se desarrollaron en fondo de 500 células DG44 no transfectadas por pocillo en el medio CD-CHO suplementado con metotrexato 200 nM y GlutaMAX-I^{MR} 4 mM (sin hipoxantina y timidina). Las 35 placas se incubaron a 37°C, CO_2 al 5% en una incubadora humidificada.

Los sub-clones que expresan los altos niveles de rHuCat-L mientras que se desarrollan en metotrexato 200 nM se identificaron al medir la actividad enzimática de Cat-L en el sobrenadante de cultivo de células, como se describe en el Ejemplo 9. Un total de 35 sub-clones (5 de cada uno de 9E12 (#16), 7G9 (#50), 1C5 (#69), 4F4 (#76), 1F6 (#77), 5B10 (#90) y 2F2 (#92) se seleccionaron y se expandieron en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos en un medio CD-CHO

suplementado con metotrexato 200 nM y GlutaMAX-I^{MR} 4 mM (sin hipoxantina y timidina). Los sub-clones se incubaron a 37°C, CO_2 al 5% en una incubadora humidificada.

Los 35 sub-clones se sometieron a ensayo para la actividad de Cat-L, y los 10 sub-clones que expresan los niveles más altos de actividad enzimática secretada se propagaron a placas de cultivo de tejido de 6 pocillos. Los 10 clones, y los clones de los cuales se derivaron en la Tabla 7b. Estos 10 sub-clones se expandieron subsecuentemente en matraces de cultivo de tejido T75 y luego en matraces agitadores en un medio CD-CHO suplementado con metotrexato 200 nM y GlutaMAX-I^{MR} 4 mM (sin hipoxantina y timidina). Los matraces agitadores que desarrollan los subclones se expandieron, y las células se archivaron por congelación.

Cuatro sub-clones, 9E12-3D3 y 7G9-2F2, 7G9-3F1 y 7G9-5F2, demuestran la rápida expansión celular temprana (tiempos dobles más cortos) en los matraces agitadores pequeños para mayor que 7 pasajes se expandieron para inoculación de Biorreactores controlados 4 x 10 L para la expresión comparativa y los estudios de producción. Los cuatro sub-clones también se expandieron y se hicieron pasar continuamente en matraces agitadores de IL que contienen un medio CD-CHO suplementado con metotrexato 200 nM y GlutaMAX-I^{MR} 4 mM. La densidad y viabilidad celular se midieron cada dos días, con retenciones sin células almacenados a 4°C para la evaluación posterior de la actividad enzimática.

Tabla 7b.

Clon Primario	**Sub-clones de**	**Sub-clones de**

	metotrexato 50nM	**metotrexato 200nM**
IC5	IC5-3	3-2F2
IC5	IC5-3	3-IF2
2F2	2F2-7	7-5F3
4F4	4F4-4	4-3C3
4F4	4F4-4	4-4B3
7G9	7G9-2	2-2F2
7G9	7G9-2	2-3F1
7G9	7G9-2	2-5F2
9E12	9E12-1	1-3D3
9E12	9E12-1	1-1C2

4. Clonación e identificación de las células en metotrexato 1000 nM

Los 9E12-1-3D3 y 1C5-3-2F2 se sub-clonaron una tercera vez en metotrexato 1000 nM que contiene en medio el 1 de Julio del 2008. Cinco, placas de cultivo de tejido d fondo redondo de 96 pocillos se ajustaron usando la estrategia de dilución infinita bi-dimensional para cada uno de los dos sub-clones. Los sub-clones diluidos se desarrollaron en un fondo de 500 células DG44 no transfectadas por pocillo a 37°C, CO_2 al 5% en una incubadora humidificada, medio CD-CHO que contiene metotrexato 1000 nM y GlutaMAX-I^{MR} 4 mM (sin hipoxantina y timidina).

Los pocillos que contienen los sub-clones que se desarrollan en metotrexato 1000 nM se identificaron mediante examen visual y microscópico. Veinte pocillos que contienen las células en desarrollo diluidas de los sub-clones 9E12-1-3D3 y 1C5-3-2F2 (10 subclones por pocillo) luego se sometieron a ensayo para la expresión de rHuCat-L mediante la técnica Western Blot. Todos los 20 sub-clones se expandieron a placas de cultivo de tejido de 12 pocillos en un medio CD-CHO que contiene metotrexato 1000 nM y GlutaMAX-I^{MR} 4 mM (sin

hipoxantina y timidina) y se incubaron a 37°C, CO_2 al 5% en una incubadora humidificada. La Tabla 7c expone los 20 subclones, y los sub-clones de los cuales se derivaron. Los clones son capaces de desarrollarse en metotrexato 1000 nM luego se expanden y se someten a ensayo para la actividad enzimática de Cat-L, y se archivan por congelación en nitrógeno líquido.

Tabla 7c.

Clon Primario	**Sub-clones de metotrexato 50 nM**	**Sub-clones de metotrexato 200 nM**	**Sub-clones de metotrexato 1000 nM**
9E12	9E12-1	1-3D3	1F5
9E12	9E12-1	1-3D3	1E2
9E12	9E12-1	1-3D3	2D4
9E12	9E12-1	1-3D3	2G8
9E12	9E12-1	1-3D3	3E3
9E12	9E12-1	1-3D3	3G2
9E12	9E12-1	1-3D3	4D4
9E12	9E12-1	1-3D3	4F3
9E12	9E12-1	1-3D3	5D2
9E12	9E12-1	1-3D3	5F2
1C5	1C5-3	3-2F5	1D4
1C5	1C5-3	3-2F5	1G2
1C5	1C5-3	3-2F5	2E2
1C5	1C5-3	3-2F5	2E3
1C5	1C5-3	3-2F5	3D6
1C5	1C5-3	3-2F5	3G3
1C5	1C5-3	3-2F5	4E4
1C5	1C5-3	3-2F5	4G2
1C5	1C5-3	3-2F5	5F4
1C5	1C5-3	3-2F5	5G5

B. Producción A Gran Escala y Purificación de la Catepsina L

Para purificar la Catepsina-L sintética en grandes cantidades, el sobrenadante del cultivo de células la pro-Catepsina L desactivada de la línea de células 9E12-1-3D3

00312

producida como se describe anteriormente, se cultivo en biorreactor 36 L. Después de la incubación en el biorreactor, el cultivo de células se clarificó por filtros de cosecha, se concentraron y se intercambiaron con solución amortiguadora usando la filtración de flujo tangencial, se inactivaron de virus mediante solvente/detergente, y luego se purificaron por cromatografía secuencial en una cromatografía de intercambio aniónico Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) y cromatografía de Hidroxiapatita de Cerámica (Biorad, Richmond, CA). Después del tratamiento el pH reducido (pH 4.5), la Catepsina-L activada se purificó adicionalmente por la cromatografía de intercambio catiónico SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), filtración viral y filtración de flujo tangencial.

La línea de células 9E12-1-3D3 primero se expandió en una serie de matraces. Brevemente, 35 mL de cultivo en el pasaje 6, con 6 x 10^5 células/mL y una viabilidad de 73% se expandió a 200 mL con el CD CHO (Invitrogen) suplementado con 40 mL/L GlutaMAX-I^{MR} (Invitrogen; solución madre 200 mM) y metotrexato 200 nM. A cuatro días, se expandió a 1200 mL en una centrífuga de rocío 6L usando el medio CD CHO suplementado con 40 mL/L GlutaMAX-I^{MR}. En la centrífuga de 6L, el cultivo luego se expandió a 2200 mL en el día 11, a 3500 mL en el día 15, y finalmente a 5000 mL en el día 18, cada vez usando el medio CD CHO media suplementado con 40 mL/L GlutaMAX-I^{MR}.

El biorreactor de 36 L, que contiene 20 L de medio CD CHO suplementado con 800 mL de GlutaMAX-I^{MR}, 100 mg de insulina humana recombinante (rHulnsulina), y 30 mL de Gentamicina, se inocularon con una densidad de siembra inicial de 4.6 x 10^5

células/mL. Para proporcionar un mezclado suave y un vórtice ligero en el cultivo, el punto de ajuste de agitación fue de 80 RPM, el punto de ajuste de la temperatura fue 37°C, el punto de ajuste del pH fue pH 7.15, y el punto de ajuste del oxígeno disuelto fue de 25%. El recipiente del biorreactor recibió una superposición de aire filtrado y un rocío aire/oxígeno/CO_2, como es controlado por un controlador ADI 1030 de Applikon. Un rocío de aire constante de 0.1-0.2 slpm se proporcionó, con la válvula de solenoide O_2 como una un esclavo para el controlador DO, tal que el flujo de O_2 suplementó automáticamente el rocío de aire constante como sea necesario.

Durante la corrida del biorreactor, el cultivo se suplementó con el medio de alimentación en varios intervalos para suplementar nutrientes y glucosa por toda la corrida del biorreactor, así como también para proporcionar un concentrado para el medio basal adicional y GlutaMAX-I^{MR} en la fase de crecimiento, temprana de la células, a fin de maximizar la velocidad del crecimiento y la densidad celular pico. La digestión de proteína adicional (Ultrafiltrado de Yeastolate 50x (200g/L); Invitrogen) y butirato de sodio se agregaron en la fase producción, posterior de la corrida del biorreactor maximizan la expresión y secreción del producto. El medio de alimentación se filtró estéril en el biorreactor por la vía de una bomba peristáltica. En los días 7, 10, 12, 13, 14 y 16, 500 mL de Alimentación #1-6, respectivamente, se agregaron al cultivo de células del biorreactor. La Alimentación #1 y la Alimentación #2 contuvieron 48.6 g/L de polvo del medio CHO AGT®, 200 mL/L GlutaMAX-I^{MR}

(concentración final 8 mM), 200 mL/L Ultrafiltrado de Yeastolate 50x (concentración final 8 g/L), 50 g de D-Glucosa (Dextrosa; Invitrogen), y 1.1 g de butirato de sodio. La alimentación #3 hasta la Alimentación #6 contuvieron 48.6 g/L de polvo de medio CD CHO AGT®, 100 mL/L de GlutaMAX-I^{MR} (concentración final 4 mM), 300 mL/L Ultrafiltrado de Yeastolate 50x (concentración final 12 g/L), 40 g de D-Glucosa (Dextrosa; Invitrogen), y 1.6 g de butirato de sodio. El cultivo de células se mostró antes de cada alimentación y antes de la cosecha (días 19) para probar la densidad viable (VCD) y % de viabilidad mediante el hemocitómetro con la tinción de Azul Trypan, y la glucosa residual. La Tabla 8 expone los resultados de la prueba.

Tabla 7d.

Horas después de la inoculación	**VCD x 10^5 células/mL**	**% de viavilidad**	**Volumen del cultivo de células (L)**	**Glucosa**	**Alimentación**
0	4.6	87	26	8280	
72	16.3	93	26	4690	
115	37.6	93	26	4230	
165	43.1	83	26	1830	Alimentación #1
234	45.7	78	26.5	1040	Alimentación #2
264	49.7	78	27	1320	
287	42.2	78	27	800	Alimentación #3
312	39.8	74	27.5	1180	Alimentación #4
336	39.1	73	27.5	1390	Alimentación #5

386	28.3	58	28	1360	Alimentación #6
409	24.5	50	28.5	1810	
432	20.5	36	28.5	1530	
448	18.9	31	28.5	1190	Cosecha

El biorreactor se cosechó en el día 19, y el cultivo de células (aproximadamente 28.5 L) se clarificó mediante filtración para revemos las células y restos de células. La remoción de las células y la filtración de clarificación consistió de filtros Millipore Pod DOHC (0.5 m^2) y AlHC (0.1 m^2). Los filtros Millipore Pods primero se lavaron con agua para inyección (WFI) seguido por el equilibrio con PBS, antes de que se agregue la cosecha. Después de la clarificación, el cultivo de células cosechado se filtró (HCCF) en bolsas de almacenamiento por la vía de filtros de cápsula pequeña (Sartobran 300, 0.45 µm, Sartorius). El HCCF (31.6 L, que consiste de 28.5 L de sobrenadante de cultivo y 3.1 L de PBS de volumen de lavado) se suplementó para producir Tris 50 mM y se almacenó a 2-8°C.

El HCCF luego se concentró y se diafiltró mediante filtración de flujo tangencial (TFF), que consiste de 4645 x 929 cm^2 (5 x 1 ft^2) de membrana PES con un peso molecular de 30 kDa de corte. La membrana primero se equilibró en Bis-Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.0. Los 31.6 L de HCCF se agregaron al sistema TFF concentrado 10x a 3 L, luego se dialfiltraron con 28 L de Bis-Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.0. El HCCF concentrado se filtró a través de un filtro 0.2 µm, produciendo un volumen final de 3 L. La inactivación viral se efectuó al tratar la cosecha intercambiada con concentrado/solución amortiguadora con Triton X-100 al 1% y fosfato de tri-n-butilo al 0.3%

durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Se preparó una columna de intercambio aniónico de flujo rápido Q Sepharose (GE Healthcare). Después de la sanitización, carga, y neutralización, la columna se equilibró con cinco volúmenes de columna de Bis-Tris 20 mM, pH 7.0. Después de la inactivación viral, la cosecha intercambiada con solución amortiguadora, concentrada se cargó sobre la columna Q usando un tiempo de residencia de cinco minutos para todas las etapas (407 cm/hr). La columna se lavó secuencialmente con cinco volúmenes de Bis-Tris 20 mM, pH 7.0 y cinco volúmenes de columna de Bis-Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7.0. La proteína se eluyó con Bis-Tris 20 mM, NaCl 160 mM, pH 7.0.

Una columna (BioRad) de hidroxiapatita de cerámica (CHT) se equilibró con fosfato de sodio 5 mM, pH 7.0 después de la sanitización, carga, y neutralización. La proteína purificada con Q Sepharose se cargó sobre la columna CHT usando un tiempo de residencia de cinco minutos para todas las etapas (257 cm/hr). La columna se lavó secuencialmente con cinco volúmenes de columna de fosfato de sodio 5 mM, pH 7.0 y cinco volúmenes de columna de fosfato de sodio 10 mM, pH 7.0. La proteína se eluyó con fosfato de sodio 70 mM, pH 7.0.

La pro-catepsina L luego se activó a Catepsina L al ajustar el pH a 4.5 con acetato de sodio 0.5 M, pH 4.0. Después de la activación, la Catepsina L se purificó adicionalmente mediante la cromatografía de Flujo Rápido Sepharose. Una columna de intercambio iónico SP Sepharose (GE Healthcare) se preparó y se equilibró con cinco volúmenes de columna de acetato de sodio 50 mM, pH 4.5 después de la sanitización,

carga, y neutralización. Después de la carga, la Catepsina L activada se diluyó dos veces con acetato de sodio 50 mM, pH 4.5. La Catepsina L activada se cargó sobre la columna SPFF usando un tiempo de residencia de cinco minutos para todas las etapas (253 cm/hr). La columna se lavó con cinco volúmenes de columna de acetato de sodio 50 mM, pH 4.5. La proteína se eluyó con acetato de sodio 50 mM, NaCl 50 mM, pH 5.0. La proteína purificada luego se filtra para remover los virus, y se concentra, tal como entre 1-20 mg/mL.

EJEMPLO 12

Generación de una Línea de Células que expresan PH20 humana recombinante soluble (rHuPH20)

El plásmido HZ24 (expuesto en SEQ ID NO:224) se usó para transfectar células de Ovario de Hámster Chino (células CHO). El ADN que codifica el constructo rHuPH20 soluble contiene un sitio Nhel y una secuencia consenso Kozak antes del And que codifica la metionina en la posición de aminoácidos 1 del líder de señal nativo de la hialuronidasa PH20 humana, y un codón de detención después de del ADN que codifica la tirosina en la posición de aminoácidos 482 de la hialuronidasa PH20 humana, seguido por un sitio de restricción BamHI. El constructo pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ-24), por lo tanto, da por resultado una especie de mRNA individual dirigido por el promotor CMV que codifica los aminoácidos 1-482 de PH20 (expuesta en SEQ ID NO:225) y los aminoácidos 1-187 de la dihidrofolato reductasa (expuesta en SEQ ID NO:261), separada por un sitio de entrada ribosomal interno (IRES).

Las células DG44 CHO no transfectadas se desarrollaron en

medio CD-CHO Modificado GIBCO para las células DHFR(-), suplementadas con 4 mM Glutamax^{MR} y 18 ml de Plurionic F68/L (Gibco), y se sembraron a 0.5 x 10^6 células/ml en un matraz agitador en la preparación para transfección. Las células se desarrollaron a 37°C en CO_2 al 5% en una incubadora humidificada, agitando a 120 rpm. Las células DG44 no transfectadas exponencialmente en crecimiento se sometieron a prueba para viabilidad antes de la transfección.

Sesenta millones de células viables del cultivo de células DG44 CHO no transfectadas se formaron en pelotillas y se resuspendieron a una densidad de 2 ^{x} 10^7 células en 0.7 mL de solución amortiguadora de transfección 2x (HeBS 2x: Hepes 40 mM, pH 7.0, NaCl 274 mM, KCl 10 mM, Na_2HPO_4 1.4 mM, dextrosa 12 mM). A cada alícuota de células resuspendidas, 0.09 mL (250 µg) del plásmido HZ24 lineal (linealizado mediante la digestión durante toda la noche con CIa I (New England Biolabs); plásmido HZ24 lineal expuesto en SEQ ID NO: 19) se agregaron, y las soluciones de célula/ADN se transfirieron en cubetas de electroporación BTX de 0.4 cm de espacio (Gentronics) a temperatura ambiente. Una electroporación de control se realizó con AND no de plásmido mezclado con las células. Las mezclas de células/plásmido se electroporaron con una descarga de capacitor de 330 V y 960 µF o a 350 V y 960 µF.

Las células se removieron de las cubetas después de la electroporación y se transfirieron en 5 mL de medio CD-CHO Modificado para las células DHFR(-), suplementadas con Glutamina 4 mM y 18 ml de Plurionic F68/L (Gibco), y se dejaron desarrollar en un pocillo de una placa de cultivo de tejido de

6 pocillos sin la selección durante 2 días a 37°C en CO_2 al 5% en una incubadora humidificada.

Dos días después de la electroporación, 0.5 mL de medio de cultivo de tejido se removieron de cada pocillo y se sometieron a prueba para la presencia para la actividad de hialuronidasa (véase el Ejemplo 16). Los resultados se exponen en la Tabla 8 a continuación.

	Dilución	Actividad Unidades/ml
Transfección 1	1 a 10	0.25
Transfección 2	1 a 10	0.52
350 V de Control Negativo	1 a 10	0.015

Las células de la Transfección 2 (350V) se recolectaron del pocillo de cultivo de tejido, se contaron y se diluyeron a 1 x 10^4 a 2 x 10^4 de células viables por mL. Una alícuota de 0.1 mL de la suspensión de células se transfirió a cada pocillo de cinco, placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos. Cien microlitos de medio CD-CHO (GIBCO) que contiene suplemento GlutaMAX-I^{MR} 4 mM (GIBCO®, Invitrogen Corporation) y sin suplementos de hipoxantina y timidina se agregaron a los pocillos que contienen células (volumen final 0.2 mL).

Se identificaron diez clones de las 5 placas desarrollados sin metotrexato (véase la Tabla 9).

ID de la Placa /Pocillo	Hialuronidasa relativa
1C3	261
2C2	261
3D3	261
3E5	243
3C6	174
2G8	103

1B9	304
2D9	273
4D10	302

Seis clones HZ24 se expandieron en el cultivo y se transfirieron en matraces agitadores como suspensiones de células individuales. Los clones 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, IE11, y 4D10 se colocaron en placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos usando una estrategia de dilución infinita bi-dimensional en las cuales las células se diluyeron 1:2 debajo de la placa, y 1:3 a través de la placa, comenzando a 5000 células en el pocillo izquierdo superior. Los clones diluidos se desarrollaron en un fondo de 500 células DG44 CHO no transfectadas por pocillo, para proporcionar factores de crecimiento necesarios para los días iniciales en el cultivo. Diez placas se hicieron por subclon, con 5 placas que contienen metotrexato 50 nM y 5 placas sin metotrexato.

El clon 3D3 produjo 24 subclones visuales (13 del tratamiento sin metotrexato, y 11 del tratamiento con metotrexato 50 nM). La actividad de la hialuronidasa significativa se midió en los sobrenadantes de 8 de los 24 subclones (>50 Unidades/mL), y estos 8 subclones se expandieron en matraces de cultivo de tejido T-25 en presencia del metotrexato 50 nM donde fueron apropiados. El clon 3D3 50 nM se expandió adicionalmente en metotrexato 500 nM dando origen a clones que se producen en exceso de 1,000 Unidades/ml en matraces agitadores (clon 3D35M; generación 1 o Genl 3D35M).

Ejemplo 13

Producción y Purificación de Genl sPH20 Humano

000320

A. Proceso de Biorreactor de 5 L

Un frasquito de 3D35M se descongeló y se expandió de los matraces agitadores a través de matraces giratorios de 1 L de medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad Calif.) suplementado con Metotrexato 100 nM y GlutaMAX-I^{MR} (Invitrogen). Las células se transfirieron de los matraces giratorios a un biorreactor de 5 L (Braun) a una densidad de inoculación de 4 x 10^5 células viables por ml. Los parámetros fueron el punto de ajuste de la temperatura a 37°C, pH 7.2 (punto de Ajuste de partida), con el punto de ajuste de Oxigeno Disuelto de 25% y una superposición de aire de 0-100 cc/min. A 168 hrs, se agregaron 250 ml de Medio de Alimentación #1 (CD CHO con 50 g/L de Glucosa). A 216 horas, se agregaron 250 ml de Medio de Alimentación #2 (CD CHO con 50 g/L de Glucosa y Butirato de Sodio 10 mM), y a 264 horas se agregaron 250 ml de Medio de Alimentación #2. Este proceso dio por resultado una productividad final de 1600 Unidades por ml con una densidad celular máxima de 6 x 10^6 células /ml. La adición de butirato de sodio fue para mejorar notablemente la producción del rHuPH20 soluble en las etapas finales de producción.

El medio acondicionado del clon 3D35M se clarificó mediante filtración profunda y diafiltración de flujo tangencial en Hepes 10 mM de pH 7.0. El rHuPH20 soluble luego se purificó mediante cromatografía secuencial sobre cromatografía de intercambio iónico Q Sepharose (Pharmacia), de interacción hidrofóbica Fenil Sepharose (Pharmacia), Cromatografía de boronato de fenilo (Prometics) e Hidroxiapatita (Biorad, Richmond, CA).

El rHuPH20 soluble se enlazó a una columna Q Sepharose y

se eluyó en NaCl 400 mM en las misma solución amortiguadora. El material eluído se diluyó con sulfato de amonio 2M a una concentración final de sulfato de amonio 500 mM y se hizo pasar a través de una columna de Fenil Sepharose (sub baja), seguido al enlazar bajo las mismas condiciones a una resina de boronato de fenilo. El rHuPH20 soluble se eluyó de la resina Phenil sepharose en Hepes de pH 6.9 después del lavado a pH 9.0 en bicina 50 mM sin sulfato de amonio. El material eluído se cargó sobre una resina de hidroxiapatita de cerámica a pH 6.9 en fosfato de potasio 5 mM y $CaCl_2$ 1 mM y se eluyó con fosfato de potasio 80 mM, pH 7.4 con $CaCl_2$ 0.1 mM. El rHuPH20 soluble purificado resultante poseyó una actividad específica en el exceso de 65,000 USP Unidades/mg de proteína por medio del ensayo de microturbiedad (Ejemplo 16) usando el estándar de referencia USP. El sPH20 purificado se eluyó como un pico individual de 24 a 26 minutos de una columna de divinilbenceno estireno 5RPC Pharmacia con un gradiente entre TFA/H_2O y TF A al 0.1%/acetonitrilo al 90%/H_2O al 10% y se resolvió como una banda de 61 kDa de amplitud individual mediante la electroforesis SDS que se redujo a una banda de 51 kDa aguda en el tratamiento con PNGASE-F. La secuenciación de aminoácidos de N-terminal reveló que el péptido líder había sido removido eficientemente.

B. Proceso de Expansión de Cultivo de Células Corriente Arriba en el Cultivo de Células del Biorreactor de 100 L

Un proceso de intensificación se usó para purificar separadamente el rHuPH20 soluble de cuatro frasquitos diferentes de células 3D35M para producir 4 lotes separados de

sHuPH20; HUA0406C, HUA0410C, HUA0415C y HUA0420C. Cada frasquito se expandió y se cultivo separadamente y a través de un biorreactor de 125 L, luego se purificó usando la cromatografía en columna. Las muestras se tomaron por todo el proceso para estimar estos parámetros como el rendimiento de la enzima. La descripción del proceso proporcionado se expone posteriormente en las especificaciones representativas para estas cosas como volúmenes de partida y de alimentación del biorreactor, densidades celulares de transferencia, y volúmenes de lavado y elusión. Los números exactos varían ligeramente con cada lote y son detallados en las Tablas 3 a 10.

Cuatro frasquitos de células 3D35M se descongelaron en un baño de agua a 37°C, se agregó CD CHO que contiene metotrexato 100 nM y 40 mL/L de GlutaMAX^{MR} y las células se centrifugaron. Las células se resuspendieron en un matraz de agitación de 125 mL con 20 mL de medio reciente y se colocaron en una incubadora a 37°C, CO_2 al 7%. Las células se expandieron hasta 40 mL en el matraz de agitación de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 – 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz giratorio de 125 mL en un volumen de cultivo de 100 mL. El matraz se incubó a 37°C, CO_2 al 7%. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz giratorio de 250 mL en 200 mL de volumen de cultivo, y el matraz se incubó a 37°C, CO_2 7%. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz giratorio de 1 L en 800 mL de volumen de cultivo y se incubó a 37°C, CO_2 al 7%. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se

expandió en un matraz giratorio de 6 L en 5 L de volumen de cultivo y se incubó a 37°C, CO_2 al 7%. Cuando la densidad celular alcanzó 1.5 - 2.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz giratorio de 36 L en 20 L de volumen de cultivo y se incubó a 37°C, CO_2 al 7%.

Se esterilizó un reactor de 125 L con vapor a 121°C, 20 PSI y se agregaron 65 L de medio CD CHO. Antes del uso, el reactor se verificó por contaminación. Cuando la densidad celular en los matraces giratorios de 36 L alcanzó 1.8 -2.5 x 10^6 células/mL, 20 L de cultivo de células se transfirieron de los matraces giratorios de 36 L al biorreactor de 125 L (Braun), resultando un volumen final de 85 L y una densidad de siembra de aproximadamente 4 x 10^5 células/mL. Los parámetros fueron punto de ajuste de temperatura, 37°C; pH: 7.2; Oxígeno disuelto: 25% ± 10%; Velocidad del Impulsor 50 rpm; Presión del Recipiente 3 psi; Aspersión de Aire 1 L/ min.; Superposición de Aire: 1 L/min. El reactor se muestreó diariamente para los conteos de células, verificación de pH, análisis del medio, producción y retención de proteínas. Las alimentaciones nutrientes se agregaron durante la corrida. En el Día 6, 3.4 L de Medio de Alimentación #1 (CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 40 mL/L GlutaMAX-I^{MR} se agregaron, y la temperatura de cultivo se cambió a 36.5°C. En el día 9, se agregaron 3.5 L de Alimentación #2 (CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 40 mL/L GlutaMAX-I^{MR} + 1.1 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura del cultivo de cambió a 36°C. En el día 11, se agregaron 3.7 L de Alimentación #3 (CD CHO + 50 g/L de Glucosa + 40 mL/L GlutaMAX-I^{MR} + 1.1 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura de cultivo

se cambió a 35.5°C. El reactor se cosechó a 14 días o cuando la viabilidad de las células cayó por debajo de 50%. El proceso dio por resultado la producción de rHuPH20 soluble con una actividad enzimática de 1600 Unidades/ml con una densidad celular máxima de 8 millones de células/mL. En la cosecha, el cultivo se muestreó para micoplasma, carga microbiana, endotoxina, y virus *in vitro* e *in vivo*, microscopia de electrónica de transmisión (TEM) para las partículas virales, y actividad enzimática.

La cosecha del cultivo de células del bioreactor de cien litros se filtró a través de una serie de filtros de cápsula desechables que tienen un medio de poliéter sulfona (Sartorius): primero a través de una cápsula de 8.0 µm de profundidad, una cápsula de 0.65 µm de profundidad, una cápsula de 0.22 µm, y finalmente a través de un filtro de 2000 cm^2 Sartopore de 0.22 µm y en una bolsa de almacenamiento estéril de 100 L. El cultivo se concentró y 10^x usando dos TFF con filtros MWCO de 30 kDa de with Polietersulfona Espiral (Millipore), seguido por un intercambio de solución amortiguadora 6^x con HEPES 10 mM, Na_2SO_4 25 mM, pH 7.0 en un filtro final de 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. La Tabla 10 proporciona los datos de supervisión relacionados con el cultivo de células, cosecha, concentración y etapas de intercambio de solución amortiguadora.

Tabla 10. Datos de supervisión para el cultivo de células, cosecha, concentración y etapas de intercambio de solución amortiguadora

Parámetro	**HUA0406C**	**HUA04010C**	**HUA0415C**	**HUA0420**

				C
Tiempo de la descongelación para inoculación del bioreactor de 100 L (días)	21	19	17	18
Densidad de inoculación de 100 L (x 10^6 células/mL)	0.45	0.33	0.44	0.46
Tiempo doble del crecimiento logarítmico (hr)	29.8	27.3	29.2	23.5
Densidad celular máxima (x 10^6 células/mL)	5.65	8.70	6.07	9-70
Debilidad de la cosecha (%)	41	48	41	41
Título de la cosecha (U/ml)	1964	1670	991	1319
Tiempo en el bioreactor de 100-L (días)	13	13	12	13
Volumen de cosecha clarificada (mL)	81800	93300	91800	89100
Ensayo de enzimas de cosecha clarificada (U/mL)	2385	1768	1039	1425
Ensayo de enzimas concentradas (U/mL)	22954	17091	8561	17785
Ensayo de enzimas concentradas intercambiadas con solución amortiguadora (U/mL)	15829	11649	9915	8679
Ensayo de enzimas concentradas intercambiadas con	21550	10882	9471	8527

000328

solución amortiguadora filtradas (U/mL)				
Volumen concentrado intercambiado con solución amortiguadora (mL)	10699	13578	12727	10500
Relación de unidades de enzimas concentración/cosecha	0.87	0.96	1.32	1.4

Se preparó una columna de intercambio iónico Q Sepharose (Pharmacia) (3 L de resina, altura = 20 cm, Diámetro = 14 cm). Las muestras lavadas se recolectaron para una determinación del ensayo de pH, conductividad y endotoxina (LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na_2SO_4 20 mM pH 7.5. La cosecha diafiltrada concentrada se cargó en la columna Q a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na_2SO_4 20 mM, pH 7.5 y Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7.0. La proteína se eluyó con Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7.0 y se filtró a través de un filtro final de 0.22 µm en una bolsa estéril.

La cromatografía de interacción hidrofóbica Fenil-Sepharose (Pharmacia) después se realizó. Se preparó una columna Fenil-Sepharose (PS) (9.1 L de resina, Altura = 29 cm, Diámetro = 20 cm). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M, $CaCl_2$ 0.1 mM, pH 7.0. El eluido de proteína de lo anterior se suplementó con sulfato de amonio 2M, sulfato de potasio 1 M y soluciones madre de $CaCl_2$ 1 M a las concentraciones finales de 5 mM, 0.5 M y 0.1 mM, respectivamente. La proteína se cargó sobre la columna PS a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. Se

agregaron fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M y $CaCl_2$ 0.1 mM pH 7.0 a 100 cm/hr. El flujo se hizo pasar a través de un filtro final de 0.22 µm en una bolsa estéril.

La proteína purificada con PS luego se cargó sobre una columna de boronato de aminofenilo (ProMedics) (6.3 L de resina, Altura = 20 cm, Diámetro = 20cm) que había sido equilibrada con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M. La proteína se hizo pasar a través de la columna a una velocidad de flujo de 100 cm/hr, y la columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M, pH 7.0. La columna luego se lavó con bicina 20 mM, NaCl 100 mM, pH 9.0 y la proteína se eluyó con 50 mM Hepes, NaCl 100 mM pH 6.9 a través de un filtro estéril y en una bolsa estéril de 20 L. El eluído se sometió a prueba para la carga microbiana, la concentración de proteínas y la actividad enzimática.

La columna de hidroxiapatita (HAP) (BioRad) (1.6 L de resina, Altura = 10 cm, Diámetro = 14 cm) se equilibró con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM pH 7.0. Las muestras de lavado se recolectaron y se sometieron a prueba para el pH, conductividad y endotoxina (ensayo LAL). La proteína purificada con boronato de aminofenilo se suplementó con fosfato de potasio y $CaCl_2$ para producir concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y $CaCl_2$ 0.1 mM y se cargaron sobre la columna HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM pH 7.0, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM, luego fosfato de potasio 10 mM pH 7.0, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM pH. La proteína se eluyó con fosfato de

potasio 70 mM pH 7.0 y se filtró a través de un filtro de 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril 5 L. El eluído se sometió a prueba para la carga microbiana, la concentración de proteína y la actividad enzimática.

La proteína purificada con HAP luego se bombeo a través de un filtro de remoción viral 20 nM por la vía de un tanque de presión. La proteína se agregó al tanque de presión DV20 y el filtro (Pall Corporation), que pasa a través de un filtro Ultipor DV20 con poros de 20 nm (Pall Corporation) en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. el filtrado se sometió a prueba para la concentración de proteínas, actividad enzimática, y perfiles de oligosacáridos, monosacáridos y ácido siálico, e impurezas relacionadas con el proceso. La proteína en el filtrado luego se concentró a 1 mg/mL usando un sistema (Sartorius) de filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocon Slice (MWCO) de peso molecular de 10 kD de corte. El filtro primero se preparó al lavarlo con Hepes/solución salina (Hepes 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7.0) y el permeado se muestreó para el pH y la conductividad. Después de la concentración, la proteína concentrada se muestreó y se sometió a prueba para la concentración de proteínas y actividad enzimática. Se realizó un intercambio de solución amortiguadora 6^{x} sobre la proteína concentrada en la solución amortiguadora final: Hepes 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7.0. La proteína concentrada se hizo pasar a través de un filtro de 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. La proteína se muestreó y se sometió a prueba para la concentración de proteínas, actividad enzimática, grupos

sulfidrilo libres, perfil de oligosacáridos y osmolaridad.

Las Tablas 11 a 17 proporcionan datos de supervisión relacionados con cada una de las etapas de purificación descritas anteriormente, para cada lote de células 3D35M.

Tabla 11. Datos de la columna Q sepharose

Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen de carga (mL)	10647	13524	12852	20418
Relación de volumen de carga/volumen de resina	3.1	4.9	4.5	7.3
Volumen de Control (nL)	2770	3840	2850	2880
Volumen del Eluato (mL)	6108	5923	5759	6284
Concentración de Proteínas del Eluato (mg/mL)	2.8	3.05	2.80	2.86
Ensayo de Enzimas del Eluato (U/mL)	24493	26683	18321	21052
Rendimiento de la Enzima (%	65	107	87	76

Tabla 12. Datos de la columna de Fenil Sefarosa

Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen antes de la Adición de la solución madre (mL)	5670	5015	5694	6251

000330

Volumen de carga (mL)	7599	6693	7631	8360
Volumen de la Columna (mL)	9106	9420	9340	9420
Relación de Volumen de carga/Volumen de Resina	0.8	0.71	0.82	0.89
Volumen del Eluato (mL)	16144	18010	16960	17328
Concentración de Proteínas del Eluato (mg/mL)	0.4	0.33	0.33	0.38
Ensayo de la Enzima del Eluato (U/mL)	8806	6585	4472	7509
Rendimiento de la Proteína (%)	41	40	36	37
Rendimiento de la Enzima (%)	102	88	82	96

Tabla 13. Datos de la columna de Amino Fenil Boronato

Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen de carga (mL)	16136	17958	16931	17884
Relación de volumen de carga/volumen de resina	2.99	3.15	3.08	2.98
Volumen de la Columna (mL)	5400	5700	5500	5300
Volumen del	17595	22084	20686	19145

Eluato (mL)				
Concentración de Proteínas del Eluato (mg/mL)	0.0	0.03	0.03	0.04
Concentración de Proteínas del Eluato Filtrado (mg/mL)	no sometido a prueba	0.03	0.00	0.04
Ensayo de Enzimas del Eluato (U/mL)	4050	2410	1523	4721
Rendimiento de la Proteína (%)	0	11	11	12
Rendimiento de la Enzima (%)	no determinado	41	40	69

Tabla 14. Datos de la columna de Hidroxiapatita

Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen antes de la Adición de la solución madre (mL)	16345	20799	20640	19103
Relación de Volumen de carga/Volumen de Resina	10.95	13.58	14.19	12.81
Volumen de la Columna (mL)	1500	1540	1462	1500
Volumen de la Carga (mL)	16429	20917	20746	19213
Volumen del Eluato (mL)	4100	2415	1936	2419

000332

Concentración de Proteínas del Eluato (mg/mL)	no sometido a prueba	0.24	0.17	0.23
Concentración de Proteínas del Eluato filtrado (mg/mL)	NA	NA	0.17	NA
Ensayo de la Enzima del Eluato (U/mL)	14051	29089	20424	29826
Rendimiento de la Proteína (%)	No sometido a Prueba	93	53	73
Rendimiento de la Enzima (%)	87	118	140	104

Tabla 15. Datos de filtración DV20

Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen de partida (mL)	4077	2233	1917	2419
Volumen del Filtrado (mL)	4602	3334	2963	3504
Concentración de Proteínas del Filtrado (mg/mL)	0.1	NA	0.09	NA
Concentración de Proteínas del Eluato Filtrado (mg/mL)	NA	0.15	0.09	0.16
Rendimiento de la Proteína (%)	no sometido a prueba	93	82	101

008339

Tabla 16. Datos de la concentración final

Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen de partida (mL)	4575	3298	2963	3492
Volumen del Concentrado (mL)	562	407	237	316
Concentración de Proteínas del Concentrado (mg/mL)	0.9	1.24	1.16	1.73
Rendimiento de la Proteína (%)	111	102	103	98

Tabla 17. Datos del Intercambio con Solución Amortiguadora en la Formulación Final

Parámetro	**HUA0406C**	**HUA0410C**	**HUA0415C**	**HUA0420C**
Volumen de partida (mL)	562	407	237	316
Concentrado Intercambiado con Solución Amortiguadora de Volumen Final (mL)	594	516	310	554
Concentración de Proteínas del Concentrado (mg/mL)	1.00	0.97	0.98	1.00
Concentración de Proteínas del	0.95	0.92	0.95	1.02

Concentrado Filtrado (mg/mL)				
Rendimiento de la Proteína (%)	118	99	110	101

La proteína rHuPH20 soluble purificada y concentrada se llenó asépticamente en vasitos estériles con 5 mL y 1 mL de volúmenes de llenado. La proteína se hizo pasar a través de un filtro de 0.22 µm a una bomba controlada por un operador que se usó para llenar los frasquitos usando una lectura gravimétrica. Los frasquitos se cerraron con tapones y se aseguraron con tapas engarzadas. Los frasquitos cerrados se inspeccionaron visualmente para partículas extrañas y luego se etiquetaron. Después del etiquetado, los frasquitos se congelaron instantáneamente mediante la inmersión en nitrógeno líquido por no más de 1 minuto y se almacenaron a <15°C (-20 ± 5°C).

EJEMPLO 14

Producción de PH20 humano soluble que contiene células gen2 (rHuPH20)

La línea de células 3D35M Gen1 descrita en el Ejemplo 12 se adaptó a niveles de metotrexato más altos para producir clones de generación 2 (Gen2). Las células 3D35M se seleccionaron de cultivos que contienen metotrexato establecido en el medio CD CHO que contiene GlutaMAX-I^{MR} 4 mM y metotrexato 1.0 µM. Las células se adaptaron a un nivel de metotrexato más alto a desarrollarlas y al pasarlas 9 veces durante un período de 46 días en una incubadora humidificada a 37°C, CO_2 al 7%. La población amplificada de células se clonó al limitar la dilución en las placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que

contienen el medio con metotrexato 2.0 µM. Después de aproximadamente 4 semanas, los clones se identificaron y el clon 3E10B se seleccionó para expansión. Las células 3E10B se desarrollaron en el medio CD CHO que contiene GlutaMAX-I^{MR} 4 mM y metotrexato 2.0 µM durante 20 pasajes. Un banco de células maestro (MCB) de la línea de células 3E10B se creó y se congeló y se usó para estudios subsecuentes. La amplificación de la línea de células continuó al cultivar las células 3E10B en el medio CD CHO que contiene GlutaMAX-I^{MR} 4 mM y metotrexato 4.0 µM. Después de la 12^{a} pasada, las células se congelaron en frasquitos como un banco de células de investigación (RCB). Un frasquito de RCB se descongeló y se cultivó en el medio que contiene metotrexato 8.0 µM. Después de 5 días, la concentración de metotrexato en el medio se incrementó a 16.0 µM, luego 20.0 µM 18 días después. Las células de la 8^{a} pasada en el medio que contiene metotrexato 20.0 µM se clonó al limitar la dilución en las placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contiene el medio CD CHO que contiene GlutaMAX-I^{MR} 4 mM y metotrexato 20.0 µM. Los clones se identificaron 5-6 semanas después y el clon 2B2 se seleccionó para expansión en el medio que contiene metotrexato 20.0 µM. Después de la 11^{a} pasada, las células 2B2 se congelaron en frasquitos como un banco de células de investigación (RCB).

Las células 2B2 resultantes son células DG44 CHO deficientes de dihidrofolato reductasa (dhfr-) que expresan el PH20 humano recombinante soluble (rHuPH20). El PH20 soluble está presente en las células 2B2 en un número de copias de aproximadamente 206 copias/célula. El análisis de southern blot

del ADN de células 2B2 genómicas digeridas por Spe I-, Xba I- y BamH I/Hind III usando una sonda específica de rHuPH20 reveló el siguiente perfil de digestión de restricción: una banda de hibridación mayor de -7.7 kb y cuatro bandas de hibridación menores (-13.9, -6.6, -5.7 y -4.6 kb) con ADN digerido con Spe I; una banda de hibridación mayor de -5.0 kb y dos bandas de hibridación menor (-13.9 y -6.5 kb) con ADN digerido con Xba I; y una banda de hibridación individual de -1.4 kb observó usando el ADN 2B2 digerido con BamH I/Hind III.

Ejemplo 15

A. Producción del rHuPH20 soluble Gen2 en el Cultivo de Células de Bioreactor de 300 L

Un frasquito de HZ24-2B2 se descongeló y se expandió de los matraces agitadores a través de los matraces giratorios de 36L en el medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con metotrexato 20 µM y GlutaMAX-I^{MR} (Invitrogen). Brevemente, el frasquito de células se descongeló en un baño de agua a 37°C, el medio se agregó y las células se centrifugaron. Las células se resuspendieron en un matraz de agitación de 125 mL con 20 mL de medio reciente y se colocó en una incubadora a 37°C, CO_2 al 7%. Las células se expandieron hasta 40 mL en el matraz de agitación de 125 mL. Cuando la densidad celular alcanzó mayor que 1.5 x 10^6 células /mL, el cultivo se expandió en un matraz giratorio y de 125 mL en 100 mL de un volumen de cultivo. El matraz se incubó a 37°C, CO_2 al 7%. Cuando la densidad celular alcanzó mayor que 1.5 x 10^6 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz giratorio de 250 mL en 200 mL de volumen de cultivo, y el matraz se incubó a 37°C, CO_2 al 7%.

Cuando la densidad celular alcanzó mayor que 1.5 x 10 células/mL, el cultivo se expandió en un matraz giratorio de 1 L en 800 mL de volumen de cultivo y se incubó a 37°C, CO_2 al 7%. Cuando la densidad celular alcanzó mayor que 1.5 x 10^6 células/mL el cultivo se expandió en un matraz giratorio de 6 L en 5000 mL de volumen de cultivo y se incubó a 37°C, CO_2 al 7%. Cuando la densidad celular alcanzó mayor que 1.5 x 106 células/mL el cultivo se expandió en un matraz giratorio de 36 L en 32 L de volumen de cultivo y se incubó a 37°C, CO_2 al 7%.

Un reactor de 400 L se esterilizó y se agregaron 230 mL de medio CD-CHO. Antes del uso, el reactor se verificó por contaminación. Aproximadamente 30 L de células se transfirieron de los matraces giratorios de 36L al bioreactor de 400 L (Braun) a una densidad de inoculación de 4.0 x 10^5 de células viables por ml y un volumen total de 260L. Los parámetros fueron el punto de ajuste de temperatura, 37°C; Velocidad del Impulsor 40-55 RPM; Presión del Recipiente: 3 psi; Aspersión de Aire 0.5-1.5 L/Min.; Superposición de Aire: 3 L/ minutos. El reactor se muestreó diariamente para los conteos de células, verificación de pH, análisis del medio, producción de proteínas y retención. También, durante la corrida se agregaron alimentaciones de nutrientes. A 120 horas (día 5), se agregaron 10.4 L del Medio de Alimentación #1 (4^x CD-CHO + 33 g/L de Glucosa + 160 mL/L de GlutaMAX-I^{MR} + 83 mL/L de Yeastolate + 33 mg/L de rHulnsulin). A 168 horas (día 7), se agregaron 10.8 L de Alimentación #2 (2^x CD-CHO + 33 g/L de Glucosa + 80 mL/L de GlutaMAX-I^{MR} + 167 mL/L de Yeastolate + 0.92 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura del cultivo se cambió a 36.5°C. A 216

horas (día 9), se agregaron 10.8 L de Alimentación #3 (1 x CD-CHO + 50 g/L de Glucosa + 50 mL/L de GlutaMAX-I^{MR} + 250 mL/L de Yeastolate + 1.80 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura del cultivo se cambió a 36°C. A 264 horas (día 11), se agregaron 10.8 L de Alimentación #4 (1 x CD-CHO + 33 g/L de Glucosa + 33 mL/L de GlutaMAX-I^{MR} + 250 mL/L de Yeastolate + 0.92 g/L de Butirato de Sodio), y la temperatura de cultivo se cambio a 35.5° C. La adición del medio de alimentación se observó para mejorar notablemente la producción de rHuPH20 soluble en las etapas finales de la producción. El reactor se cosechó a 14 o 15 días o cuando la viabilidad de las células cayó abajo de 40%. El proceso dio por resultado una productividad final de 17,000 Unidades por ml con una densidad celular máxima de 12 millones células/mL. En la cosecha, el cultivo se muestreó para micoplasma, carga microbiana, endotoxina y Microscopio Electrónico de transmisión *in vitro* e *in vivo* viral (TEM) y actividad enzimática.

El cultivo se bombeó por una bomba peristáltica a través de cuatro módulos de sistema de filtración Millistak (Millipore) en paralelo, que contiene cada uno una capa de tierra diatomácea graduada a 4-8 µm y una capa de tierra diatomácea graduada a 1.4-1.1 µm, seguido por una membrana de celulosa, luego a través de un segundo sistema de filtración Millistak individual (Millipore) que contiene una capa de tierra diatomácea graduada a 0.4-0.11 µm y una capa de tierra diatomácea graduad a <0.1 µm, seguido por una membrana de celulosa, y luego a través de un filtro final de 0.22 µm en una bolsa flexible de uso individual estéril con una capacidad de

350 L. El fluido del cultivo de células cosechadas se suplementó con EDTA 10 mM y Tris 10 mM a un pH de 7.5. El cultivo se concentró 10^x con un aparto de filtración de flujo tangencial (TFF) usando cuatro filtros de poliétersulfona (PES) de peso molecular de 30 kDa de corte (MWCO) Sartoslice (Sartorious), seguido por un intercambio de solución reguladora 10^x con Tris 10 mM, Na_2SO_4 20 mM, pH 7.5 en un filtro final de 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 50 L.

La cosecha concentrada, diafiltrada se inactivó para el virus. Antes de la inactivación viral, se preparó una solución de Triton X-100 al 10%, tri (n-butil)-fosfato al 3% (TNBP). La cosecha concentrada, diafiltrada se expuso al Triton X-100 al 1%, TNBP al 0.3% durante 1 hora en un recipiente de reacción de vidrio de 36 L inmediatamente antes de la purificación sobre la columna Q.

B. Purificación de rHuPH20 soluble Gen2

Se preparó una columna de intercambio iónico Q Sepharose (Pharmacia) (9 L de resina, H= 29 cm, D= 20 cm). Las muestras de lavado se recolectaron para una determinación del pH, ensayo de conductividad y endotoxina (LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na2SO4 20 mM, pH 7.5. Después de la inactivación viral, la cosecha concentrada, diafiltrada se cargó sobre la columna Q a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Na2SO4 20 mM, pH 7.5 y Hepes 10 mM, NaCl 50 mM, pH7.0. La proteína se eluyó con Hepes 10 mM, NaCl 400 mM, pH 7.0 en un filtro final de 0.22 µm en una bolsa estéril. La muestra eluída se sometió a prueba para la carga microbiana.

la concentración de proteínas y la actividad de la hialuronidasa. La lectura de absorbencia A_{280} se tomó en el inicio y al final del intercambio.

La cromatografía de interacción hidrofóbica Fenil-Sepharose (Pharmacia) se realizó después. Se preparó una columna de Fenil-Speharose (PS) (19-21 L de resina, H=29 cm, D= 30 cm). El lavado se recolectó y se muestreó para pH, la conductividad y endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M, CaCl2 0.1 mM, pH 7.0. El eluido de proteínas de la columna de Q sepharose se suplementó con sulfato de amonio 2M, fosfato de potasio 1 M y soluciones madre de $CaCl_2$ 1 M para producir las concentraciones finales de 5 mM, 0.5 M y 0.1 mM, respectivamente. La proteína se cargó sobre la columna PS a una velocidad de flujo de 100 cm/hr y el flujo de columna a través del recolectado. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M y CaC12 0.1 mM pH 7.0 a 100 cm/hr y el lavado se agregó al flujo recolectado. Combinado con el lavado de columna, el flujo se hizo pasar a través de un filtro final de 0.22 µm en una bolsa estéril. El flujo se muestreó para carga microbiana, concentración de proteína y actividad enzimática.

Se preparó una columna de boronato de aminofenilo (Promtics). El lavado se recolectó y se muestreó para pH, conductividad y endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M. El flujo PS que contiene la proteína purificada se cargó sobre la columna de boronato de

aminofenilo a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, sulfato de amonio 0.5 M, pH 7.0. La columna se lavó con bicina 20 mM, sulfato de amonio 0.5 M, pH 9.0. La columna se lavó con bicina 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 9.0. La proteína se eluyó con Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6.9 y se hizo pasar a través de un filtro estéril en una bolsa estéril. La muestra eluída se sometió a prueba para la carga microbiana, concentración de proteínas y actividad enzimática.

Se preparó la columna de hidroxiapatita (HAP) (Biorad). El lavado se recolectó y se sometió a prueba para pH, conductividad y endotoxina (ensayo LAL). La columna se equilibró con fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM, pH 7.0. La proteína purificada con boronato de aminofenilo se suplementó a las concentraciones finales de fosfato de potasio 5 mM y $CaCl_2$ 0.1 mM y se cargó sobre la columna HAP a una velocidad de flujo de 100 cm/hr. La columna se lavó con fosfato de potasio 5 mM, pH 7, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM. La columna luego se lavó con fosfato de potasio 10 mM, pH 7, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM. La proteína se eluyó con fosfato de potasio 70 mM, pH 7.0 y se hizo pasar a través de un filtro estéril de 0.22 µm en una bolsa estéril. La muestra eluída se sometió a prueba para carga microbiana, concentración de proteínas y actividad enzimática.

La proteína purificada HAP luego se hizo pasar a través de un filtro de remoción viral. El filtro Viosart esterilizado (Sartorius) primero se preparó al lavar con 2 L de fosfato de potasio 70 mM, pH 7.0. Antes del uso, la solución amortiguada

filtrada se muestreó para pH y conductividad. La proteína purificada con HAP se bombeó por la vía de una bomba peristática a través del filtro de remoción viral de 20 nM. La proteína filtrada en fosfato de potasio 70 mM, pH 7.0 se hizo pasar a través de un filtro final de 0.22 µm en una bolsa estéril. La muestra filtrada viral se sometió a prueba para la concentración de proteínas, actividad enzimática, perfil de oligosacáridos, monosacáridos y ácido sialico. La muestra también se sometió a prueba para impurezas relacionadas con el proceso.

La proteína en el filtrado luego se concentró a 10 mg/mL usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) Sartocon Slice (MWCO) de peso molecular de 10 kD de corte (Sartorius). El filtro primero se preparó al lavarlo con histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6.0 y el permeado se muestreó para pH y conductividad. Después de la concentración, la proteína concentrada se muestreó y es sometió a prueba para la concentración de proteínas y actividad enzimática. Se realizó un intercambio de solución amortiguadora 6^{x} sobre la proteína concentrada en la solución amortiguadora final: histidina 10 mM, NaCl 130 mM, pH 6.0. Después del intercambio de solución amortiguadora, la proteína concentrada se hizo pasar a través de un filtro de 0.22 µm en una bolsa de almacenamiento estéril de 20 L. La proteína se muestreó y se sometió a prueba la concentración de proteínas, actividad enzimática, grupos de sulfidrilo libres, perfil de oligosacáridos y osmolaridad.

La proteína de volumen filtrada estéril luego se dispensó asépticamente en 20 mL en frasquitos Teflón 30 mL (Nalgene).

Los frasquitos luego se congelaron instantáneamente y se almacenaron a - 20 ± 5°C.

C. Comparación de la producción y purificación del rHuPH20 soluble Gen 1 y rHuPH20 soluble Gen 2.

La producción y purificación de rHuPH20 soluble Gen2 en un cultivo de células de bioreactor 300L contuvo algunos cambios en los protocolos comparados con la producción y purificación del rHuPH20 Gen 1 en un cultivo de células del bioreactor de 100L (descrito en el Ejemplo 13.B). La Tabla 18 expone diferencias ejemplares, además de los cambios de intensificación simples, entre los métodos.

Tabla 18

Diferencia del Proceso	**rHuPH20 soluble Gen 1**	**rHuPH20 soluble Gen 2**
Línea de Células	3D35M	2B2
Medio usado para expandir el inoculo de células	Contiene metotrexato 0.10 µm (0.045 mg/L)	Contiene metotrexato 20 µm (9 mg/L)
Medio en cultivos de 6 L hacia afuera	Contiene metotrexato 0.10 µm	No contiene metotrexato
Agitador giratorio de 36 L	Si instrumentación Volumen de operación de 10 L	Equipado con instrumentación que supervisa y controla el pH, oxígeno disuelto, aspersión y velocidad de flujo de gas traslapante. Volumen de operación de 32 L
Volumen de operación final en	Aproximadamente 100 L en un biorreactor	Aproximadamente 300 L en un biorreactor

el biorreactor	de 125 L (volumen de cultivo inicial + 65 L)	de 400 L (volumen de cultivo inicial + 260 L)
Medio de cultivo en el biorreactor final	Sin rHulnsulin	5.0 mg/L de rHulnsulin
Volumen de alimentación del medio	Aumentado a 4% del volumen de cultivo de células del biorreactor es decir 3.4, 3.5 y 3.7 L, dando por resultado un volumen de biorreactor objetivo de ~92 L	Aumentado a 4% del volumen de cultivo de células del biorreactor es decir 10.4, 10.8 y 1.7 L, dando por resultado un volumen de biorreactor objetivo de ~303 L
Alimentación del medio	Medio de alimentación #1: CD CHO + 50 g/L de Glucosa + GlutaMAX-1^{MR} 8mM Alimentación #2 (CD CHO + 50 g/L de Glucosa + GlutaMax^{MR} 8 mM + 1.1 g/L de Butirato de sodio Alimentación #3: CD CHO + 50 g/L de Glucosa + GlutaMax^{MR} 8mM + 1.1 g/L de Butirato de sodio	Medio de alimentación 31: 4x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + GlutaMAX^{MR} 33mM + 16.6 g/L Yastolate + 33 mg/L rHulnsulin Alimentación #2; 2x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + GlutaMAX^{MR} 16 mM+ 33.4 g/L de Yastolate + 0.92 g/L de Butirato de sodio Alimentación #3: 1x CD CHO + 50 g/L de Glucosa + GlutaMAX^{MR} 10 mM + 50 g/L de Yastolate

		+ 1.80 g/L de Butirato de sodio Alimentación #4: 1x CD CHO + 33 g/L de Glucosa + GlutaMAX^{MR} 6.6 mM + 50 g/L de Yastolate + 0.92 g/L de Butirato de sodio
Filtración del cultivo de células del biorreactor	Cuatro filtros de poliétersulfona (8.1 µm, 0.65 µm, 0.22 µm y 0.22 µm) en serie Bolsa de almacenamiento de 100 L	1ª etapa - Cuatro módulos en paralelo, cada uno con una capa de tierra diatomácea graduada de 4-8 µm y una capa de tierra diatomácea graduada a 1.4 - 1.1 µm, seguido por una membrana de celulosa. 2ª etapa - Un módulo que contiene una capa de tierra diatomácea graduada a 0.4 - 0.11 µm y una capa de tierra diatomácea graduada a < 0.1 µm, seguido por una membrana de celulosa. 3ª etapa - filtro de poliétersulfona de 0.22 µm Bolsa de almacenamiento de

		300 L El cultivo de células cosechado se suplementa con EDTA 10 mM, Tris 10 mM a un pH de 7.5
Concentración e intercambio con solución amortiguadora antes de la cromatografía	Concentrado con 2 TFF con filtro MWCO de 30 K de poliétersulfona espiral Millipore Intercambiar con solución amortiguadora el concentrado 6x con Hepes 10 mM, NaCl 20 mM, pH 7.0 Bolsa de almacenamiento estéril de 20 L	Concentrado usando cuatro filtros MWCO de 30 K Sartorius Sartoslice TFF Intercambiar con solución amortiguadora el concentrado 10x con Tris 10 mM, Na2SO2 20 mM, pH 7.5 Bolsa de almacenamiento estéril de 50 L
Inactivación viral antes de la cromatografía	Ninguno	Inactivación viral realizada con la adición de un Triton x-100 al 1%, fosfato de tributilo al 0.3%, pH 7.5
1ª etapa de purificación (Q Sepharose)	Sin lectura de absorbencia	Mediciones A280 al inicio y al final
Filtración viral después de la cromatografía	Filtro PALL DV-20 (20 mM)	Filtro Sartorius Virosart (20 mM)
Concentración e intercambio con solución amortiguadora	Solución amortiguadora Hepes/solución salina pH 7.0	Solución amortiguadora histidina/solución salina, pH 6.0

después de la cromatografía	Proteína concentrada a 1 mg/ml	Proteína concentrada a 10 mg/ml

Ejemplo 16

Determinación de la actividad de la hialuronidasa del rHuPH20 soluble

La actividad de la hialuronidasa del rHuPH20 soluble en las muestras tales como cultivos de células, fracciones de purificación y soluciones purificadas se determinó usando un ensayo turbidométrico, el cual se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el ácido hialurónico se enlaza con el albúmina de suero. La actividad se mide al incubar rHuPH20 soluble con hialuronato de sodio (ácido hialurónico) durante un período de ajuste de tiempo (10 minutos) y luego al precipitar el hialuronato de sodio no digerido con la adición de albúmina de suero ácida. La turbiedad de la muestra resultante se mide a 640 nm después de un período de desarrollo de 30 minutos. La disminución en la turbiedad que resulta de la actividad enzimática en el substrato de hialuronato de sodio es una medición de la actividad enzimática de rHuPH20 soluble. El método se corre usando una curva de calibración generada con diluciones de un estándar de referencia de trabajo de ensayo rHuPH20 soluble, y se hacen mediciones de actividad de muestra relativas con esta curva de calibración.

Las diluciones de la muestra se prepararon en soluciones diluyentes de enzimas. La solución diluyente de enzima se preparó al disolver 33.0 ± 0.05 mg de gelatina hidrolizada en 25.0 mL de solución amortiguadora de reacción PIPES 50 mM (NaCl 140 mM, PIPES 50 mM, pH 5.5) y 25.0 mL de SWFI, y al diluir 0.2

mL de solución de Buminato al 25% en la mezcla y por movimiento vorticial durante 30 segundos. Esto se realizó dentro de 2 horas de uso y se almacenó sobre hielo hasta que se requirió. Las muestras se diluyeron a un estimado de 1-2 U/mL. Generalmente, la dilución máxima por etapa no excedió 1:100 y el tamaño de muestra inicial para la primera dilución no fue menor que 20 µL. Los volúmenes de muestra mínimos necesarios para realizar el ensayo fueron: Muestras en Proceso, Fracciones FPLC: 80 µL; Sobrenadantes de Cultivo de tejido: 1 mL; Material Concentrado 80 µL; Material de etapa Purificada o Final: 80 µL. Las diluciones se hicieron en triplicado en una placa de 96 pocillos de enlace de proteína baja, y 30 µL de cada dilución se transfirió a placas de fondo negro/claro Optilux (BD BioSciences).

Las diluciones de rHuPH20 soluble conocido con una concentración de 2.5 U/mL se prepararon en solución diluyente de enzimas para generar una curva estándar y se agregaron a la placa Optilux en triplicado. Las diluciones incluyeron 0 U/mL, 0.25 U/mL, 0.5 U/mL, 1.0 U/mL, 1.5 U/mL, 2.0 U/mL y 2.5 U/mL. Los pocillos "vacíos de reactivo" que contuvieron 60 µL de Solución Diluyente de Enzima se incluyeron en la placa como un control negativo. La placa luego se cubrió y se calentó sobre un bloque de calor durante 5 minutos a 37°C. La cubierta se removió y la placa se agitó durante 10 segundos. Después de la agitación, la placa se regresó al bloque de calor y el dispositivo de Manejo de Líquido MULTIDROP 384 se preparó con 0.25 mg/mL de solución de hialuronato de sodio (preparada al disolver 100 mg de hialuronato de sodio (LifeCore Biomedical)

en 20.0 mL de SWFI. Esta se mezcló al hacer girar suavemente y/o al balancearse a 2-8°C durante 2-4 horas, o hasta que se disolvió completamente). La placa de reacción se transfirió al MULTIDROP 384 y la reacción se inició al presionar la tecla de inicio para dispensar 30 µL de hialuronato de sodio en cada pocillo. La placa luego se removió del MULTIDROP 384 y se agitó durante 10 segundos antes de ser transferido a un bloque de calor con la cubierta de la placa reemplazada. La placa se incubó a 37°C durante 10 minutos.

El MULTIDROP 384 se preparó para retener la reacción al preparar la máquina con solución de trabajo de suero y al cambiar el ajuste del volumen a 240 µL. (25 mL de solución madre en suero [1 volumen de Suero de Caballo (Sigma) se diluyó con 9 volúmenes de Solución Amortiguadora de Acetato 500 mM y el pH se ajustó a 3.1 con ácido clorhídrico] en 75 mL de Solución Amortiguadora de Acetato 500 mM). La placa se removió del bloque de calor y se colocó sobre el MULTIDROP 384 y 240 µL de las Soluciones de Trabajo de suero se dispensaron en los pocillos. La placa se removió y se agitó sobre un lector de placas durante 10 segundos. Después de 15 minutos adicionales, la turbiedad de las muestras se midió a 640 nm y la actividad enzimática (en U/mL) de cada muestra se determinó al ajustarse a la curva estándar.

Se calculó la actividad específica (U/mg) al dividir la actividad enzimática (U/ml) por la concentración de proteínas (mg/mL).

EJEMPLO 17

Catepsina-L Corta los Septos Fibrosos en el Espacio Subcutáneo

de las Ratas Zucker

Ratas Zucker se trataron mediante la administración de 90 µg/ml de catepsina-L en solución amortiguadora MES, pH 5.3 e histología realizada sobre secciones de la piel para visualizar los septos fibrosos. Como un control, las ratas se trataron con solución amortiguadora MES, pH 5.3 solo. Las secciones se fijaron y se tiñeron con tinción Trichrome de Masson para la visualización de colágeno como se describe en el Ejemplo 5. Las secciones también se tiñeron con Hemotoxilina y Eosina. Brevemente, las secciones se desparafinizaron y se hidrataron con agua. Si las secciones se fijaron con Zenker, los cristales de cloruro de mercurio se removieron con yodo y se clarificaron con tiosulfato de sodio. Las muestras se tiñeron con hematoxilina de Mayer durante 15 minutos, seguido por el lavado en agua potable corriente durante 20 minutos. Las secciones se contratiñeron con eosina durante 15 segundos a 2 minutos dependiendo de la edad de la eosina, y la profundidad de la contratinción deseada. Para los resultados de tinción uniforme, los portaobjetos se sumergieron varias veces antes de permitirles ajustarse en la eosina. Las secciones se deshidrataron en alcoholes en 95% y absolutos con dos cambios de dos minutos cada uno hasta que se removió el exceso de eosina. Los portaobjetos se verificaron bajo un microscopio antes de ser clarificados con xileno con dos cambios en dos minutos cada uno. Las secciones se montaron en Permount o Histoclad. Los resultados muestran que en los animales de control tratados con solución amortiguadora ácida únicamente, los lóbulos adiposos hipodérmicos se separaron por una red

de las Ratas Zucker

Ratas Zucker se trataron mediante la administración de 90 µg/ml de catepsina-L en solución amortiguadora MES, pH 5.3 e histología realizada sobre secciones de la piel para visualizar los septos fibrosos. Como un control, las ratas se trataron con solución amortiguadora MES, pH 5.3 solo. Las secciones se fijaron y se tiñeron con tinción Trichrome de Masson para la visualización de colágeno como se describe en el Ejemplo 5. Las secciones también se tiñeron con Hemotoxilina y Eosina. Brevemente, las secciones se desparafinizaron y se hidrataron con agua. Si las secciones se fijaron con Zenker, los cristales de cloruro de mercurio se removieron con yodo y se clarificaron con tiosulfato de sodio. Las muestras se tiñeron con hematoxilina de Mayer durante 15 minutos, seguido por el lavado en agua potable corriente durante 20 minutos. Las secciones se contratiñeron con eosina durante 15 segundos a 2 minutos dependiendo de la edad de la eosina, y la profundidad de la contratinción deseada. Para los resultados de tinción uniforme, los portaobjetos se sumergieron varias veces antes de permitirles ajustarse en la eosina. Las secciones se deshidrataron en alcoholes en 95% y absolutos con dos cambios de dos minutos cada uno hasta que se removió el exceso de eosina. Los portaobjetos se verificaron bajo un microscopio antes de ser clarificados con xileno con dos cambios en dos minutos cada uno. Las secciones se montaron en Permount o Histoclad. Los resultados muestran que en los animales de control tratados con solución amortiguadora ácida únicamente, los lóbulos adiposos hipodérmicos se separaron por una red

compleja de septos fibrosos de colágeno que se extienden perpendicularmente a la superficie de la piel. El tratamiento de las ratas con catepsina-L da por resultado la degradación de los septos fibrosos de la hipodermis.

La organización de los septos fibrosos se visualizó adicionalmente con un anticuerpo anticolágeno de conejo después del tratamiento con solución amortiguadora MES, pH 5.3 sin catepsina-L, con 90 µg/ml de catepsina-L o con 90 µg/ml de colagenasa bacteriana en solución reguladora HEPES 50 mM, pH 7.4. Los resultados muestran una distribución de colágeno normal en las ratas de control tratadas con únicamente solución amortiguadora MES ácida. El tratamiento de las ratas con catepsina-L mostró una tinción disminuida para el colágeno que evidencia la degradación del colágeno que evidencia la degradación del colágeno. La degradación del colágeno sin embargo, fue mucho más pronunciada por el tratamiento de ratas con colagenasa bacteriana. Estos resultados demuestran que la catepsina-L tiene un control temporal mayor de degradación de colágeno comparada con la colagenasa bacteriana.

EJEMPLO 18

Duración de la Acción Enzimática de la Catepsina-L en la Dermis de la Rata Zucker

La duración de la acción enzimática de la catepsina-L se estimó en la dermis de la rata Zucker usando dos métodos complementarios: técnica de Western blots y actividad enzimática. Las ratas se inyectaron en la dermis con 1 mL de 1200 unidades/ml de rHuPH20, pH 5.3, que contiene epinefrina (2.5 ug/mL) para inducir la contracción vascular. Esto se

siguió inmediatamente por una inyección de 1 mL de 100 µg/mL de catepsina-L recombinante, pH 5.3, en solución amortiguadora MES 50 mM. Las incisiones se hicieron no en el sitio de inyección y el perfusionado del intersticio se recolectó de 3 a 70 minutos después de la inyección con una pipeta Eppendorf de 20 µL y 200 µL. El fluido se analizó mediante el análisis Western blot para la degradación del colágeno como se describe en el Ejemplo 10 y al medir la actividad enzimática de la catepsina-L como se determina de la velocidad de la hidrólisis de un substrato fluorogénico comercialmente disponible, la actividad que se expresa como unidades de fluorescencia relativas (RFU)/minuto, designada como Z-Leu-Arg-AMC, durante 1 hora como se describe en el Ejemplo 9. Los valores de pH del perfusionado de fluido intersticial se registró usando tiras indicadoras de pH (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ, Cat#9588). Los datos se muestran en la Tabla 19.

La actividad enzimática máxima se midió dentro de 10 minutos después del tratamiento. La actividad disminuyó por aproximadamente 50% a 30 minutos y aproximadamente 70% a 60 minutos después de la administración en la dermis.

Tabla 19. Tiempo después de la administración en relación con la actividad de la catepsina-L y pH del fluido de intersticio después de la administración de 100 µg/mL de catepsina-L recombinante, pH 5.3.

Tiempo (minutos después de la inyección)	**Actividad de la catepsina-L (RFU/minutos)**	**pH del perfundido**
9	1930	5-5.5
12	1917	5-5.5
15	1759	5-5.5

18	1261	5-5.5
21	1165	5-5.5
25	1115	5.5
30	950	5.5-6
40	669	5.5-6
60	636	6

EJEMPLO 19

Efecto de Respuesta de Dosis de la Catepsina-L sobre la Degradación del Colágeno en la Dermis de la Rata Zucker

Después de la administración de 1 ml de 1200 U/ml de rHuPH20, pH 5.3 en la dermis de las ratas Zucker, 1 ml de dosis de catepsina-L que varía de 1 µg/mL a 500 µg/mL se administraron en la dermis de las ratas Zucker. Veinte minutos después de la inyección, se recolectaron las biopsias, se fijaron en fijador de Bouin, y se procesaron para histología. Las secciones se tiñeron con Hematoxilina y Eosina, y Trichrome Masson para la visualización del colágeno como se describe en el Ejemplo 5. Las incisiones se hicieron con un escalpelo en el sitio de inyección y se recolectó el fluido del intersticio.

El análisis histológico de la piel tratada y el análisis Western blot de los perfusionados se llevaron a cabo como se describe en los Ejemplos 5 y 10, respectivamente. Una alícuota de 25 µL de fluido de intersticio se mezcló con 5 µL con solución amortiguadora de muestra de carga en gel 6X para SDS-PAGE. El volumen total de las muestras se cargó sobre geles de Tris-Glicina al 4-12% (Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat# EC6038) y la electroforesis se llevó a cabo en la solución amortiguadora corriente SDS de Tris-Glicina hasta que el frente de tinte

de los marcadores de peso molecular pre-teñidos (Invitrogen, Cat# LC5925) alcanzó el fondo del gel. Las proteínas se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen, Cat#LC2001) usando el módulo de XCell II Blot (Invitrogen, Cat# IB1001) a 20V durante 1.5 horas a 4°C en una solución amortiguadora de Metanol al 20%, Tris 25 mM, y Glicina 220 mM. La transferencia se verificó por la ausencia casi completa de color de las bandas marcadoras pre-teñidas sobre el gel. La membrana se bloqueó en una solución amortiguadora que consiste de leche en polvo sin grasa al 2% en PBST (solución salina amortiguada con fosfato (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, fosfato 10 mM, pH 7.4), con el detergente Tween 20 (0.05% v/v) para el uso como una solución amortiguadora de lavado y diluyente para el ELISA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El colágeno I se detectó con un anticuerpo policlonal de conejo para el colágeno I humano (Abeam, Cambridge, MA, Cat#ab34710) usado en 1 µg/mL de concentración final en PBST y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora seguido por un IgG anticonejo de cabra conjugado con HRP (Calbiochem, San Diego, CA, Cat#DC03L) usado en una concentración de 33 ng/mL en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente. La señal HRP se desarrolló por la solución de desarrollo de membrana insoluble TMB (Calbiochem, Cat# 613548) y la reacción se detuvo al enjuagarla en ddH20 o después de 5-10 minutos a temperatura ambiente.

El análisis histológico y western blot mostró que las

bases incrementadas de catepsina-L dieron por resultado una degradación de colágeno dependiente de dosis. El análisis Western blot indicó que las concentraciones más altas de catepsina-L dieron por resultado una degradación de colágeno más extensiva como es juzgado por la presencia de numerosas bandas de peso molecular bajo en las muestras tratadas con 100 µg/mL.

EJEMPLO 20

Efecto Dependiente de Dosis de la Catepsina-L en la Interrupción de los Septos Fibrosos

Después de la administración de 1 mL de 1200 U/ml de rHuPH20 en MES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 5.3, se les administró a las ratas Zucker 1 mL de dosis de catepsina-L recombinante humana que varía de 1, 10, 50, 100, 250, y 500 µg/mL en solución amortiguadora MES, pH 5.3, a la dermis. Como un control, las ratas se trataron con solución amortiguadora MES, pH 5.3, solas. Veinte minutos después de la inyección, los perfusionados del intersticio se recolectaron de los sitios de inyección como se describe en el Ejemplo 18. Las biopsias de la piel se recolectaron, se fijaron en fijador de Bouin y se procesaron para histología. Las secciones desparafinadas se tiñeron con Hematoxilina y Eosina, y Trichrome de Masson para la visualización del colágeno como se describe en el Ejemplo 5. Las técnicas Western blot se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 10.

Los resultados del análisis de histología y Western blot mostró que la degradación de la catepsina-L

recombinante del colágeno en la rata Zucker fue dependiente de dosis. La interrupción de los septos fibrosos fue claramente visible la piel tratada 10 µg/mL de catepsina-L.

EJEMPLO 21

Efecto de la Consistencia Iónica Sobre el Efecto de la Catepsina-L en la Dermis de la Rata Zucker

El período de tiempo de la actividad enzimática de la catepsina-L inyectada en la dermis se estudió como una función de la consistencia iónica de la solución amortiguadora y la epinefrina.

A las ratas Zucker se les inyectó con 1 mL de 1200 U/ml de rHuPH20 seguido por 1 mL de 25 µg/mL de catepsina-L 1, 5, 10 y 50 mM de solución amortiguadora MES, NaCl 150 mM, pH 5.3. El perfusionado del intersticio se recolectó en 20 minutos después de la administración. Los valores de pH del perfusionado del fluido intersticial se registró usando tiras indicadoras de pH (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ, Cat#9588) y la actividad enzimática de la and catepsina-L en la dermis se midió como se describe en el Ejemplo 9. Los valores de pH del perfusionado térmico fue de 7.5 para la consistencia de la solución amortiguadora iónica baja (MES 1, 5, y 10 mM, pH5.3). El valor de pH del perfusionado dérmico fue de 6.5 cuando la catepsina-L se suministró en MES 50 mM, pH 5.3. No se detectó actividad enzimática medible cuando la catepsina-L se les suministró en la consistencia de la solución amortiguadora iónica baja (MES 1, 5, y 10 mM). Se detectó actividad enzimática robusta en el perfusionado del sitio de inyección

administrado con la catepsina-L formulada en MES 50 mM. Estos resultados indicaron que la actividad enzimática de la catepsina-L se puede modular ajustadamente por la consistencia iónica de la solución amortiguadora.

EJEMPLO 22

Interrupción de los Septos Fibrosos por la Catepsina-L Inyectada Dentro de la Subdermis de la rata Zucker

El efecto de una sola dosis de catepsina-L inyectada dentro de la subdermis de la rata Zucker ratas estimó en 22 ratas Zucker macho tratadas con ya sea 10 o 100 µg/mL de catepsina-L en solución amortiguadora MES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 5.3 después de la administración de 1200 U/ml de rHuPH20 en MES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 5.3. Las biopsias se tomaron una vez a la semana durante un periodo de 20 semanas y se analizaron histológicamente como se describe en el Ejemplo 5. Un solo tratamiento con ya sea 10 µg/ml o 100 µg/ml de dosis de catepsina-L dio por resultado una interrupción rápida de los septos fibrosos como se describe en el Ejemplo 17. El análisis histológico de las biopsias tomadas en la semana 4 indicó que el número de septos fibrosos fue más bajo en las áreas tratadas que en las áreas no tratadas. A partir de la semana 20 y adelante, la orientación vertical típica de los septos fibrosos no se observó en las área tratadas. Más bien la orientación del colágeno en la epidermis fue horizontal y paralela a la superficie de la piel, consisten con la remodelación del tejido.

EJEMPLO 23

La administración de Catepsina-L no está Asociada con Efectos Adversos

El estudio de seguridad de la catepsina-L intravascularmente no muestra efectos adversos obvios. Se les administró 25 g de catepsina recombinante a ratones balb/c machos (Charles River) y 200 g de catepsina recombinante a ratas Sprague Dawley macho (Harlan Laboratories) en MES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 5.3 en concentraciones de hasta 12 mg/kg en la vena de la cola. Los animales se observaron durante una semana para efectos adversos. No se registró efecto adverso mediante la observación lateral de la jaula.

EJEMPLO 24

La Catepsina-L Altera la Estructura de la Microestructura de los Septos Fibrosos en la Hipodermis de Cerdo

Cerdos Yorkshire anestesiados (SNS farms, Ramona, Ca) recibieron 5 mL de MES 50 mM, solución amortiguadora NaCl 150 mM en pH 5.3 que contiene 1200 LVmL de rHuPH20 a través de una aguja de mariposa de calibre 23 (Terumo, Leuven, Belgium Cat#CE0197) insertada dentro de la epidermis del flanco, seguido inmediatamente por i) 5 mL de 50 µg/ml de catepsina-L en MES 50 mM, solución amortiguadora NaCl 150 mM, pH 5.3; o ii) 50 µg de colagenasa bacteriana en HEPES 50 mM, solución amortiguadora NaCl 150 mM, pH 7.4. Los controles fueron solución amortiguadora MES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 5.3; rHuPH20 solo pH 5.3; y catepsina-L en pH 7.4. se cosecharon biopsias completas en 2 horas, 24 horas y

siete días después del tratamiento y se fijaron en el fijador de Bouin. Se cortaron secciones histológicas de seis mm y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina o con tinción de colágeno de Trichrome de Mason. Los cambios totales caracterizador por descoloración de café intenso se observaron en los sitios inyectados con colagenasa, pero a un grado mucho menor en el sitio tratado con catepsina-L. No es observaron cambios totales en los sitios inyectados con los controles o en la piel no tratada. Estos resultados muestran que el tratamiento con catepsina-L está acompañado con mínimo sangrado comparado con la inyección de colagenasa bacteriana.

Los cambios totales correlacionados típicamente con los descubrimientos histológicos del sangrado del sitio de inyección subcutáneo substancial con colagenasa, pero sangrado mínimo con catepsina-L. La microarquitectura de los septos fibrosos se caracterizó por separación longitudinal, desintegración y angulación de las fibras de colágeno en la piel inyectada con catepsina-L y colagenasa bacteriana, comparada con los septos de colágeno densamente empacados en la piel tratada únicamente con solución amortiguadora MES. Los resultados de histología, sin embargo, mostraron un cambio más severo en la microestructura de los septos en el sitio tratado con colagenasa comparado con el sitio tratado con catepsina-L, consistente con los resultados de hemorragia. Además, el tratamiento con dosis de colagenasa bacteriana tan bajas como 5 µg/mL dieron por resultado ramdomiolisis grave.

000362

Estos resultados demuestran que mientras que la catepsina-L degrada el colágeno y altera la estructura de los septos fibroso, sus efectos son más controlados que la colagenasa bacteriana debido a que la catepsina-L se inactiva rápidamente en pH fisiológico mientras que la colagenasa está activa durante un período de tiempo prolongado en pH fisiológico.

En otro estudio, los cerdos recibieron 5 mL de 120/ml U rHuPH20 en pH 5.3 seguido por 5 mL de catepsina-L recombinante en dosis que varían de 5 a 1000 µg/mL (5, 25, 50, 100, 200, 500 y 1000 µg/mL) en MES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 5.3. Se cosecharon biopsias de piel gruesa completas en 2 y 24 horas después del tratamiento, se fijaron en el fijador de Bouin y se procesaron para H&E o con Trichrome Masson para la tinción de colágeno como se describe en el Ejemplo 5. El examen visual de la piel escisada 2 horas y 24 horas después de la inyección mostró que hubo un sangrado moderado en el sitio de inyección tratado con dosis de 25 µg/mL y arriba. La ramdomiolisis se observó solamente en el área de los sitios de inyección en las dosis altas de 500 µg/mL y 1000 µg/mL de la catepsina-L recombinante.

Ejemplo 25

Efecto de las Condiciones de Reducción en la Actividad Enzimática de Catepsina-L para un Substrato Fluorogénico

El efecto de los agentes de reducción en la actividad enzimática de catepsina-L se procesó por ensayo usando un

sustrato fluorogénico fabricado personalizado, designado Z-His-Arg-Tyr-Arg-AMC (SEQ ID NO: 536; Z=:N-carbobenciloxi; AMC: 7-Amino-4-Metil Coumarin) (Biomatik Corp., Wilmington, DE). La actividad de catepsina-L en RFU/Sec se determinó en la presencia de cisteína (Spectrum Chemical, Gardena, CA; Catálogo # C1473) o TCEP (tris (2-carboxietil)fosfina) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO Cat. # C4706).

Se usó catepsina-L activada en una concentración de reserva de 7.85 mg/mL que contiene cisteína 5 mM. 2 ng/ml de catepsina-L se incubó con 20 µM de sustrato de péptido fluorogénico Z-His-Arg-Tyr-Arg-AMC a 37°C durante 30 minutos a 37°C en un volumen total de 200 µl de solución amortiguadora de citrato de sodio 50 mM pH 6.5, DMSO al 2%, Brij-35 al 0.01% que contiene la concentración apropiada de cisteína o TCEP como se indica en la Tabla 19A. Las incubaciones se realizaron en una microplaca de fondo opaco. La fluorescencia resultante se leyó en una emisión de excitación óptima 360nm - 460 nm para el sustrato en un lector de placa fluorescente (Molecular Devices, Spectramax M5, Sunnyvale, CA). Después la respuesta de dosis se ajusta en el software Graphpad Prizm (Graphpad Software, La Jolla, CA), los ajustes de la curva tienen valores R^2 >0.998. Los resultados mostrados en la Tabla 19A a continuación indican que la presencia de un agente de reducción incrementa la actividad de catepsina-L

TABLA 19A: Efecto de los Agentes de Reducción en la actividad de Catepsina-L		
µM Reductor	Actividad	% de actividad máximo
10000	413.577	99.7%
3333	414.853	100.0%
1111	303.383	73.1%
370	101.905	24.6%
123	17.821	4.3%
41	3.310	0.8%
14	1.384	0.3%
10000	358.5	88.4%
3333	405.4	100.0%
1111	399.5	98.5%
370	385.1	95.0%
123	388.9	95.9%
41	331.9	81.9%
14	172.1	42.5%
4.6	26.7	6.6%
1.5	0.7	0.2%

Ejemplo 26

Actividad Enzimática de catepsina-L en Sustratos

La catepsina-L en una concentración de 0.25 mg/ml se incubó con ya sea una de las siguientes tres proteínas (Colágeno Tipo I en 0.5 mg/ml; HSA en 0.25 mg/ml; y PH20 en 0.25 mg/ml) o como una mezcla de dos o tres a 37°C durante hasta 16 horas en una solución amortiguadora que contiene ya sea acetato de sodio 50 mM pH 5, acetato de sodio 50 mM pH 6 ó Hepes 50 mM pH 7. En varios puntos de tiempo (0, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min, y durante la noche), las alícuotas de las muestras se tomaron y analizaron por SDS-PAGE usando tinción azul. La degradación de la proteína por catepsina-L fue dependiente de la dosis y se observó para cada uno de los sustratos probados por una disminución visual en la intensidad de la proteína intacta. La degradación del colágeno tipo I, HAS y PH20 por catepsina L fue más completa en pH 5. La degradación disminuye en pH 6 y arriba. En pH

neutro, la degradación de colágeno tipo I, HAS y PH20 por catepsina L fue mínima. Ya que la catepsina L es estable en pH 5, agregar un agente de reducción a la solución amortiguadora que tiene poco o ningún efecto en la degradación de colágeno, HAS y PH20 por catepsina L en pH 5. Ya que la catepsina L experimenta la autocatálisis ya que el pH se incrementa a neutro, agregar un agente de reducción en pH neutro que disminuye la autocatálisis de catepsina L y por ello incrementa la degradación de colágeno, HAS y PH20.

Ejemplo 27

Clonación y Expresión de hMMP-1

A. Clonación y Expresión de Alto Desempeño de la Colección hMMP-1

En este ejemplo, se creó una colección de metaloproteasa de matriz humana 1 (hMMP-1, por sus siglas en inglés) por clonación del ADN que codifica MMP-1 humano en un plásmido seguido por transformación y crecimiento/aislamiento de proteína. La colección se creó al introducir mutaciones en una secuencia de ADN humana MMP-1 precursora que tiene la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 534, que codifica el proMMP-1 zimógeno inactivo (establecida en la SEQ ID NO: 327), para generar variantes de aminoácido sencillas de MMP-I a través del dominio catalítico y dominio de ligadura rica en prolina del polipéptido. La colección hMMP-1 se diseñó para contener al menos 15 variantes de aminoácido en cada una de las 178 posiciones de aminoácidos dentro del dominio catalítico (aminoácidos 81-242 de SEQ ID NO: 327) y la región ligadora (aminoácidos 243-258 de SEQ ID

NO: 327) de MMP-1 humano (Ver Tabla 20, a continuación).

Tabla 20: Colección hMMP-1	
Amino-ácido	**Sustituciones de Aminoácido**
F81	E; H; R; C; Q; T; S; G; M; W; I; V; L; A; P
V82	R; C; N; Q; T; Y; S; G; F; M; W; I; L; A; P
L83	D; E; H; R; C; Q; T; Y; S; G; M; W; I; A; P
T84	D; E; H; R; C; Q; Y; S; G; F; I; V; L; A; P
E85	K; R; C; N; Q; T; Y; S; G; F; M; V; L; A; P
G86	D; H; K; C; N; T; Y; S; F; M; W; I; V; L; P
N87	E; H; R; C; Q; Y; S; G; F; M; I; V; L; A; P
P88	D; E; H; K; R; C; Q; T; Y; G; W; I; V; L; A
R89	E; H; K; N; T; Y; S; G; F; M; W; V; L; A; P
W90	E; H; R; N; Q; T; S; G; F; M; I; V; L; A; P
E91	D; H; R; C; N; T; Y; S; G; F; W; I; V; L; A
Q92	E; K; R; N; T; Y; S; G; F; W; I; V; L; A; P
T93	D; E; K; R; N; S; G; F; M; W; I; V; L; A; P
H94	D; E; R; N; T; S; G; F; M; W; I; V; L; A; P
L95	D; E; H; K; R; C; T; Y; S; G; W; I; V; A; P
T96	E; H; R; C; N; Q; S; G; F; W; I; V; L;

Tabla 20: Colección hMMP-1	
Amino-ácido	**Sustituciones de Aminoácido**
	A; P
Y97	D; E; H; K; R; N; Q; T; S; G; W; V; L; A; P
R98	D; E; H; K; C; Y; S; G; F; M; W; V; L; A; P
I99	E; H; R; C; N; Q; T; Y; S; G; F; W; V; L; A; P
E100	D; H; R; N; T; Y; S; G; F; M; W; I; V; L; P
N101	D; H; K; R; C; T; Y; S; F; M; W; V; L; A; P
Y102	D; E; K; R; C; N; Q; S; G; F; M; V; L; A; P
T103	D; E; K; R; C; N; Q; Y; S; G; W; V; L; A; P
P104	D; E; H; R; C; Q; T; Y; S; G; F; M; V; L; A
D105	E; R; C; N; T; S; G; F; M; W; I; V; L; A; P
L106	D; H; R; C; N; T; Y; S; G; F; M; I; V; A; P
P107	D; K; R; C; T; Y; S; G; F; M; W; I; V; L; A
R108	E; K; C; N; T; Y; S; G; F; W; I; V; L; A; P
A109	D; E; H; R; N; Q; T; Y; S; G; M; W; I; V; L;
D110	H; R; C; Q; T; Y; S; G; F; M; I; V; L; A; P
V111	D; E; K; R; C; Q; T; Y; S; G; W; I; L; A; P
D112	H; K; R; C; Q; T; Y; S; G; F; M; W; I; V; L; A; P
H113	D; E; R; N; T; Y; S; G; F; M; W; V; L; A; P
A114	E; R; C; N; Q; T; S; G; F; M; W; I; V; L; P
I115	D; E; H; K; R; C; Q; T; S; G; F; W; V; L; P
E116	D; H; K; R; C; N; Q; S; G; F; M; I; L; A; P
K117	D; E; H; R; N; Q; T; Y; S; G; F; W; L; A; P
A118	D; E; H; K; R; Q; T; S; G; F; W; I; V; L; P

Tabla 20: Colección hMMP-1	
Amino-ácido	**Sustituciones de Aminoácido**
F119	E; H; K; R; C; N; T; Y; S; G; W; V; L; A; P
Q120	D; E; H; K; R; C; N; T; Y; G; M; W; V; A; P
L121	E; H; K; R; C; N; Q; T; S; G; F; I; V; A; P
W122	E; H; K; R; N; Q; T; Y; S; G; F; V; L; A; P
S123	D; H; K; R; C; N; Q; T; Y; G; F; M; W; I; V; L; A; P
N124	D; K; R; C; T; S; G; F; M; W; I; V; L; A; P
V125	D; E; H; R; C; Q; T; Y; S; G; F; M; W; A; P
T126	E; H; K; R; N; Q; S; G; F; M; W; V; L; A; P
P127	E; H; K; R; C; Q; T; S; F; M; W; I; V; L; A
L128	D; K; R; C; Q; T; S; G; F; M; W; I; V; A; P
T129	E; H; K; R; C; Y; S; G; F; M; I; V; L; A; P
F130	E; H; K; R; C; N; T; Y; S; G; I; V; L; A; P
T131	D; E; H; R; C; Q; Y; S; G; F; M; I; L; A; P
K132	D; E; H; R; T; Y; S; G; F; M; I; V; L; A; P
V133	D; E; H; K; R; C; N; T; S; G; M; W; L; A; P
S134	D; E; H; K; R; C; N; Q; T; Y; G; V; L; A; P
E135	D; H; R; N; Q; T; S; F; M; W; I; V; L; A; P
G136	D; E; H; R; C; N; T; S; M; W; I; V; L; A; P
Q137	E; H; K; R; C; N; T; Y; S; G; F; W; L; A; P
A138	D; E; H; R; C; Q; T; S; G; M; W; I; V; L; P
D139	E; H; R; C; N; Y; S; G; F; M; W; I; V; L; A; P
I140	D; E; H; K; R; C; T; Y; G; F; M; W; V; L; A
M141	D; E; H; R; C; N; T; Y; S; G; W; I; L;

Tabla 20: Colección hMMP-1	
Amino-ácido	**Sustituciones de Aminoácido**
	A; P
I142	K; R; N; Q; T; Y; S; G; F; M; W; V; L; A; P
S143	E; H; R; C; N; Q; T; Y; G; M; W; I; L; A; P
F144	E; H; K; R; C; N; Q; T; S; G; M; W; V; L; P
V145	D; E; H; K; R; C; N; Q; T; S; G; W; L; A; P
R146	D; E; H; K; C; N; Q; T; Y; S; F; V; L; A; P
G147	E; H; R; C; Q; T; S; F; M; W; I; V; L; A; P
D148	E; K; R; C; N; T; S; G; M; W; I; V; L; A; P
H149	E; R; C; N; Q; T; Y; S; G; W; I; V; L; A; P
R150	D; E; H; K; N; T; S; G; M; W; I; V; L; A; P
D151	K; R; N; Q; T; Y; S; G; F; M; W; V; L; A; P
N152	D; H; K; R; C; T; Y; S; G; F; W; I; L; A; P
S153	D; H; K; R; C; Q; T; Y; G; F; I; V; L; A; P
P154	H; K; R; C; N; Q; T; Y; S; F; W; I; V; L; A
F155	E; H; R; N; Q; T; Y; S; G; M; W; V; L; A; P
D156	E; H; K; R; C; T; Y; S; G; M; W; V; L; A; P
G157	D; H; K; R; N; Q; T; Y; S; F; M; V; L; A; P
P158	D; K; R; C; N; Q; T; Y; S; G; F; W; I; V; L; A
G159	E; K; R; C; Q; T; Y; S; M; W; I; V; L; A; P
G160	E; H; R; C; N; Q; T; S; M; W; I; V; L; A; P
N161	E; H; R; C; Q; T; Y; S; G; F; W; I; V; L; P
L162	D; E; R; C; Q; T; Y; S; G; F; M; W; I; A; P
A163	E; K; R; C; N; Q; T; Y; S; G; F; I; V; L; P

Tabla 20: Colección hMMP-1	
Amino-ácido	Sustituciones de Aminoácido
H164	E; K; R; C; N; Q; Y; S; G; F; M; V; L; A; P
A165	D; H; K; R; N; Q; T; S; G; F; M; W; V; L; P
F166	E; H; K; R; C; N; S; G; M; W; I; V; L; A; P
Q167	D; E; K; R; N; T; Y; S; G; F; M; V; L; A; P
P168	D; H; R; C; N; T; S; G; F; M; W; I; V; L; A
G169	D; E; H; R; C; Q; T; S; M; W; I; V; L; A; P
P170	D; H; K; R; C; Q; T; S; G; F; M; W; I; L; A
G171	D; E; H; K; R; C; N; Q; Y; S; M; W; L; A; P
I172	D; E; R; C; N; Q; T; Y; G; M; W; V; L; A; P
G173	D; K; R; C; N; T; Y; S; F; M; W; V; L; A; P
G174	D; E; H; R; N; T; Y; S; F; M; W; V; L; A; P
D175	E; H; R; C; N; Q; T; Y; S; G; F; I; V; L; A; P
A176	D; E; K; R; C; N; Q; T; S; G; F; W; V; L; P
H177	D; R; C; N; Q; T; Y; S; G; W; I; V; L; A; P
F178	E; H; K; R; C; Q; T; Y; S; G; W; I; V; L; A; P
D179	E; K; R; C; N; Q; T; S; G; W; I; V; L; A; P
E180	D; K; R; C; N; Q; T; Y; S; G; F; M; I; A; P
D181	E; K; R; C; Q; T; Y; S; G; F; M; V; L; A; P
E182	D; R; C; Q; T; Y; S; G; F; M; W; I; L; A; P
R183	E; H; K; C; N; T; S; G; M; W; I; V; L; A; P
W184	E; H; R; N; Q; T; S; G; F; M; I; V; L; A; P
T185	D; E; H; R; C; N; Q; Y; S; G; W; V; L; A; P
N186	D; E; H; R; C; Q; T; Y; S; G; F; V; L;

Tabla 20: Colección hMMP-1	
Amino-ácido	**Sustituciones de Aminoácido**
	A; P
N187	D; H; K; R; C; T; S; G; F; M; W; I; L; A; P
F188	D; E; H; K; R; N; Q; S; G; W; I; V; L; A; P
R189	D; E; H; K; C; N; Q; T; Y; G; W; V; L; A; P
E190	D; H; K; R; C; T; Y; S; G; M; I; V; L; A; P
Y191	D; E; H; K; R; C; Q; T; S; G; W; V; L; A; P
N192	D; H; K; R; C; Q; T; S; G; M; W; V; L; A; P
L193	D; E; K; R; N; Q; T; Y; S; G; F; W; I; A; P
H194	E; K; Q; T; Y; S; G; F; M; W; I; V; L; A; P
R195	D; E; K; C; Q; T; Y; S; G; F; W; V; L; A; P
V196	D; E; H; K; R; Q; T; Y; S; G; M; I; L; A; P
A197	E; H; R; C; N; Q; T; Y; S; G; W; I; V; L; P
A198	D; E; H; K; R; T; Y; S; G; F; M; W; V; L; P
H199	E; K; R; C; N; T; S; G; M; W; I; V; L; A; P
E200	D; R; C; N; T; Y; S; G; F; M; W; I; V; A; P
L201	D; E; K; R; N; Q; T; S; G; M; W; I; V; A; P
G202	D; E; H; K; R; C; T; Y; S; M; I; V; L; A; P
H203	D; E; R; C; N; Q; T; Y; S; G; I; V; L; A; P
S204	D; H; K; R; N; Q; T; Y; G; W; I; V; L; A; P
L205	D; E; R; C; N; Q; T; S; G; M; W; I; V; A; P
G206	D; E; H; R; C; Q; T; S; M; W; I; V; L; A; P
L207	D; H; K; R; N; Q; Y; S; G; M; W; I; V; A; P
S208	D; E; K; R; C; N; Q; T; G; F; W; V; L; A; P

Tabla 20: Colección hMMP-1	
Amino-ácido	**Sustituciones de Aminoácido**
H209	D; R; C; N; Q; T; Y; S; G; F; W; V; L; A; P
S210	H; K; R; C; N; Q; T; G; F; W; I; V; L; A; P
T211	D; H; K; R; N; Q; S; G; F; M; W; V; L; A; P
D212	E; H; K; R; N; Q; T; Y; S; G; F; V; L; A; P
I213	D; E; H; K; R; C; N; Q; T; S; G; F; M; V; L; A; P
G214	D; E; R; C; Q; T; Y; S; F; M; I; V; L; A; P
A215	D; H; K; R; C; N; Q; T; S; G; M; W; I; V; L; P
L216	D; E; K; R; C; Q; T; S; G; M; W; I; V; A; P
M217	D; H; K; R; C; N; Q; T; Y; S; G; I; L; A; P
Y218	D; E; R; C; N; Q; S; G; F; W; I; V; L; A; P
P219	D; E; H; K; R; C; Q; T; S; G; F; W; V; L; A
S220	E; H; K; R; N; Q; T; G; F; M; I; V; L; A; P
Y221	E; K; R; C; N; Q; T; S; G; M; W; V; L; A; P
T222	D; H; R; C; N; Y; S; G; F; M; W; I; V; L; A; P
F223	E; H; K; R; C; N; Q; T; Y; S; G; M; L; A; P
S224	D; H; K; R; C; Q; T; G; M; W; I; V; L; A; P
G225	D; E; H; K; R; C; N; Q; T; S; M; W; V; A; P
D226	E; H; R; C; N; T; S; G; M; W; I; V; L; A; P
V227	D; E; H; K; R; C; Q; T; Y; S; G; W; L; A; P
Q228	D; E; H; K; R; N; T; Y; S; G; M; W; L; A; P
L229	D; E; H; R; C; Q; T; Y; G; M; W; I; V; A; P
A230	D; H; R; C; N; T; Y; S; G; M; W; I; V; L; P
Q231	D; H; R; C; Y; S; G; F; M; W; I; V; L;

Tabla 20: Colección hMMP-1	
Amino-ácido	**Sustituciones de Aminoácido**
	A; P
D232	E; H; K; R; N; Q; T; Y; S; G; F; W; V; L; P
D233	E; K; R; N; Q; T; S; G; M; W; I; V; L; A; P
I234	D; E; H; C; N; Q; T; Y; G; M; W; V; L; A; P
D235	E; H; R; C; N; Q; T; Y; S; G; I; V; L; A; P
G236	D; E; K; R; C; N; T; Y; S; F; M; I; V; L; P
I237	D; E; K; R; C; N; Q; T; Y; S; G; W; L; A; P
Q238	E; H; K; R; C; N; T; Y; S; G; F; W; I; L; P
A239	D; H; K; R; C; Q; T; Y; S; G; F; W; I; V; L; P
I240	D; K; R; C; Q; T; Y; S; G; F; M; V; L; A; P
Y241	D; H; R; N; Q; T; S; G; M; W; I; V; L; A; P
G242	E; H; K; R; N; T; Y; S; F; W; I; V; L; A; P
R243	D; H; K; C; N; Q; T; Y; S; G; I; V; L; A; P
S244	D; E; H; R; Q; T; Y; G; F; M; W; V; L; A; P
Q245	E; H; K; R; C; T; S; G; F; M; W; I; V; L; P
N246	D; K; R; C; Q; T; Y; S; G; F; W; I; V; L; A; P
P247	D; E; H; K; R; N; Q; T; S; G; F; I; V; L; A
V248	E; H; K; R; C; Q; T; Y; S; G; F; M; W; I; L; A
Q249	E; H; K; R; C; N; T; Y; G; W; I; V; L; A; P
P250	D; K; R; N; Q; T; Y; S; G; F; M; W; V; L; A
I251	D; E; K; R; C; Q; T; Y; S; G; W; V; L; A; P
G252	D; E; H; K; R; C; T; S; F; M; W; I; V; L; A; P
P253	E; K; R; C; N; Q; T; Y; G; M; W; I; V; L; A

Tabla 20: Colección hMMP-1	
Amino-ácido	Sustituciones de Aminoácido
Q254	D; E; R; C; T; Y; S; G; F; W; I; V; L; A; P
T255	E; H; K; R; C; N; Q; S; G; F; I; V; L; A; P
P256	E; K; R; C; N; Q; Y; S; G; F; M; I; V; L; A
K257	E; R; C; N; T; S; G; F; M; W; I; V; L; A; P
A258	D; E; R; N; Q; T; Y; G; F; M; W; I; V; L; P

El cADN que codifica cada mutante hMMP-1 individual se generó al cambiar el codón de tipo natural, que codifica cada una de las 178 posiciones de aminoácidos identificadas en la Tabla 21 a continuación, para un codón que codifica la sustitución del aminoácido deseada. Los codones de tipo natural se establecen en SEQ ID NO: 534. La SEQ ID NO: 534 también describe los aminoácidos codificados. Las sustituciones de aminoácidos y codones mutados correspondientes se enlistan en la Tabla 21, a continuación.

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
F81C	TGT	T84L	TTG	N87S	AGT	W90H	CAT
F81E	GAG	T84D	GAT	N87I	ATT	W90M	ATG
F81I	ATT	T84R	CGG	N87C	TGT	W90R	CGG
F81L	CTG	T84I	ATT	N87A	GCG	W90E	GAG
F81P	CCT	T84S	TCT	N87G	GGT	W90N	AAT
F81S	TCT	T84G	GGT	N87Y	TAT	W90Q	CAG
F81A	GCG	T84Q	CAG	N87E	GAG	E91N	AAT
F81M	ATG	T84P	CCT	N87H	CAT	E91R	CGG
F81G	GGG	T84A	GCG	N87Q	CAG	E91W	TGG
F81T	ACG	T84C	TGT	P88C	TGT	E91G	GGG
F81Q	CAG	T84Y	TAT	P88K	AAG	E91V	GTG
F81R	CGT	T84F	TTT	P88W	TGG	E91Y	TAT
F81W	TGG	E85L	CTG	P88G	GGG	E91C	TGT
F81H	CAT	E85Q	CAG	P88L	CTG	E91H	CAT
F81V	GTG	E85P	CCT	P88Q	CAG	E91T	ACG
V82I	ATT	E85T	ACT	P88A	GCG	E91S	AGT
V82C	TGT	E85K	AAG	P88T	ACG	E91A	GCG
V82A	GCG	E85M	ATG	P88Y	TAT	E91I	ATT
V82P	CCG	E85G	GGT	P88R	CGG	E91D	GAT
V82Y	TAT	E85R	CGT	P88H	CAT	E91F	TTT
V82M	ATG	E85S	TCT	P88I	ATT	E91L	TTG

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
V82Q	CAG	E85C	TGT	P88V	GTG	Q92V	GTT
V82F	TTT	E85Y	TAT	P88E	GAG	Q92Y	TAT
V82W	TGG	E85A	GCG	P88D	GAT	Q92L	CTG
V82N	AAT	E85N	AAT	R89V	GTG	Q92N	AAT
V82R	CGT	E85V	GTG	R89W	TGG	Q92E	GAG
V82G	GGT	E85F	TTT	R89M	ATG	Q92I	ATT
V82S	TCG	G86L	CTT	R89A	GCG	Q92T	ACT
V82L	TTG	G86P	CCG	R89T	ACG	Q92G	GGT
V82T	ACT	G86I	ATT	R89G	GGG	Q92P	CCG
L83A	GCG	G86T	ACT	R89S	TCT	Q92W	TGG
L83C	TGT	G86H	CAT	R89K	AAG	Q92F	TTT
L83D	GAT	G86D	GAT	R89F	TTT	Q92S	TCG
L83E	GAG	G86N	AAT	R89Y	TAT	Q92R	CGG
L83G	GGT	G86S	AGT	R89N	AAT	Q92K	AAG
L83H	CAT	G86K	AAG	R89H	CAT	Q92A	GCT
L83I	ATT	G86W	TGG	R89L	TTG	T93A	GCG
L83M	ATG	G86Y	TAT	R89E	GAG	T93L	CTT
L83P	CCG	G86V	GTT	R89P	CCT	T93M	ATG
L83Q	CAG	G86C	TGT	W90L	TTG	T93N	AAT
L83R	CGG	G86M	ATG	W90G	GGG	T93V	GTG
L83S	AGT	G86F	TTT	W90P	CCG	T93I	ATT
L83T	ACG	N87M	ATG	W90T	ACT	T93D	GAT
L83W	TGG	N87L	CTG	W90S	TCG	T93S	TCG
L83Y	TAT	N87P	CCG	W90V	GTG	T93R	CGG
T84V	GTT	N87V	GTT	W90I	ATT	T93W	TGG
T84E	GAG	N87R	CGT	W90A	GCT	T93F	TTT
T84H	CAT	N87F	TTT	W90F	TTT	T93P	CCT
T93G	GGG	Y97R	CGT	E100L	CTG	T103R	CGG
T93K	AAG	Y97V	GTG	E100H	CAT	T103Y	TAT
T93E	GAG	Y97A	GCT	E100D	GAT	T103N	AAT
H94L	CTG	Y97P	CCT	E100M	ATG	T103C	TGT
H94S	TCG	Y97L	CTT	E100G	GGT	T103Q	CAG
H94M	ATG	Y97T	ACG	E100W	TGG	T103W	TGG
H94R	CGG	Y97K	AAG	E100Y	TAT	T103P	CCG
H94E	GAG	Y97W	TGG	E100R	CGT	T103A	GCG
H94I	ATT	Y97H	CAT	E100S	TCT	T103G	GGG
H94D	GAT	Y97S	TCG	E100T	ACG	T103K	AAG
H94P	CCG	Y97E	GAG	E100F	TTT	P104G	GGG
H94A	GCG	Y97D	GAT	E100I	ATT	P104E	GAG
H94N	AAT	Y97N	AAT	E100N	AAT	P104T	ACT
H94F	TTT	Y97G	GGT	N101M	ATG	P104F	TTT
H94G	GGG	Y97Q	CAG	N101F	TTT	P104R	CGT
H94T	ACT	R98H	CAT	N101L	TTG	P104D	GAT
H94V	GTG	R98K	AAG	N101V	GTG	P104C	TGT
H94W	TGG	R98C	TGT	N101H	CAT	P104Q	CAG

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
L95E	GAG	R98L	CTG	N101R	CGG	P104V	GTG
L95Y	TAT	R98M	ATG	N101C	TGT	P104Y	TAT
L95R	CGG	R98F	TTT	N101T	ACT	P104H	CAT
L95A	GCT	R98W	TGG	N101P	CCT	P104L	TTG
L95G	GGG	R98Y	TAT	N101W	TGG	P104S	TCG
L95K	AAG	R98P	CCT	N101K	AAG	P104A	GCG
L95S	AGT	R98E	GAG	N101S	TCG	P104M	ATG
L95T	ACG	R98A	GCG	N101D	GAT	D105A	GCT
L95H	CAT	R98G	GGG	N101A	GCG	D105C	TGT
L95W	TGG	R98V	GTT	N101Y	TAT	D105F	TTT
L95V	GTG	R98S	TCG	Y102R	CGT	D105G	GGT
L95C	TGT	R98D	GAT	Y102K	AAG	D105I	ATT
L95P	CCT	I99C	TGT	Y102V	GTG	D105L	CTG
L95D	GAT	I99E	GAG	Y102M	ATG	D105M	ATG
L95I	ATT	I99G	GGG	Y102P	CCG	D105N	AAT
T96E	GAG	I99H	CAT	Y102N	AAT	D105P	CCT
T96R	CGG	I99N	AAT	Y102G	GGG	D105R	CGG
T96P	CCG	I99P	CCT	Y102L	CTG	D105S	TCG
T96S	TCG	I99T	ACG	Y102D	GAT	D105T	ACG
T96A	GCG	I99V	GTT	Y102S	TCG	D105V	GTT
T96L	TTG	I99A	GCG	Y102F	TTT	D105W	TGG
T96W	TGG	I99F	TTT	Y102A	GCT	D105E	GAG
T96N	AAT	I99L	CTG	Y102E	GAG	L106P	CCG
T96G	GGT	I99R	CGT	Y102Q	CAG	L106D	GAT
T96F	TTT	I99S	TCG	Y102C	TGT	L106N	AAT
T96Q	CAG	I99Q	CAG	T103E	GAG	L106G	GGT
T96H	CAT	I99W	TGG	T103D	GAT	L106M	ATG
T96V	GTT	I99Y	TAT	T103S	AGT	L106A	GCT
T96I	ATT	E100V	GTT	T103L	CTG	L106R	CGG
T96C	TGT	E100P	CCG	T103V	GTT	L106Y	TAT
L106T	ACG	A109V	GTT	D112I	ATT	E116A	GCG
L106V	GTG	A109E	GAG	D112Y	TAT	E116C	TGT
L106H	CAT	A109L	CTT	D112L	TTG	E116D	GAT
L106F	TTT	A109H	CAT	H113T	ACT	E116F	TTT
L106I	ATT	D110P	CCT	H113L	CTG	E116G	GGT
L106C	TGT	D110F	TTT	H113M	ATG	E116H	CAT
L106S	TCT	D110Q	CAG	H113S	TCG	E116I	ATT
P107L	TTG	D110R	CGG	H113N	AAT	E116K	AAG
P107W	TGG	D110M	ATG	H113R	AGG	E116L	CTG
P107T	ACT	D110H	CAT	H113A	GCT	E116M	ATG
P107S	TCG	D110I	ATT	H113E	GAG	E116N	AAT
P107R	CGG	D110L	CTT	H113V	GTG	E116P	CCG
P107Y	TAT	D110V	GTG	H113Y	TAT	E116Q	CAG
P107M	ATG	D110T	ACG	H113F	TTT	E116R	AGG
P107V	GTG	D110S	TCG	H113D	GAT	E116S	TCT

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
P107D	GAT	**D110Y**	TAT	**H113W**	TGG	**K117H**	CAT
P107A	GCG	**D110G**	GGT	**H113G**	GGG	**K117T**	ACG
P107C	TGT	**D110C**	TGT	**H113P**	CCG	**K117Q**	CAG
P107K	AAG	**D110A**	GCG	**A114E**	GAG	**K117E**	GAG
P107F	TTT	**V111E**	GAG	**A114S**	TCG	**K117A**	GCG
P107I	ATT	**V111A**	GCT	**A114I**	ATT	**K117F**	TTT
P107G	GGT	**V111S**	TCT	**A114P**	CCT	**K117D**	GAT
R108P	CCT	**V111W**	TGG	**A114N**	AAT	**K117N**	AAT
R108G	GGT	**V111G**	GGT	**A114L**	CTT	**K117G**	GGT
R108T	ACG	**V111Y**	TAT	**A114T**	ACT	**K117W**	TGG
R108E	GAG	**V111P**	CCG	**A114F**	TTT	**K117Y**	TAT
R108A	GCG	**V111L**	CTG	**A114V**	GTT	**K117L**	TTG
R108Y	TAT	**V111D**	GAT	**A114G**	GGT	**K117S**	AGT
R108K	AAG	**V111K**	AAG	**A114C**	TGT	**K117P**	CCG
R108C	TGT	**V111T**	ACT	**A114M**	ATG	**K117R**	AGG
R108S	TCT	**V111Q**	CAG	**A114R**	AGG	**A118G**	GGG
R108F	TTT	**V111I**	ATT	**A114W**	TGG	**A118R**	CGT
R108W	TGG	**V111C**	TGT	**A114Q**	CAG	**A118W**	TGG
R108I	ATT	**V111R**	CGT	**I115F**	TTT	**A118K**	AAG
R108L	CTT	**D112A**	GCG	**I115T**	ACT	**A118P**	CCT
R108N	AAT	**D112M**	ATG	**I115H**	CAT	**A118V**	GTG
R108V	GTT	**D112V**	GTT	**I115G**	GGT	**A118L**	TTG
A109S	TCG	**D112R**	CGG	**I115K**	AAG	**A118D**	GAT
A109R	CGG	**D112K**	AAG	**I115E**	GAG	**A118S**	AGT
A109T	ACG	**D112P**	CCT	**I115S**	AGT	**A118F**	TTT
A109W	TGG	**D112Q**	CAG	**I115P**	CCT	**A118I**	ATT
A109I	ATT	**D112F**	TTT	**I115C**	TGT	**A118H**	CAT
A109Q	CAG	**D112G**	GGG	**I115L**	CTT	**A118E**	GAG
A109N	AAT	**D112C**	TGT	**I115Q**	CAG	**A118Q**	CAG
A109Y	TAT	**D112W**	TGG	**I115R**	CGG	**A118T**	ACT
A109G	GGG	**D112T**	ACT	**I115W**	TGG	**F119G**	GGG
A109M	ATG	**D112H**	CAT	**I115V**	GTT	**F119T**	ACT
A109D	GAT	**D112S**	TCT	**I115D**	GAT	**F119R**	CGG
F119L	TTG	**W122G**	GGG	**V125T**	ACG	**L128A**	GCG
F119N	AAT	**W122S**	TCG	**V125A**	GCT	**L128D**	GAT
F119S	AGT	**W122V**	GTT	**V125C**	TGT	**L128V**	GTG
F119C	TGT	**W122H**	CAT	**V125D**	GAT	**L128W**	TGG
F119P	CCG	**W122F**	TTT	**V125W**	TGG	**L128C**	TGT
F119W	TGG	**W122Y**	TAT	**V125R**	CGG	**L128K**	AAG
F119K	AAG	**W122K**	AAG	**V125E**	GAA	**T129G**	GGT
F119H	CAT	**W122Q**	CAG	**V125F**	TTT	**T129A**	GCT
F119A	GCG	**W122E**	GAG	**V125H**	CAT	**T129C**	TGT
F119V	GTT	**S123D**	GAT	**T126K**	AAG	**T129K**	AAG
F119Y	TAT	**S123L**	TTG	**T126V**	GTG	**T129F**	TTT
F119E	GAG	**S123A**	GCT	**T126G**	GGG	**T129Y**	TAT

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
Q120K	AAG	**S123C**	TGT	**T126R**	CGG	**T129S**	TCG
Q120N	AAT	**S123I**	ATT	**T126L**	TTG	**T129R**	CGG
Q120A	GCG	**S123K**	AAG	**T126H**	CAT	**T129V**	GTT
Q120V	GTG	**S123N**	AAT	**T126M**	ATG	**T129L**	CTT
Q120D	GAT	**S123F**	TTT	**T126P**	CCG	**T129H**	CAT
Q120R	CGG	**S123Y**	TAT	**T126A**	GCG	**T129P**	CCT
Q120P	CCT	**S123M**	ATG	**T126N**	AAT	**T129E**	GAG
Q120W	TGG	**S123H**	CAT	**T126E**	GAG	**T129I**	ATT
Q120Y	TAT	**S123R**	CGG	**T126F**	TTT	**T129M**	ATG
Q120C	TGT	**S123W**	TGG	**T126W**	TGG	**F130L**	CTG
Q120H	CAT	**S123T**	ACG	**T126Q**	CAG	**F130P**	CCT
Q120T	ACT	**S123P**	CCT	**T126S**	AGT	**F130C**	TGT
Q120M	ATG	**S123G**	GGG	**P127C**	TGT	**F130R**	CGG
Q120E	GAG	**S123Q**	CAG	**P127F**	TTT	**F130Y**	TAT
Q120G	GGT	**S123V**	GTT	**P127T**	ACG	**F130H**	CAT
L121E	GAG	**N124G**	GGT	**P127E**	GAG	**F130I**	ATT
L121Q	CAG	**N124C**	TGT	**P127W**	TGG	**F130V**	GTT
L121P	CCT	**N124V**	GTG	**P127A**	GCT	**F130K**	AAG
L121R	CGG	**N124L**	CTT	**P127S**	AGT	**F130T**	ACT
L121C	TGT	**N124T**	ACG	**P127H**	CAT	**F130E**	GAG
L121G	GGG	**N124R**	CGT	**P127Q**	CAG	**F130A**	GCG
L121K	AAG	**N124M**	ATG	**P127K**	AAG	**F130N**	AAT
L121F	TTT	**N124S**	TCG	**P127R**	CGG	**F130G**	GGT
L121I	ATT	**N124P**	CCT	**P127I**	ATT	**F130S**	AGT
L121S	TCG	**N124A**	GCG	**P127V**	GTG	**T131F**	TTT
L121V	GTT	**N124K**	AAG	**P127L**	CTG	**T131P**	CCG
L121H	CAT	**N124F**	TTT	**P127M**	ATG	**T131A**	GCG
L121T	ACT	**N124W**	TGG	**L128F**	TTT	**T131S**	TCT
L121A	GCT	**N124I**	ATT	**L128M**	ATG	**T131G**	GGT
L121N	AAT	**N124D**	GAT	**L128T**	ACT	**T131I**	ATT
W122R	CGT	**V125G**	GGG	**L128R**	CGT	**T131L**	CTT
W122A	GCG	**V125Q**	CAG	**L128S**	TCG	**T131H**	CAT
W122N	AAT	**V125S**	TCG	**L128G**	GGT	**T131Q**	CAG
W122P	CCG	**V125P**	CCG	**L128I**	ATT	**T131D**	GAT
W122T	ACG	**V125M**	ATG	**L128Q**	CAG	**T131E**	GAG
W122L	CTT	**V125Y**	TAT	**L128P**	CCT	**T131C**	TGT
T131R	CGT	**E135V**	GTT	**A138C**	TGT	**M141S**	AGT
T131Y	TAT	**E135M**	ATG	**A138T**	ACG	**M141C**	TGT
T131M	ATG	**E135S**	TCG	**A138S**	TCT	**M141L**	CTG
K132G	GGT	**E135D**	GAT	**A138R**	CGT	**M141A**	GCG
K132V	GTG	**E135T**	ACG	**A138G**	GGG	**M141D**	GAT
K132L	TTG	**E135L**	CTG	**A138E**	GAG	**M141W**	TGG
K132A	GCT	**E135A**	GCG	**A138H**	CAT	**M141G**	GGT
K132P	CCG	**E135W**	TGG	**A138M**	ATG	**M141H**	CAT
K132F	TTT	**E135F**	TTT	**A138Q**	CAG	**M141Y**	TAT

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
K132R	CGG	E135P	CCG	A138I	ATT	M141N	AAT
K132I	ATT	E135R	CGG	A138D	GAT	I142L	CTG
K132H	CAT	E135N	AAT	A138W	TGG	I142M	ATG
K132S	TCT	E135H	CAT	D139R	CGT	I142G	GGT
K132M	ATG	E135Q	CAG	D139V	GTT	I142K	AAG
K132D	GAT	E135I	ATT	D139M	ATG	I142A	GCT
K132T	ACT	G136V	GTG	D139C	TGT	I142N	AAT
K132Y	TAT	G136W	TGG	D139P	CCT	I142W	TGG
K132E	GAG	G136D	GAT	D139S	TCT	I142P	CCG
V133G	GGG	G136M	ATG	D139L	CTT	I142Q	CAG
V133E	GAG	G136N	AAT	D139I	ATT	I142Y	TAT
V133T	ACT	G136A	GCG	D139H	CAT	I142V	GTG
V133N	AAT	G136L	TTG	D139A	GCG	I142T	ACT
V133A	GCG	G136C	TGT	D139G	GGG	I142R	CGG
V133H	CAT	G136P	CCG	D139F	TTT	I142S	AGT
V133P	CCG	G136T	ACG	D139N	AAT	I142F	TTT
V133K	AAG	G136R	CGT	D139W	TGG	S143P	CCG
V133R	CGG	G136S	TCG	D139Y	TAT	S143C	TGT
V133L	CTT	G136I	ATT	D139E	GAG	S143E	GAG
V133W	TGG	G136H	CAT	I140D	GAT	S143G	GGT
V133C	TGT	G136E	GAG	I140K	AAG	S143H	CAT
V133D	GAT	Q137A	GCT	I140A	GCT	S143R	CGT
V133M	ATG	Q137R	CGG	I140G	GGG	S143L	TTG
V133S	AGT	Q137G	GGG	I140C	TGT	S143Q	CAG
S134V	GTT	Q137K	AAG	I140Y	TAT	S143N	AAT
S134H	CAT	Q137H	CAT	I140V	GTT	S143W	TGG
S134P	CCT	Q137P	CCT	I140W	TGG	S143A	GCT
S134G	GGG	Q137S	TCG	I140F	TTT	S143T	ACT
S134N	AAT	Q137L	CTG	I140H	CAT	S143Y	TAT
S134R	CGT	Q137W	TGG	I140L	CTG	S143M	ATG
S134L	CTG	Q137F	TTT	I140R	CGG	S143I	ATT
S134Q	CAG	Q137T	ACG	I140E	GAG	F144K	AAG
S134E	GAG	Q137C	TGT	I140M	ATG	F144M	ATG
S134Y	TAT	Q137Y	TAT	I140T	ACT	F144E	GAG
S134A	GCG	Q137N	AAT	M141E	GAG	F144S	AGT
S134K	AAG	Q137E	GAG	M141I	ATT	F144L	CTG
S134D	GAT	A138V	GTT	M141R	CGG	F144W	TGG
S134T	ACG	A138L	CTT	M141T	ACG	F144P	CCG
S134C	TGT	A138P	CCG	M141P	CCG	F144R	CGG
F144N	AAT	G147V	GTT	R150H	CAT	P154L	CTT
F144C	TGT	G147Q	CAG	D151R	CGT	P154C	TGT
F144G	GGT	G147M	ATG	D151F	TTT	P154S	TCT
F144T	ACT	G147P	CCT	D151P	CCG	P154K	AAG
F144Q	CAG	D148R	CGG	D151W	TGG	P154I	ATT
F144H	CAT	D148I	ATT	D151Q	CAG	P154A	GCT

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
F144V	GTG	**D148T**	ACG	**D151L**	CTT	**P154T**	ACG
V145A	GCG	**D148G**	GGT	**D151S**	TCG	**P154H**	CAT
V145T	ACG	**D148L**	CTG	**D151G**	GGT	**P154Y**	TAT
V145L	CTG	**D148V**	GTT	**D151A**	GCT	**P154N**	AAT
V145P	CCG	**D148A**	GCG	**D151N**	AAT	**P154F**	TTT
V145K	AAG	**D148W**	TGG	**D151K**	AAG	**P154R**	CGT
V145N	AAT	**D148P**	CCG	**D151Y**	TAT	**P154Q**	CAG
V145D	GAT	**D148S**	TCG	**D151V**	GTT	**F155S**	TCT
V145H	CAT	**D148K**	AAG	**D151T**	ACT	**F155T**	ACT
V145R	CGG	**D148E**	GAG	**D151M**	ATG	**F155G**	GGT
V145Q	CAG	**D148M**	ATG	**N152G**	GGG	**F155N**	AAT
V145S	TCT	**D148N**	AAT	**N152C**	TGT	**F155R**	CGG
V145G	GGG	**D148C**	TGT	**N152F**	TTT	**F155W**	TGG
V145W	TGG	**H149W**	TGG	**N152L**	TTG	**F155L**	CTG
V145C	TGT	**H149A**	GCG	**N152P**	CCG	**F155Q**	CAG
V145E	GAG	**H149L**	TTG	**N152R**	CGG	**F155M**	ATG
R146T	ACG	**H149C**	TGT	**N152H**	CAT	**F155E**	GAG
R146L	CTG	**H149Q**	CAG	**N152T**	ACG	**F155A**	GCG
R146N	AAT	**H149T**	ACT	**N152Y**	TAT	**F155P**	CCT
R146H	CAT	**H149Y**	TAT	**N152K**	AAG	**F155V**	GTT
R146Q	CAG	**H149P**	CCG	**N152D**	GAT	**F155H**	CAT
R146K	AAG	**H149V**	GTT	**N152W**	TGG	**F155Y**	TAT
R146C	TGT	**H149R**	CGG	**N152I**	ATT	**D156H**	CAT
R146S	AGT	**H149G**	GGT	**N152A**	GCG	**D156L**	CTT
R146D	GAT	**H149E**	GAG	**N152S**	TCT	**D156E**	GAG
R146A	GCT	**H149S**	AGT	**S153I**	ATT	**D156A**	GCT
R146Y	TAT	**H149I**	ATT	**S153R**	CGG	**D156W**	TGG
R146P	CCT	**H149N**	AAT	**S153K**	AAG	**D156C**	TGT
R146V	GTT	**R150S**	TCG	**S153C**	TGT	**D156P**	CCT
R146E	GAG	**R150E**	GAG	**S153G**	GGG	**D156V**	GTT
R146F	TTT	**R150G**	GGG	**S153H**	CAT	**D156K**	AAG
G147R	CGT	**R150M**	ATG	**S153L**	CTT	**D156S**	TCT
G147F	TTT	**R150P**	CCG	**S153V**	GTT	**D156G**	GGG
G147I	ATT	**R150T**	ACG	**S153T**	ACG	**D156T**	ACT
G147L	CTG	**R150W**	TGG	**S153P**	CCT	**D156Y**	TAT
G147A	GCG	**R150A**	GCG	**S153A**	GCG	**D156R**	CGT
G147E	GAG	**R150N**	AAT	**S153F**	TTT	**D156M**	ATG
G147H	CAT	**R150K**	AAG	**S153D**	GAT	**G157K**	AAG
G147W	TGG	**R150L**	TTG	**S153Q**	CAG	**G157D**	GAT
G147T	ACG	**R150V**	GTT	**S153Y**	TAT	**G157F**	TTT
G147C	TGT	**R150D**	GAT	**P154V**	GTT	**G157R**	CGT
G147S	TCT	**R150I**	ATT	**P154W**	TGG	**G157H**	CAT
G157L	TTG	**G160M**	ATG	**A163E**	GAG	**F166C**	TGT
G157N	AAT	**G160C**	TGT	**A163T**	ACG	**F166E**	GAG
G157Y	TAT	**G160Q**	CAG	**A163Q**	CAG	**Q167D**	GAT

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
G157S	TCG	G160V	GTT	A163I	ATT	Q167R	CGG
G157T	ACG	G160S	AGT	A163N	AAT	Q167A	GCG
G157A	GCT	G160E	GAG	H164L	CTT	Q167S	AGT
G157Q	CAG	G160L	CTT	H164M	ATG	Q167F	TTT
G157P	CCG	G160T	ACG	H164K	AAG	Q167Y	TAT
G157V	GTG	N161S	AGT	H164P	CCG	Q167P	CCG
G157M	ATG	N161C	TGT	H164C	TGT	Q167T	ACT
P158S	TCT	N161L	TTG	H164R	CGT	Q167V	GTG
P158Y	TAT	N161R	CGT	H164A	GCG	Q167L	CTG
P158R	CGG	N161G	GGT	H164V	GTG	Q167M	ATG
P158L	CTT	N161W	TGG	H164S	TCG	Q167N	AAT
P158V	GTG	N161Y	TAT	H164N	AAT	Q167G	GGG
P158C	TGT	N161E	GAG	H164G	GGG	Q167K	AAG
P158A	GCG	N161P	CCT	H164F	TTT	Q167E	GAG
P158W	TGG	N161T	ACG	H164Y	TAT	P168N	AAT
P158I	ATT	N161H	CAT	H164Q	CAG	P168F	TTT
P158F	TTT	N161I	ATT	H164E	GAG	P168R	CGG
P158Q	CAG	N161V	GTG	A165W	TGG	P168W	TGG
P158T	ACT	N161F	TTT	A165V	GTT	P168A	GCT
P158G	GGT	N161Q	CAG	A165G	GGG	P168T	ACG
P158K	AAG	L162A	GCT	A165K	AAG	P168V	GTT
P158N	AAT	L162G	GGG	A165L	TTG	P168G	GGG
P158D	GAT	L162C	TGT	A165P	CCT	P168C	TGT
G159R	CGG	L162P	CCG	A165Q	CAG	P168M	ATG
G159S	AGT	L162R	CGG	A165D	GAT	P168H	CAT
G159Q	CAG	L162I	ATT	A165H	CAT	P168L	CTT
G159P	CCT	L162S	TCT	A165F	TTT	P168S	AGT
G159V	GTG	L162D	GAT	A165S	AGT	P168I	ATT
G159K	AAG	L162M	ATG	A165T	ACT	P168D	GAT
G159A	GCG	L162E	GAG	A165R	CGG	G169H	CAT
G159Y	TAT	L162T	ACT	A165N	AAT	G169A	GCG
G159E	GAG	L162Y	TAT	A165M	ATG	G169E	GAG
G159T	ACG	L162F	TTT	F166G	GGG	G169C	TGT
G159M	ATG	L162W	TGG	F166S	TCG	G169S	TCG
G159I	ATT	L162Q	CAG	F166L	CTT	G169L	CTG
G159W	TGG	A163R	CGT	F166V	GTG	G169V	GTT
G159L	CTG	A163G	GGG	F166P	CCT	G169T	ACG
G159C	TGT	A163Y	TAT	F166N	AAT	G169R	CGG
G160A	GCG	A163P	CCT	F166R	CGT	G169W	TGG
G160H	CAT	A163S	AGT	F166A	GCG	G169M	ATG
G160N	AAT	A163L	CTT	F166K	AAG	G169I	ATT
G160W	TGG	A163C	TGT	F166H	CAT	G169P	CCG
G160R	CGG	A163K	AAG	F166W	TGG	G169D	GAT
G160P	CCG	A163V	GTG	F166I	ATT	G169Q	CAG
G160I	ATT	A163F	TTT	F166M	ATG	P170L	CTT

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido

Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
P170R	CGG	**G173S**	AGT	**A176L**	CTG	**D179I**	ATT
P170I	ATT	**G173A**	GCG	**A176P**	CCT	**D179R**	CGT
P170T	ACG	**G173R**	AGG	**A176N**	AAT	**D179N**	AAT
P170F	TTT	**G173N**	AAT	**A176G**	GGT	**D179W**	TGG
P170Q	CAG	**G173T**	ACG	**A176S**	TCT	**D179Q**	CAG
P170G	GGG	**G173D**	GAT	**A176R**	CGT	**D179V**	GTG
P170S	TCT	**G173V**	GTT	**A176K**	AAG	**D179C**	TGT
P170H	CAT	**G173F**	TTT	**A176D**	GAT	**E180M**	ATG
P170C	TGT	**G173M**	ATG	**A176W**	TGG	**E180P**	CCT
P170M	ATG	**G173Y**	TAT	**H177T**	ACG	**E180K**	AAG
P170K	AAG	**G173P**	CCG	**H177P**	CCG	**E180Y**	TAT
P170W	TGG	**G174R**	CGT	**H177Q**	CAG	**E180Q**	CAG
P170D	GAT	**G174A**	GCG	**H177A**	GCG	**E180R**	CGG
P170A	GCG	**G174E**	GAG	**H177S**	TCG	**E180A**	GCG
G171S	TCT	**G174F**	TTT	**H177G**	GGG	**E180T**	ACT
G171M	ATG	**G174H**	CAT	**H177W**	TGG	**E180I**	ATT
G171N	AAT	**G174T**	ACT	**H177L**	CTG	**E180F**	TTT
G171P	CCT	**G174D**	GAT	**H177V**	GTT	**E180C**	TGT
G171R	CGG	**G174S**	AGT	**H177I**	ATT	**E180G**	GGG
G171Y	TAT	**G174P**	CCG	**H177R**	CGG	**E180S**	TCG
G171A	GCT	**G174W**	TGG	**H177N**	AAT	**E180N**	AAT
G171Q	CAG	**G174V**	GTT	**H177Y**	TAT	**E180D**	GAT
G171H	CAT	**G174N**	AAT	**H177C**	TGT	**D181S**	TCG
G171L	CTT	**G174Y**	TAT	**H177D**	GAT	**D181Q**	CAG
G171W	TGG	**G174M**	ATG	**F178G**	GGT	**D181P**	CCT
G171C	TGT	**G174L**	CTT	**F178C**	TGT	**D181Y**	TAT
G171K	AAG	**D175I**	ATT	**F178W**	TGG	**D181R**	CGT
G171E	GAG	**D175T**	ACG	**F178R**	CGG	**D181V**	GTT
G171D	GAT	**D175N**	AAT	**F178K**	AAG	**D181F**	TTT
I172Y	TAT	**D175V**	GTT	**F178S**	AGT	**D181A**	GCT
I172T	ACG	**D175S**	TCG	**F178H**	CAT	**D181T**	ACG
I172P	CCT	**D175R**	CGG	**F178P**	CCT	**D181L**	TTG
I172A	GCG	**D175G**	GGG	**F178V**	GTT	**D181E**	GAG
I172L	CTT	**D175A**	GCG	**F178A**	GCT	**D181K**	AAG
I172Q	CAG	**D175F**	TTT	**F178Q**	CAG	**D181M**	ATG
I172E	GAG	**D175C**	TGT	**F178Y**	TAT	**D181C**	TGT
I172C	TGT	**D175Q**	CAG	**F178I**	ATT	**D181G**	GGT
I172M	ATG	**D175Y**	TAT	**F178T**	ACT	**E182C**	TGT
I172D	GAT	**D175L**	CTG	**F178L**	CTG	**E182P**	CCT
I172V	GTT	**D175H**	CAT	**F178E**	GAG	**E182S**	AGT
I172R	CGT	**D175P**	CCG	**D179P**	CCT	**E182T**	ACG
I172G	GGG	**D175E**	GAG	**D179L**	TTG	**E182R**	CGG
I172W	TGG	**A176F**	TTT	**D179E**	GAG	**E182D**	GAT
I172N	AAT	**A176Q**	CAG	**D179G**	GGG	**E182A**	GCT
G173C	TGT	**A176V**	GTG	**D179S**	AGT	**E182F**	TTT

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido

Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
G173L	CTG	**A176E**	GAG	**D179A**	GCT	**E182L**	CTT
G173K	AAG	**A176T**	ACT	**D179K**	AAG	**E182I**	ATT
G173W	TGG	**A176C**	TGT	**D179T**	ACT	**E182Y**	TAT
E182Q	CAG	**T185D**	GAT	**R189K**	AAG	**N192S**	TCG
E182W	TGG	**N186G**	GGG	**R189P**	CCG	**N192W**	TGG
E182M	ATG	**N186A**	GCT	**R189E**	GAG	**N192G**	GGG
E182G	GGT	**N186T**	ACT	**R189V**	GTT	**N192D**	GAT
R183P	CCT	**N186R**	CGT	**R189D**	GAT	**N192V**	GTG
R183K	AAG	**N186L**	TTG	**R189Y**	TAT	**N192A**	GCT
R183W	TGG	**N186P**	CCG	**R189C**	TGT	**N192T**	ACT
R183E	GAG	**N186S**	AGT	**R189A**	GCT	**N192K**	AAG
R183A	GCT	**N186V**	GTG	**R189H**	CAT	**N192C**	TGT
R183T	ACG	**N186Q**	CAG	**R189W**	TGG	**N192M**	ATG
R183L	CTT	**N186H**	CAT	**R189N**	AAT	**L193P**	CCG
R183N	AAT	**N186C**	TGT	**R189T**	ACT	**L193G**	GGG
R183H	CAT	**N186E**	GAG	**R189Q**	CAG	**L193F**	TTT
R183V	GTG	**N186F**	TTT	**E190A**	GCG	**L193S**	TCG
R183C	TGT	**N186Y**	TAT	**E190H**	CAT	**L193W**	TGG
R183M	ATG	**N186D**	GAT	**E190V**	GTG	**L193A**	GCT
R183I	ATT	**N187R**	CGG	**E190P**	CCG	**L193R**	CGT
R183G	GGT	**N187M**	ATG	**E190C**	TGT	**L193Q**	CAG
R183S	TCT	**N187S**	TCT	**E190G**	GGT	**L193E**	GAG
W184G	GGG	**N187T**	ACG	**E190R**	CGG	**L193K**	AAG
W184H	CAT	**N187L**	CTG	**E190I**	ATT	**L193N**	AAT
W184L	CTG	**N187W**	TGG	**E190S**	TCG	**L193I**	ATT
W184E	GAG	**N187F**	TTT	**E190T**	ACT	**L193T**	ACT
W184P	CCT	**N187K**	AAG	**E190M**	ATG	**L193D**	GAT
W184N	AAT	**N187I**	ATT	**E190L**	TTG	**L193Y**	TAT
W184A	GCG	**N187A**	GCT	**E190K**	AAG	**H194S**	AGT
W184T	ACT	**N187P**	CCG	**E190Y**	TAT	**H194E**	GAG
W184R	CGG	**N187D**	GAT	**E190D**	GAT	**H194K**	AAG
W184Q	CAG	**N187G**	GGG	**Y191T**	ACT	**H194Q**	CAG
W184V	GTG	**N187C**	TGT	**Y191H**	CAT	**H194V**	GTT
W184S	TCT	**N187H**	CAT	**Y191G**	GGG	**H194T**	ACT
W184M	ATG	**F188P**	CCG	**Y191L**	TTG	**H194L**	CTG
W184I	ATT	**F188I**	ATT	**Y191P**	CCT	**H194Y**	TAT
W184F	TTT	**F188N**	AAT	**Y191Q**	CAG	**H194F**	TTT
T185R	CGT	**F188S**	AGT	**Y191K**	AAG	**H194G**	GGT
T185Y	TAT	**F188Q**	CAG	**Y191D**	GAT	**H194I**	ATT
T185W	TGG	**F188K**	AAG	**Y191A**	GCG	**H194W**	TGG
T185H	CAT	**F188G**	GGG	**Y191W**	TGG	**H194M**	ATG
T185G	GGG	**F188W**	TGG	**Y191S**	TCT	**H194A**	GCT
T185P	CCT	**F188E**	GAG	**Y191V**	GTT	**H194P**	CCT
T185S	TCG	**F188H**	CAT	**Y191E**	GAG	**R195C**	TGT
T185V	GTT	**F188D**	GAT	**Y191R**	CGT	**R195F**	TTT

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
T185Q	CAG	F188A	GCG	Y191C	TGT	R195W	TGG
T185N	AAT	F188L	CTT	N192R	CGG	R195T	ACT
T185C	TGT	F188R	CGT	N192L	CTG	R195L	CTG
T185L	CTT	F188V	GTT	N192Q	CAG	R195G	GGT
T185A	GCG	R189L	TTG	N192P	CCT	R195Q	CAG
T185E	GAG	R189G	GGG	N192H	CAT	R195K	AAG
R195S	TCT	A198F	TTT	L201N	AAT	L205S	TCT
R195A	GCT	A198W	TGG	G202T	ACG	L205G	GGT
R195D	GAT	A198Y	TAT	G202Y	TAT	L205P	CCT
R195P	CCT	A198D	GAT	G202E	GAG	L205E	GAG
R195Y	TAT	H199I	ATT	G202V	GTG	L205V	GTG
R195E	GAG	H199P	CCG	G202S	TCT	L205M	ATG
R195V	GTG	H199G	GGT	G202L	CTG	L205N	AAT
V196T	ACG	H199N	AAT	G202I	ATT	L205C	TGT
V196D	GAT	H199S	TCG	G202M	ATG	L205I	ATT
V196G	GGG	H199L	TTG	G202H	CAT	L205A	GCG
V196E	GAG	H199M	ATG	G202C	TGT	L205R	CGG
V196A	GCG	H199A	GCG	G202R	CGT	L205W	TGG
V196S	AGT	H199C	TGT	G202P	CCT	L205Q	CAG
V196Q	CAG	H199K	AAG	G202A	GCT	G206I	ATT
V196P	CCG	H199R	CGT	G202K	AAG	G206V	GTG
V196R	CGT	H199V	GTG	G202D	GAT	G206A	GCG
V196H	CAT	H199W	TGG	H203Y	TAT	G206C	TGT
V196Y	TAT	H199T	ACT	H203E	GAG	G206S	TCG
V196I	ATT	H199E	GAG	H203R	CGG	G206P	CCG
V196L	CTG	E200P	CCG	H203Q	CAG	G206L	TTG
V196K	AAG	E200G	GGG	H203P	CCG	G206D	GAT
V196M	ATG	E200A	GCT	H203G	GGG	G206M	ATG
A197G	GGT	E200T	ACG	H203T	ACT	G206R	CGG
A197S	AGT	E200I	ATT	H203D	GAT	G206Q	CAG
A197L	CTT	E200W	TGG	H203L	TTG	G206E	GAG
A197P	CCG	E200R	CGG	H203N	AAT	G206H	CAT
A197V	GTG	E200F	TTT	H203A	GCT	G206T	ACG
A197Y	TAT	E200M	ATG	H203S	TCT	G206W	TGG
A197Q	CAG	E200D	GAT	H203V	GTT	L207S	TCT
A197R	CGG	E200V	GTG	H203I	ATT	L207Y	TAT
A197T	ACT	E200C	TGT	H203C	TGT	L207A	GCG
A197I	ATT	E200S	TCT	S204R	CGG	L207R	CGT
A197H	CAT	E200Y	TAT	S204N	AAT	L207P	CCG
A197E	GAG	E200N	AAT	S204A	GCG	L207Q	CAG
A197W	TGG	L201A	GCG	S204T	ACT	L207N	AAT
A197N	AAT	L201R	CGG	S204Y	TAT	L207K	AAG
A197C	TGT	L201E	GAG	S204V	GTG	L207M	ATG
A198T	ACG	L201P	CCT	S204L	CTT	L207W	TGG
A198K	AAG	L201G	GGT	S204H	CAT	L207H	CAT

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
A198S	TCG	L201V	GTT	S204D	GAT	L207D	GAT
A198H	CAT	L201T	ACG	S204Q	CAG	L207V	GTT
A198G	GGT	L201I	ATT	S204G	GGG	L207I	ATT
A198E	GAG	L201S	TCT	S204W	TGG	L207G	GGT
A198P	CCG	L201W	TGG	S204I	ATT	S208D	GAT
A198L	TTG	L201Q	CAG	S204K	AAG	S208V	GTT
A198R	CGT	L201D	GAT	S204P	CCT	S208P	CCT
A198V	GTT	L201M	ATG	L205T	ACG	S208G	GGT
A198M	ATG	L201K	AAG	L205D	GAT	S208A	GCG
S208K	AAG	T211Q	CAG	G214A	GCT	M217A	GCG
S208N	AAT	T211S	TCG	G214D	GAT	M217H	CAT
S208F	TTT	T211A	GCG	G214F	TTT	M217I	ATT
S208Q	CAG	T211F	TTT	G214Y	TAT	M217D	GAT
S208W	TGG	T211D	GAT	G214M	ATG	Y218C	TGT
S208T	ACG	T211W	TGG	G214C	TGT	Y218F	TTT
S208E	GAG	T211L	CTG	A215L	CTG	Y218W	TGG
S208C	TGT	D212E	GAG	A215Q	CAG	Y218L	CTG
S208R	CGT	D212A	GCG	A215M	ATG	Y218A	GCG
S208L	CTT	D212K	AAG	A215G	GGT	Y218P	CCG
H209T	ACG	D212R	CGG	A215W	TGG	Y218R	CGG
H209Y	TAT	D212T	ACG	A215S	AGT	Y218N	AAT
H209R	CGG	D212N	AAT	A215T	ACG	Y218V	GTG
H209Q	CAG	D212G	GGG	A215V	GTT	Y218Q	CAG
H209A	GCT	D212S	TCT	A215N	AAT	Y218I	ATT
H209G	GGG	D212P	CCG	A215P	CCG	Y218D	GAT
H209N	AAT	D212Q	CAG	A215H	CAT	Y218S	TCG
H209P	CCT	D212V	GTT	A215K	AAG	Y218G	GGG
H209W	TGG	D212L	TTG	A215I	ATT	Y218E	GAG
H209V	GTT	D212F	TTT	A215R	CGT	P219L	TTG
H209D	GAT	D212H	CAT	A215C	TGT	P219C	TGT
H209S	AGT	D212Y	TAT	A215D	GAT	P219V	GTG
H209F	TTT	I213Q	CAG	L216A	GCT	P219D	GAT
H209L	CTG	I213T	ACT	L216C	TGT	P219F	TTT
H209C	TGT	I213C	TGT	L216D	GAT	P219A	GCG
S210C	TGT	I213P	CCT	L216E	GAG	P219T	ACT
S210G	GGT	I213H	CAT	L216G	GGG	P219E	GAG
S210I	ATT	I213A	GCG	L216I	ATT	P219Q	CAG
S210R	CGT	I213V	GTT	L216K	AAG	P219R	CGG
S210L	CTG	I213G	GGG	L216M	ATG	P219H	CAT
S210V	GTG	I213N	AAT	L216P	CCT	P219G	GGG
S210H	CAT	I213L	CTT	L216Q	CAG	P219K	AAG
S210N	AAT	I213S	AGT	L216R	CGG	P219S	TCG
S210F	TTT	I213M	ATG	L216S	TCT	P219W	TGG
S210P	CCG	I213R	CGG	L216T	ACT	S220R	CGT
S210W	TGG	I213K	AAG	L216V	GTG	S220A	GCG

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
S210Q	CAG	I213F	TTT	L216W	TGG	S220Q	CAG
S210T	ACG	I213D	GAT	M217P	CCT	S220T	ACT
S210K	AAG	I213E	GAG	M217Y	TAT	S220L	CTT
S210A	GCG	G214L	TTG	M217T	ACG	S220K	AAG
T211P	CCG	G214Q	CAG	M217C	TGT	S220G	GGG
T211R	CGT	G214S	TCT	M217S	AGT	S220H	CAT
T211K	AAG	G214T	ACT	M217L	CTG	S220E	GAG
T211G	GGG	G214V	GTG	M217N	AAT	S220M	ATG
T211M	ATG	G214I	ATT	M217R	CGG	S220V	GTT
T211N	AAT	G214R	CGT	M217Q	CAG	S220P	CCG
T211V	GTG	G214P	CCG	M217K	AAG	S220I	ATT
T211H	CAT	G214E	GAG	M217G	GGG	S220F	TTT
S220N	AAT	S224T	ACG	V227K	AAG	A230S	TCG
Y221W	TGG	S224Q	CAG	V227L	CTG	A230C	TGT
Y221K	AAG	S224R	CGG	V227P	CCT	A230V	GTT
Y221Q	CAG	S224P	CCG	V227S	TCT	A230T	ACT
Y221C	TGT	S224I	ATT	V227T	ACT	A230Y	TAT
Y221N	AAT	S224V	GTT	V227W	TGG	A230M	ATG
Y221P	CCT	S224L	TTG	V227Y	TAT	A230N	AAT
Y221V	GTT	S224C	TGT	V227G	GGG	A230H	CAT
Y221A	GCG	S224K	AAG	V227H	CAT	Q231I	ATT
Y221G	GGG	S224D	GAT	V227Q	CAG	Q231A	GCT
Y221R	CGG	S224H	CAT	V227R	CGT	Q231F	TTT
Y221S	TCG	S224M	ATG	Q228A	GCT	Q231P	CCT
Y221M	ATG	S224A	GCT	Q228D	GAT	Q231Y	TAT
Y221T	ACG	S224W	TGG	Q228E	GAG	Q231R	CGT
Y221L	CTT	G225D	GAT	Q228G	GGT	Q231L	CTG
Y221E	GAG	G225R	CGT	Q228H	CAT	Q231D	GAT
T222L	TTG	G225Q	CAG	Q228K	AAG	Q231G	GGT
T222Y	TAT	G225M	ATG	Q228L	CTG	Q231V	GTT
T222R	CGT	G225P	CCT	Q228M	ATG	Q231W	TGG
T222V	GTT	G225W	TGG	Q228N	AAT	Q231S	AGT
T222P	CCT	G225S	TCT	Q228P	CCG	Q231H	CAT
T222S	AGT	G225E	GAG	Q228R	CGG	Q231C	TGT
T222A	GCT	G225V	GTT	Q228S	TCT	Q231M	ATG
T222H	CAT	G225T	ACG	Q228T	ACG	D232H	CAT
T222G	GGG	G225K	AAG	Q228W	TGG	D232G	GGG
T222M	ATG	G225N	AAT	Q228Y	TAT	D232R	CGT
T222F	TTT	G225C	TGT	L229R	CGG	D232P	CCT
T222C	TGT	G225H	CAT	L229A	GCG	D232Y	TAT
T222I	ATT	G225A	GCG	L229T	ACG	D232N	AAT
T222N	AAT	D226S	TCT	L229Q	CAG	D232S	TCG
T222W	TGG	D226W	TGG	L229P	CCT	D232F	TTT
T222D	GAT	D226R	CGG	L229E	GAG	D232V	GTG
F223L	TTG	D226A	GCT	L229W	TGG	D232K	AAG

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
F223T	ACG	D226N	AAT	L229M	ATG	D232W	TGG
F223C	TGT	D226T	ACT	L229I	ATT	D232Q	CAG
F223R	CGT	D226E	GAG	L229G	GGT	D232E	GAG
F223N	AAT	D226L	CTT	L229C	TGT	D232T	ACT
F223P	CCT	D226P	CCT	L229Y	TAT	D232L	CTG
F223E	GAG	D226H	CAT	L229D	GAT	D233Q	CAG
F223G	GGG	D226G	GGT	L229H	CAT	D233P	CCG
F223Q	CAG	D226I	ATT	L229V	GTG	D233S	TCT
F223A	GCG	D226M	ATG	A230L	TTG	D233T	ACG
F223S	TCT	D226V	GTG	A230G	GGT	D233A	GCG
F223Y	TAT	D226C	TGT	A230W	TGG	D233W	TGG
F223H	CAT	V227A	GCT	A230P	CCG	D233G	GGT
F223K	AAG	V227C	TGT	A230D	GAT	D233R	CGT
F223M	ATG	V227D	GAT	A230R	CGT	D233E	GAG
S224G	GGG	V227E	GAG	A230I	ATT	D233N	AAT
D233V	GTG	G236N	AAT	I240G	GGG	R243L	CTT
D233M	ATG	G236F	TTT	I240Q	CAG	R243A	GCG
D233L	CTG	I237S	TCG	I240P	CCG	R243H	CAT
D233K	AAG	I237L	CTG	I240R	CGG	R243Q	CAG
D233I	ATT	I237R	CGT	I240S	TCG	R243S	AGT
I234A	GCT	I237Q	CAG	I240K	AAG	R243I	ATT
I234T	ACG	I237K	AAG	I240V	GTG	R243C	TGT
I234V	GTT	I237D	GAT	I240D	GAT	R243N	AAT
I234W	TGG	I237A	GCG	I240A	GCG	R243Y	TAT
I234E	GAG	I237T	ACG	I240C	TGT	R243G	GGG
I234G	GGT	I237E	GAG	I240L	CTT	R243D	GAT
I234L	CTT	I237C	TGT	I240F	TTT	R243V	GTG
I234H	CAT	I237G	GGG	I240Y	TAT	S244P	CCG
I234M	ATG	I237P	CCT	I240M	ATG	S244L	CTT
I234N	AAT	I237Y	TAT	I240T	ACG	S244W	TGG
I234Y	TAT	I237W	TGG	Y241V	GTT	S244M	ATG
I234P	CCT	I237N	AAT	Y241A	GCT	S244V	GTT
I234D	GAT	Q238G	GGG	Y241G	GGG	S244Q	CAG
I234Q	CAG	Q238H	CAT	Y241H	CAT	S244D	GAT
I234C	TGT	Q238S	TCG	Y241R	CGG	S244E	GAG
D235H	CAT	Q238Y	TAT	Y241P	CCG	S244T	ACG
D235G	GGG	Q238F	TTT	Y241Q	CAG	S244H	CAT
D235A	GCG	Q238E	GAG	Y241L	TTG	S244G	GGT
D235P	CCG	Q238L	TTG	Y241T	ACG	S244A	GCT
D235L	CTT	Q238W	TGG	Y241S	AGT	S244F	TTT
D235V	GTG	Q238P	CCG	Y241W	TGG	S244Y	TAT
D235E	GAG	Q238R	AGG	Y241N	AAT	S244R	CGT
D235R	CGT	Q238C	TGT	Y241M	ATG	Q245P	CCT
D235Q	CAG	Q238N	AAT	Y241I	ATT	Q245I	ATT
D235T	ACG	Q238I	ATT	Y241D	GAT	Q245F	TTT

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
D235C	TGT	Q238T	ACG	G242A	GCG	Q245V	GTT
D235S	TCG	Q238K	AAG	G242F	TTT	Q245M	ATG
D235N	AAT	A239S	TCT	G242L	CTT	Q245T	ACT
D235Y	TAT	A239Q	CAG	G242N	AAT	Q245E	GAG
D235I	ATT	A239T	ACG	G242P	CCT	Q245S	TCG
G236M	ATG	A239P	CCT	G242W	TGG	Q245R	CGG
G236R	CGG	A239V	GTG	G242T	ACG	Q245G	GGT
G236D	GAT	A239L	CTG	G242R	CGT	Q245H	CAT
G236S	TCT	A239Y	TAT	G242V	GTT	Q245L	CTT
G236T	ACT	A239I	ATT	G242S	TCG	Q245K	AAG
G236C	TGT	A239C	TGT	G242I	ATT	Q245W	TGG
G236K	AAG	A239G	GGG	G242Y	TAT	Q245C	TGT
G236E	GAG	A239W	TGG	G242H	CAT	N246W	TGG
G236P	CCG	A239F	TTT	G242E	GAG	N246R	CGG
G236I	ATT	A239K	AAG	G242K	AAG	N246A	GCG
G236Y	TAT	A239H	CAT	R243P	CCG	N246F	TTT
G236L	CTG	A239R	CGT	R243K	AAG	N246G	GGT
G236V	GTT	A239D	GAT	R243T	ACG	N246P	CCT
N246V	GTT	Q249G	GGT	G252P	CCT	T255L	TTG
N246Q	CAG	Q249N	AAT	G252H	CAT	T255H	CAT
N246Y	TAT	Q249K	AAG	G252C	TGT	P256S	AGT
N246C	TGT	Q249I	ATT	G252V	GTT	P256V	GTG
N246I	ATT	Q249Y	TAT	G252I	ATT	P256F	TTT
N246L	TTG	Q249V	GTG	P253C	TGT	P256Y	TAT
N246S	TCT	Q249L	TTG	P253G	GGT	P256I	ATT
N246T	ACT	Q249H	CAT	P253Q	CAG	P256A	GCT
N246K	AAG	P250L	CTG	P253I	ATT	P256L	CTT
N246D	GAT	P250S	TCG	P253L	CTG	P256G	GGT
P247A	GCG	P250R	CGG	P253R	CGG	P256N	AAT
P247D	GAT	P250Y	TAT	P253A	GCT	P256R	CGG
P247E	GAG	P250M	ATG	P253E	GAG	P256Q	CAG
P247F	TTT	P250F	TTT	P253Y	TAT	P256E	GAG
P247G	GGG	P250A	GCT	P253W	TGG	P256K	AAG
P247H	CAT	P250K	AAG	P253M	ATG	P256M	ATG
P247I	ATT	P250G	GGT	P253V	GTG	P256C	TGT
P247K	AAG	P250N	AAT	P253T	ACT	K257C	TGT
P247L	CTG	P250T	ACT	P253K	AAG	K257M	ATG
P247N	AAT	P250W	TGG	P253N	AAT	K257V	GTT
P247Q	CAG	P250D	GAT	Q254R	CGT	K257A	GCT
P247R	CGT	P250V	GTG	Q254G	GGG	K257E	GAG
P247S	TCG	P250Q	CAG	Q254W	TGG	K257S	TCT
P247T	ACG	I251A	GCG	Q254T	ACT	K257L	CTT
P247V	GTT	I251Q	CAG	Q254A	GCT	K257I	ATT
V248W	TGG	I251G	GGG	Q254F	TTT	K257G	GGG
V248L	CTG	I251L	CTG	Q254D	GAT	K257N	AAT

Tabla 21. Codones que codifican cada sustitución de aminoácido							
Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón	Mutación	Codón
V248Q	CAG	I251K	AAG	Q254P	CCG	K257F	TTT
V248M	ATG	I251R	CGT	Q254L	CTG	K257W	TGG
V248Y	TAT	I251E	GAG	Q254C	TGT	K257R	CGG
V248G	GGG	I251D	GAT	Q254Y	TAT	K257P	CCG
V248C	TGT	I251T	ACG	Q254I	ATT	K257T	ACT
V248R	CGG	I251C	TGT	Q254E	GAG	A258Q	CAG
V248A	GCG	I251Y	TAT	Q254V	GTG	A258Y	TAT
V248H	CAT	I251P	CCT	Q254S	TCT	A258W	TGG
V248I	ATT	I251S	TCT	T255I	ATT	A258G	GGG
V248T	ACT	I251W	TGG	T255Q	CAG	A258L	TTG
V248K	AAG	I251V	GTT	T255P	CCG	A258F	TTT
V248S	TCG	G252F	TTT	T255R	CGT	A258M	ATG
V248F	TTT	G252W	TGG	T255C	TGT	A258N	AAT
V248E	GAG	G252A	GCG	T255N	AAT	A258V	GTG
Q249T	ACT	G252R	CGG	T255S	AGT	A258T	ACG
Q249W	TGG	G252L	CTT	T255V	GTG	A258I	ATT
Q249R	CGG	G252E	GAG	T255E	GAG	A258D	GAT
Q249E	GAG	G252D	GAT	T255G	GGG	A258R	CGT
Q249A	GCT	G252K	AAG	T255K	AAG	A258E	GAG
Q249P	CCG	G252S	TCG	T255A	GCT	A258P	CCG
Q249C	TGT	G252T	ACG	T255F	TTT	T255L	TTG

El ADN que codifica cada miembro de colección individual se generó de acuerdo con protocolos de síntesis de ADN estándares y expresó usando técnicas de biología molecular de rutina. Brevemente, el ADN se ligó en el vector pET303CTHis (Invitrogen, SEQ ID NO: 533) usando técnicas de biología molecular de rutina. El plásmido que contiene un mutante hMMP-1 individual se transformó en células BL21 (DE3) *E. coli* (Tigen, Beijing, China) usando las recomendaciones de los fabricantes. El proceso se repitió para todos los miembros de la colección. El cultivo de transformación se usó para inocular 1 mL de medio LB que contiene aditivos de ampicilina. El cultivo se hizo crecer a 37°C con agitación durante 16 horas. La expresión de la proteína se indujo por la adición de isopropil-β-D-tiogalactosido 1 mM (IPTG) y el cultivo se incubó a 25°C con agitación. Después de 6 horas, las células se peletizaron por

centrifugación a 6,000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se removió. La proteína periplásmica se enriqueció al incubar las células en 50 µl de solución amortiguadora OS (Tris-HCV 200 mM, pH 7.5, sacarosa al 20%, EDTA 1 mM) con 4 µl de ADNsa (10 µg/ml), 4 µl de ARNsa (10 µg/ml), y 4 µl de lisozima (10 µg/ml) durante 10 minutos a 25°C. 50 µl de agua se agregó a cada pozo seguido por centrifugación a 6000 g durante 10 minutos para remover los desechos celulares. El sobrenadante, que contiene la proteína hMMP-1, se almacenó a -20°C. La actividad de los sobrenadantes se separaron por exclusión como se describe en los siguientes ejemplos.

B. Clonación y expresión de hMMP-1 de tipo natural

En este ejemplo, hMMP-1 de tipo natural se expresó individualmente en tanto células *E. coli* como CHO-S.

1. Expresión en *E. coli*

La hMMP-1 de tipo natural (clon BAP006_10, que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 534) se clonó en el vector pET303CTHis (Invitrogen, SEQ ID NO: 533) e hizo crecer en BL21(DE3) de *E. coli*. El vector pET303CTHis contiene una tag His de terminal C (SEQ ID NO: 235). La expresión de la proteína se indujo durante la adición de isopropil-β-D-tiogalactosido 1 mM (IPTG) como se describe arriba. Después de la expresión, la proteína se enriqueció como se describe en el Ejemplo 27A, y purificó posteriormente usando una columna HiTrap Ni^{2+} (GE Healthcare) de acuerdo con los protocolos de biología molecular estándares. La expresion y

purificación se vigilaron por SDS/PAGE y análisis Western blot.

2. Expresión en células CHO-S

La hMMP-1 de tipo natural (clon BAP006_2, que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 534) se expresó en células CHO-S y se secretó en el medio. La proteína hMMP-1 de tipo natural se purificó usando una columna HiTrap Ni^{2+} (GE Healthcare) de acuerdo con protocolos de biología molecular estándares.

Ejemplo 28

Determinación de la Actividad Enzimática de los Mutantes hMMP-1 usando un sustrato de péptido fluorogénico

En este ejemplo, la colección mutante de hMMP-1, generada en el Ejemplo 27, se separó por exclusión usando un ensayo de actividad de fluorescencia de alto desempeño para identificar los mutantes hMMP-1 sensibles a la temperatura. Para separar por exclusión los mutantes hMMP-1 sensibles temporalmente, la actividad enzimática de cada mutante individual se determinó a 25°C y 37°C y/o 34°C, usando un sustrato fluorogénico comercialmente disponible, péptido IX, designado como Mca-K-P-L-G-L-Dpa-A-R-NH2 (SEQ ID NO: 535; Mca=(7-Metoxicoumarino-4-il)acetil; Dpa=N-3-(2,4,-Dinitrofenil)-L-2,3-diaminopropionilo; R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat # ES010). El sustrato de péptido contiene un grupo 7-metoxicoumarino altamente fluorescente que se apaga por transferencia de energía de resonancia al grupo 2,4-dinitrofenilo. El hMMP-1 activado desdobla el enlace de amida entre glicina y leucina resultando

en un incremento en la fluorescencia liberada. Las reacciones se realizaron inicialmente en un ensayo de 96 pozos y confirmaron usando un formato de tubo de 14 ml.

A. Ensayo de 96 pozos

Antes de evaluar la actividad de los sobrenadante, los sobrenadantes se trataron con un agente de procesamiento para activar la forma zimógena inactiva en una enzima activa. Brevemente, 4 µl de cada sobrenadante mutante hMMP-1 generado en el Ejemplo 27 se agregó hasta 100 µl de TCNB (Tris 50 nM, $CaCl_2$ 10 mM, NaCl 150 mM, Brij 35 al 0.05%, pH 7.5) con 1 mM del acetato de p-aminofenilmercúrico del agente de procesamiento (APMA, por sus siglas en inglés) en una placa de 96 pozos. La solución se incubó a la temperatura de reacción (ya sea 25°C o 37°C) durante 2 horas. Esta etapa de activación desdobla el pro-péptido y genera el hMMP-1 maduro.

Después de la activación, 1.6 µl de TCNB que contiene sustrato fluorescente Mca-K-P-L-G-L-Dpa-A-R-NH_2 620µM se agregó a cada pozo a una concentración final de 10 µM, en la temperatura de reacción indicada (ya sea 25°C o 37°C) durante 1 hora. La fluorescencia se detectó al medir la fluorescencia en un lector de placa fluorescente en excitación 320 nm/emisión 405 nm. Las unidades de fluorescencia relativas (RFU) se determinaron. El sobrenadante de células transformadas de plásmido/vector y hMMP-1 de tipo natural se usaron como controles positivos y negativos. Las reacciones duplicadas se realizaron para cada muestra, temperatura de reacción, y control positivo y negativo.

De la selección inicial de 2687 mutantes hMMP-1, 199 éxitos primarios supuestos se identificaron (ver Tabla 22) con actividad reducida a 37°C. Estos mutantes hMMP-1 se volvieron a separar por exclusión, usando el mismo ensayo, y 104 éxitos primarios se confirmaron (ver Tabla 23, a continuación). Los mutantes hMMP-1 que fueron activos a 25°C y tienen al menos una disminución al 16% en la actividad a 37°C (por ejemplo, la relación de las actividades a 25°C o 37°C (25°C/37°C) es mayor que o igual a 1.2) se consideraron para confirmarse los éxitos sensibles a la temperatura primarios. La Tabla 22, a continuación, enlista la mutación hMMP-1, el RFU promedio a 25°C y 37°C, y la relación de las actividades (25°C/37°C). La tabla también enlista el fenotipo de temperatura: ABAJO, indica que la relación (25°C/37°C) de la actividad del mutante se disminuye comparado con la relación (25°C/37°C) de la actividad del tipo natural, esto es disminuye mayor que 16% de la actividad del tipo natural; NEUTRO, indica que la relación (25°C/37°C) de la actividad del mutante es similar a la relación (25°C/37°C) de la actividad de tipo natural, esto es dentro del 16% de la actividad del tipo natural; y ARRIBA, indica que la relación (25°C/37°C) de la actividad del mutante se incrementa comparada con la relación (25°C/37°C) de la actividad del tipo natural, esto es incrementa más del 16% de la actividad del tipo natural.

La Tabla 22, a continuación, también enlista las actividades residuales en 25°C y 37°C, como se compara con el hMMP-1 de tipo natural. La actividad residual es la relación de la actividad mutante hMMP-1 contra la actividad hMMP-1 de tipo

natural en la temperatura indicada, ya sea 25°C o 37°C. Varios de los mutantes hMMP-1 tienen actividades que fueron comparables con, o mayores que, hMMP-1 de tipo natural a 25°C mientras que todos muestran actividades disminuidas a 37°C, por ello reconfirmando su actividad disminuida en temperaturas elevadas.

Tabla 22. Resultados de la Selección Inicial para Mutantes hMMP-1 Sensibles a Temperatura

Fenotipo de temperatura	Mutación hMMP-1	SEQ ID NO	RFU promedio 25 °C	RFU promedio 37 °C	Relación 25°C/ 37°C	Actividad residual 25 °C	Actividad residual Mut/p 37 °C
Neutro	T84F	479	6312.72	6453.46	0.98	1.10	1.27
Neutro	E85F	480	6092.47	6362.37	0.96	1.06	1.26
Arriba	L95K	328	1333.28	1191.46	1.12	0.15	0.14
Abajo	L95I	329	1707.98	2294.02	0.74	0.30	0.45
Abajo	R98D	481	2905.96	3867.31	0.75	0.33	0.47
Abajo	I99Q	482	3318.21	4623.91	0.72	0.37	0.56
Abajo	E100V	457	3980.72	5009.20	0.79	1.26	1.01
Neutro	E100R	451	7410.11	7964.52	0.93	0.83	0.96
Neutro	E100S	454	3768.09	4664.58	0.81	0.42	0.56
Neutro	E100T	453	6985.28	7478.12	0.93	0.79	0.90
Neutro	E100F	455	6709.27	7436.60	0.90	0.75	0.90
Neutro	E100I	456	8824.19	8458.79	1.04	0.99	1.02
Neutro	E100N	452	8809.68	8215.63	1.07	0.99	0.99
Neutro	T103Y	458	1181.09	1423.76	0.83	0.37	0.29
Neutro	P104A	484	8861.30	8360.82	1.06	1.00	1.01
Arriba	P104M	483	6709.44	7118.65	0.94	0.88	0.75
Arriba	D105A	340	2674.16	1227.06	2.18	0.65	0.24
Arriba	D105F	336	2009.56	1221.58	1.65	0.49	0.24
Arriba	D105G	335	2407.89	1686.68	1.43	0.58	0.34
Arriba	D105I	338	1732.38	1105.99	1.57	0.42	0.22
Arriba	D105L	339	1563.61	859.56	1.82	0.38	0.17
Arriba	D105N	332	3766.72	1475.08	2.55	0.91	0.29
Arriba	D105R	331	3892.02	2016.90	1.93	0.94	0.40
Arriba	D105S	334	3646.49	2727.22	1.34	0.88	0.54
Arriba	D105T	333	2513.64	1729.46	1.45	0.61	0.34
Arriba	D105W	337	2565.93	1855.05	1.38	0.62	0.37
Neutro	D105E	330	4000.92	3366.64	1.19	0.59	0.45
Neutro	L106C	485	2995.56	3678.33	0.81	0.34	0.44
Neutro	L106S	486	2730.64	2899.36	0.94	0.31	0.35

Neutro	A109H	487	7206.01	7536.96	0.96	0.81	0.91
Neutro	D110A	488	4179.59	5112.44	0.82	0.47	0.62
Neutro	V111R	489	2401.69	2925.16	0.82	0.27	0.35
Neutro	D112S	490	7203.69	7600.93	0.95	0.81	0.92
Neutro	A118T	491	745.83	665.63	1.12	0.13	0.13
Abajo	S123V	492	3220.29	4504.25	0.71	0.41	0.60
Neutro	N124D	493	6218.73	6620.92	0.94	0.92	0.88
Neutro	T126S	494	7114.42	6856.69	1.04	1.06	0.91
Arriba	G147P	495	494.94	392.93	1.26	0.07	0.05
Arriba	R150P	345	2291.14	828.28	2.77	0.31	0.12
Neutro	R150V	344	6869.28	6604.61	1.04	1.20	1.30
Neutro	R150D	341	7230.41	6033.28	1.20	1.26	1.19
Abajo	R150I	343	3120.05	4082.34	0.76	0.39	0.55
Neutro	R150H	342	8281.04	8056.17	1.03	1.05	1.08
Arriba	D151G	346	1073.32	733.89	1.46	0.20	0.11
Neutro	N152A	497	6669.94	5660.16	1.18	1.17	1.12
Abajo	N152S	496	4607.85	8096.31	0.57	0.58	1.08
Neutro	S153T	459	10530.07	8798.72	1.20	1.44	1.24
Arriba	F155L	347	1322.13	864.19	1.53	0.25	0.13
Arriba	F155A	348	1250.93	760.12	1.65	0.23	0.11
Arriba	D156H	349	2722.09	2081.55	1.31	0.51	0.31
Arriba	D156L	356	2548.30	1597.53	1.60	0.48	0.24
Arriba	D156A	357	2679.29	1734.45	1.54	0.50	0.26
Arriba	D156W	354	1575.39	1268.36	1.24	0.30	0.19
Arriba	D156V	355	1400.88	766.80	1.83	0.26	0.11
Arriba	D156K	350	1292.89	966.62	1.34	0.24	0.14
Arriba	D156T	352	2871.09	1843.03	1.56	0.54	0.27
Arriba	D156R	351	2431.23	1545.89	1.57	0.46	0.23
Arriba	D156M	353	817.96	502.82	1.63	0.12	0.07
Neutro	P158T	500	4204.23	3507.76	1.20	0.53	0.47
Neutro	P158G	501	6277.86	5496.27	1.14	0.79	0.73
Neutro	P158K	498	6860.82	6680.30	1.03	0.87	0.89
Neutro	P158N	499	3656.04	3874.48	0.94	0.46	0.52
Arriba	G159V	363	2453.98	732.46	3.35	0.34	0.10
Arriba	G159T	359	5059.91	1734.12	2.92	0.69	0.24
Arriba	G159M	360	5905.06	4874.00	1.21	0.75	0.65
Neutro	G159I	362	5725.99	5357.20	1.07	0.72	0.72
Neutro	G159W	361	6787.40	6287.71	1.08	0.86	0.84
Neutro	G159L	364	8231.62	7638.64	1.08	1.04	1.02
Neutro	G159C	358	2897.77	3053.86	0.95	0.37	0.41
Neutro	P170D	502	1434.38	1462.91	0.98	0.25	0.29
Neutro	P170A	503	2733.72	2793.24	0.98	0.48	0.55
Arriba	G171P	462	1570.74	1204.39	1.30	0.27	0.17
Neutro	G171E	461	1154.96	1199.65	0.96	0.20	0.24
Neutro	G171D	460	791.81	690.33	1.15	0.14	0.14
Arriba	A176F	365	10486.82	6516.31	1.61	1.31	0.78
Neutro	A176W	366	482.38	414.85	1.16	0.06	0.06

Neutro	F178T	504	560.54	487.01	1.15	0.10	0.10
Arriba	F178L	505	1788.95	1314.38	1.36	0.31	0.26
Arriba	D179N	368	2433.73	812.01	3.00	0.26	0.10
Arriba	D179V	369	604.63	490.35	1.23	0.11	0.10
Arriba	D179C	367	613.81	503.76	1.22	0.11	0.10
Arriba	E180Y	374	6655.19	5379.42	1.24	0.72	0.63
Neutro	E180R	371	6932.51	6309.81	1.10	0.75	0.74
Arriba	E180T	373	3718.16	2425.13	1.53	0.40	0.29
Arriba	E180F	377	7014.78	5382.78	1.30	0.76	0.63
Arriba	E180G	376	5952.65	4547.28	1.31	1.04	0.90
Arriba	E180S	375	5217.80	3977.60	1.31	0.91	0.78
Arriba	E180N	372	6534.65	4843.84	1.35	1.14	0.96
Arriba	E180D	370	7738.70	6277.22	1.23	1.35	1.24
Neutro	D181T	380	6867.00	6057.09	1.13	0.74	0.71
Arriba	D181L	382	1727.20	1274.09	1.36	0.19	0.15
Arriba	D181K	378	1087.36	696.83	1.56	0.12	0.08
Arriba	D181C	379	549.29	447.40	1.23	0.10	0.09
Arriba	D181G	381	2764.20	2056.56	1.34	0.48	0.41
Arriba	E182T	384	2995.97	1779.42	1.68	0.32	0.21
Arriba	E182Q	383	1393.28	804.84	1.73	0.15	0.09
Arriba	E182M	386	649.73	524.43	1.24	0.11	0.10
Neutro	E182G	385	604.92	543.78	1.11	0.11	0.11
Arriba	R183G	507	7326.36	6021.39	1.22	1.28	1.19
Arriba	R183S	506	7896.17	6240.74	1.27	1.38	1.23
Arriba	T185R	390	1728.04	851.07	2.03	0.20	0.10
Arriba	T185Y	392	937.75	540.66	1.73	0.11	0.07
Arriba	T185H	389	1448.04	783.89	1.85	0.17	0.10
Arriba	T185G	393	3922.30	1990.15	1.97	0.46	0.24
Arriba	T185V	394	1648.14	897.66	1.84	0.19	0.11
Arriba	T185Q	391	1594.81	583.93	2.73	0.19	0.07
Arriba	T185A	395	1599.64	711.08	2.25	0.19	0.09
Arriba	T185E	388	1324.02	703.76	1.88	0.16	0.09
Neutro	T185D	387	485.86	418.67	1.16	0.06	0.06
Arriba	N187R	398	1042.36	709.74	1.47	0.12	0.09
Arriba	N187M	402	1731.67	995.07	1.74	0.20	0.12
Neutro	N187W	403	1694.86	1425.68	1.19	0.20	0.17
Arriba	N187F	401	1240.41	731.98	1.69	0.15	0.09
Arriba	N187K	397	2331.93	1140.19	2.05	0.27	0.14
Arriba	N187I	404	1444.98	683.03	2.12	0.17	0.08
Arriba	N187A	405	4379.80	2616.49	1.67	0.52	0.32
Neutro	N187G	400	535.06	514.10	1.04	0.07	0.07
Neutro	N187C	399	1804.28	1860.67	0.97	0.23	0.25
Neutro	N187H	396	1143.07	1071.67	1.07	0.14	0.14
Arriba	F188V	508	7116.29	5860.00	1.21	1.24	1.16
Neutro	R189N	509	7842.39	6675.36	1.17	1.37	1.32
Neutro	R189T	511	7610.10	6459.94	1.18	1.33	1.27
Neutro	R189Q	510	7465.37	6396.79	1.17	1.30	1.26

Arriba	E190G	465	5313.99	4365.93	1.22	0.75	0.48
Arriba	E190Y	464	7243.54	5742.33	1.26	1.27	1.13
Arriba	E190D	463	7910.21	6468.78	1.22	1.38	1.28
Arriba	Y191V	466	1553.58	1254.11	1.24	0.19	0.14
Arriba	N192H	468	2274.24	1058.80	2.15	0.32	0.12
Arriba	N192S	470	2043.65	1630.74	1.25	0.29	0.18
Arriba	N192D	467	4213.33	2216.40	1.90	0.59	0.24
Arriba	N192C	469	1310.46	987.31	1.33	0.18	0.11
Neutro	H194P	471	5264.79	5058.19	1.04	0.74	0.56
Arriba	R195C	407	4231.32	1853.20	2.28	0.60	0.20
Neutro	R195W	410	5099.23	4524.84	1.13	0.72	0.50
Neutro	R195L	412	5073.57	4520.73	1.12	0.72	0.50
Arriba	R195G	409	5269.21	3025.93	1.74	0.74	0.33
Arriba	R195Q	408	1958.69	1361.83	1.44	0.28	0.15
Arriba	R195A	413	5605.90	3852.81	1.46	0.79	0.42
Arriba	R195D	406	2724.53	1907.81	1.43	0.38	0.21
Arriba	R195V	411	1711.48	1037.62	1.65	0.24	0.11
Arriba	A197C	512	4012.80	3140.52	1.28	0.70	0.62
Neutro	A198G	414	2610.82	2368.26	1.10	0.37	0.26
Arriba	A198L	416	1339.94	726.74	1.84	0.19	0.08
Arriba	A198M	415	1384.46	999.55	1.39	0.20	0.11
Arriba	G206A	418	4554.61	2702.11	1.69	0.47	0.30
Arriba	G206S	417	1226.37	919.66	1.33	0.13	0.10
Arriba	L207R	472	3476.88	1332.44	2.61	0.36	0.15
Neutro	L207V	475	656.95	550.54	1.19	0.08	0.07
Neutro	L207I	474	645.37	550.32	1.17	0.08	0.07
Arriba	L207G	473	610.01	484.35	1.26	0.08	0.06
Neutro	S208R	513	7639.06	6465.10	1.18	1.34	1.28
Arriba	S208L	514	7811.78	6354.14	1.23	1.37	1.25
Arriba	S210V	419	1190.35	856.63	1.39	0.29	0.17
Neutro	S210A	420	1682.05	1546.97	1.09	0.25	0.21
Neutro	T211L	515	2376.23	2102.07	1.13	0.35	0.28
Arriba	D212G	477	1011.62	657.28	1.54	0.24	0.13
Neutro	D212H	476	4696.49	4001.41	1.17	0.70	0.53
Arriba	Y218S	421	3702.49	3099.73	1.19	0.58	0.43
Arriba	F223C	424	3115.11	2488.91	1.25	0.53	0.35
Arriba	F223E	422	7194.34	5884.03	1.22	1.22	0.83
Arriba	F223G	426	3236.56	2599.04	1.25	0.55	0.36
Arriba	F223A	428	5226.86	3982.92	1.31	0.89	0.56
Arriba	F223S	425	6006.80	4916.07	1.22	1.02	0.69
Neutro	F223K	423	4021.97	3712.91	1.08	0.60	0.49
Neutro	F223M	427	525.66	441.29	1.19	0.08	0.06
Arriba	V227C	433	4040.96	3278.65	1.23	0.68	0.46
Arriba	V227D	429	1190.09	731.34	1.63	0.20	0.10
Arriba	V227E	430	5381.63	2605.20	2.07	0.91	0.37
Arriba	V227L	438	4883.98	4000.68	1.22	0.83	0.56
Arriba	V227S	435	3863.33	3131.47	1.23	0.65	0.44

Arriba	V227W	437	1845.46	1374.06	1.34	0.31	0.19
Neutro	V227G	436	1040.74	883.01	1.18	0.15	0.12
Arriba	V227H	431	689.20	504.65	1.37	0.10	0.07
Arriba	V227Q	434	696.97	506.11	1.38	0.10	0.07
Neutro	V227R	432	664.31	561.06	1.18	0.10	0.07
Arriba	Q228P	439	2862.74	1291.55	2.22	1.33	0.44
Arriba	L229A	442	2627.78	2118.07	1.24	1.22	0.72
Arriba	L229T	440	3780.54	1464.25	2.58	1.75	0.50
Arriba	L229I	441	1158.56	828.94	1.40	0.54	0.28
Arriba	A230V	478	5030.94	3433.18	1.47	2.33	1.17
Arriba	D233E	443	2881.17	1918.57	1.50	1.33	0.65
Arriba	I234A	447	1458.10	1018.50	1.43	0.31	0.18
Arriba	I234T	446	1451.51	1188.67	1.22	0.31	0.21
Arriba	I234E	444	1301.06	840.09	1.55	0.27	0.15
Arriba	I234Q	445	1095.18	837.53	1.31	0.23	0.15
Arriba	I237L	518	2880.14	2240.61	1.29	0.61	0.39
Abajo	I237W	517	4188.38	5663.94	0.74	0.62	0.75
Neutro	I237N	516	5368.49	6271.59	0.86	0.80	0.83
Arriba	I240S	449	2033.91	1204.66	1.69	0.32	0.15
Neutro	I240A	450	2099.13	1776.41	1.18	0.33	0.23
Arriba	I240C	448	970.78	650.04	1.49	0.15	0.08
Neutro	I251S	519	8445.88	7160.96	1.18	1.07	0.96
Neutro	I251W	520	7305.95	6974.26	1.05	0.92	0.93
Neutro	Q254S	521	7768.13	8801.19	0.88	1.15	1.17
Neutro	T255H	522	8243.01	7352.60	1.12	1.22	0.98
Neutro	P256C	523	4674.45	4633.67	1.01	0.69	0.62
Neutro	K257P	525	8039.60	7464.88	1.08	1.19	0.99
Neutro	K257T	524	9346.88	8849.42	1.06	1.39	1.18
Neutro	A258P	526	10414.06	9178.82	1.13	1.55	1.22

TABLA 23: HITs reconfirmados

Fenotipo de temperatura	Mutación hMMP-1	SEQ ID NO
Arriba	L95K	328
Abajo	E100V	457
Neutro	T103Y	458
Arriba	D105A	340
Arriba	D105F	336
Arriba	D105G	335
Arriba	D105I	338
Arriba	D105L	339
Arriba	D105N	332
Arriba	D105R	331
Arriba	D105S	334
Arriba	D105T	333

Arriba	D105W	337
Arriba	R150P	345
Arriba	D151G	346
Neutral	S153T	459
Arriba	F155L	347
Arriba	F155A	348
Arriba	D156H	349
Arriba	D156L	356
Arriba	D156A	357
Arriba	D156W	354
Arriba	D156V	355
Arriba	D156K	350
Arriba	D156T	352
Arriba	D156R	351
Arriba	G159V	363
Arriba	G159T	359
Arriba	G171P	462
Arriba	A176F	365
Arriba	D179N	368
Arriba	E180Y	374
Neutro	E180R	371
Arriba	E180T	373
Arriba	E180F	377
Neutro	D181T	380
Arriba	D181L	382
Arriba	D181K	378
Arriba	E182T	384
Arriba	E182Q	383
Arriba	T185R	390
Arriba	T185Y	392
Arriba	T185H	389
Arriba	T185G	393
Arriba	T185V	394
Arriba	T185Q	391
Arriba	T185A	395
Arriba	T185E	388
Arriba	N187R	398
Arriba	N187M	402
Neutro	N187W	403
Arriba	N187F	401
Arriba	N187K	397
Arriba	N187I	404
Arriba	N187A	405
Arriba	E190G	465
Arriba	Y191V	466
Arriba	N192H	468
Arriba	N192S	470

Arriba	N192D	467
Arriba	N192C	469
Neutro	H194P	471
Arriba	R195C	407
Neutro	R195W	410
Neutro	R195L	412
Arriba	R195G	409
Arriba	R195Q	408
Arriba	R195A	413
Arriba	R195D	406
Arriba	R195V	411
Neutro	A198G	414
Arriba	A198L	416
Arriba	A198M	415
Arriba	G206A	418
Arriba	G206S	417
Arriba	L207R	472
Arriba	S210V	419
Arriba	D212G	477
Arriba	Y218S	421
Arriba	F223C	424
Arriba	F223E	422
Arriba	F223G	426
Arriba	F223A	428
Arriba	F223S	425
Arriba	V227C	433
Arriba	V227D	429
Arriba	V227E	430
Arriba	V227L	438
Arriba	V227S	435
Arriba	V227W	437
Arriba	Q228P	439
Arriba	L229A	442
Arriba	L229T	440
Arriba	L229I	441
Arriba	A230V	478
Arriba	D233E	443
Arriba	I234A	447
Arriba	I234T	446
Arriba	I234E	444
Arriba	I234Q	445
Arriba	I237L	518
Arriba	I240S	449
Neutro	I240A	450
Arriba	I240C	448

B. Expresión de proteína 14-mL

En este ejemplo, los mutantes hMMP-1 que se identificaron como éxitos primarios sensibles a la temperatura en el Ejemplo 28A se expresaron en 14 ml de tubos de cultivos y su actividad

enzimática se midió a 25°C, 34°C y 37°C durante 1 hora, 2 horas o durante la noche con objeto de verificar el fenotipo deseado de la actividad disminuida a temperaturas elevadas. La proteína se expresó y purificó como en el Ejemplo 27 con la excepción de que la expresión se realizó en tubos de 14 ml en vez de una placa de 96 pozos.

Cuatro (4) µl de cada sobrenadante mutante hMMP-1 se transfirió a una microplaca de 96 pozos. Los sobrenadantes se activaron con APMA como se describe en el Ejemplo 28A arriba, excepto que la solución se incubó a la temperatura de reacción de 25°C, 34°C, o 37°C durante 2 horas. Como arriba, después de la activación, 100 µl de TCNB que contiene 10 µM de sustrato fluorescente Mca-K-P-L-G-L-Dpa-A-R-NH_2 se agregó a cada tubo en la temperatura de reacción indicada (25°C, 34°C o 37°C) durante una hora. El hMMP-1 de tipo natural se usó como un control positivo y el sobrenadante de células transformadas con el vector se usó como un control negativo. La fluorescencia se detectó al medir la fluorescencia en un lector de placa fluorescente en excitación 320 nm/emisión 405 nm. Las unidades de fluorescencia relativas (RFU) se determinaron. Las reacciones duplicadas se realizaron para cada muestra, temperatura de reacción, y control positivo y negativo. Los datos se muestran en la Tabla 24A (1 hora de incubación); Tabla 24B (2 horas de incubaciones) y Tabla 24C (durante la noche incubación), a continuación. Los mutantes que fueron activos a 25°C pero demuestran al menos una actividad disminuida al 33% a 34°C o 37°C (esto es tienen una relación de actividad a 25°C y 34°C o una relación de actividad de 25°C y 37°C igual a o mayor que 1.5 bajo cualquiera de las condiciones de punto de tiempo probadas se

identificaron como éxitos sensibles a la temperatura. Las Tablas 24A-24C, a continuación, enlistan la mutación hMMP-1, la RFU a 25°C, 34°C y 37°C, y la relación de las actividades (en tanto 25°C/34°C y 25°C/37°C) de 64 mutantes hMMP-1 cuya actividad enzimática disminuida a temperaturas elevadas se confirmaron. Algunos de los mutantes hMMP-1, fueron perceptibles más activos a 25°C que a una temperatura elevada. Por ejemplo, el mutante hMMP-1 D179N (SEQ ID NO: 368) fue 87.5% más activo a 25°C que a 37°C después de una incubación durante la noche (ver por ejemplo Tabla 24C). Adicionalmente, aunque los niveles de expresión, y por lo tanto valores RFU generales, varían en experimentos diferentes, las relaciones de las actividades siguen siendo las mismas. Por ejemplo, el D156T mutante se probó dos veces (ver Tabla 24C a continuación) y aunque cada prueba da valores RFU de datos diferentes la relación de los valores fueron similares y consistentemente dentro del parámetro de la relación 1.5.

Tabla 24A. Mutantes hMMP-1 sensibles a la temperatura, 1 hora de incubación						
Mutación hMMP-1	SEQ ID NO	RFU 25 °C	RFU 34 °C	RFU 37 °C	Relación 25°C/ 34°C	Relación 25°C/ 37°C
L95K	328	2677.64	553.00	572.70	4.84	4.68
D105A	340	3496.48	697.79	1119.92	5.01	3.12
D105F	336	1749.85	554.69	685.49	3.15	2.55
D105G	335	7450.35	2196.32	3514.50	3.39	2.12
D105I	338	4720.96	638.42	943.44	7.39	5.00
D105L	339	2636.80	490.04	552.90	5.38	4.77
D105N	332	7487.95	776.33	1513.73	9.65	4.95
D105R	331	1732.70	641.23	736.92	2.70	2.35
D105S	334	8637.40	3782.36	6510.05	2.28	1.33
D105W	337	4263.51	1321.69	2422.77	3.23	1.76
D105T	333	2666.45	770.72	1685.33	3.46	1.58
R150P	345	7568.19	1678.59	2010.33	4.51	3.76
D151G	346	973.47	517.98	595.63	1.88	1.63
F155A	348	1800.92	592.07	596.31	3.04	3.02
D156K	350	8718.91	1733.90	1839.60	5.03	4.74
D156T	352	8034.06	2216.02	2255.25	3.63	3.56
D156L	356	1825.01	528.43	619.10	3.45	2.95
D156A	357	1495.21	450.17	496.04	3.32	3.01
D156W	354	1006.97	463.48	493.84	2.17	2.04
D156V	355	1140.60	484.30	504.38	2.36	2.26
D156T	352	2796.00	581.90	743.53	4.80	3.76
D156H	349	3489.60	578.59	711.59	6.03	4.90
D156R	351	4983.67	678.23	734.95	7.35	6.78
G159V	363	3416.77	705.80	739.87	4.84	4.62
G159T	359	4081.99	1732.63	1865.15	2.36	2.19
A176F	365	967.31	539.31	517.16	1.79	1.87
D179N	368	4105.85	492.00	513.37	8.35	8.00
E180Y	374	8803.90	3904.31	5268.18	2.25	1.67
E180T	373	5957.38	1155.89	1430.72	5.15	4.16
E180F	377	7484.41	2677.89	3141.69	2.79	2.38
D181L	382	1629.22	559.04	549.09	2.91	2.97
D181K	378	844.40	570.98	569.44	1.48	1.48
E182T	384	2244.96	653.93	668.01	3.43	3.36
E182Q	383	1066.68	583.87	582.84	1.83	1.83
T185R	390	1599.19	867.00	872.66	1.84	1.83
T185H	389	3616.30	1601.20	1842.01	2.26	1.96
T185Q	391	4365.21	1512.02	1899.46	2.89	2.30
T185A	395	1374.00	567.04	608.05	2.42	2.26
T185E	388	2145.28	1263.20	1399.76	1.70	1.53
N187R	398	1659.90	955.75	1054.91	1.74	1.57

N187M	402	2842.50	1343.95	1464.36	2.12	1.94
N187F	401	1846.10	716.62	786.07	2.58	2.35
N187K	397	2428.31	1703.73	1914.84	1.43	1.27
N187I	404	2455.44	717.51	773.59	3.42	3.17
R195V	411	3121.02	1947.80	2132.94	1.60	1.46
A198L	416	4547.61	1570.19	2061.87	2.90	2.21
A198M	415	1948.92	1101.86	1535.22	1.77	1.27
G206A	418	667.50	543.90	540.79	1.23	1.23
G206S	417	608.46	427.44	412.07	1.42	1.48
S210V	419	1952.12	961.54	1791.55	2.03	1.09
Y218S	421	1674.47	1531.03	1573.00	1.09	1.06
F223E	422	5837.16	2747.99	4955.08	2.12	1.18
V227C	433	1138.96	684.05	722.68	1.67	1.58
V227E	430	5892.76	653.81	803.12	9.01	7.34
V227W	437	716.50	607.92	646.75	1.18	1.11
Q228P	439	676.11	488.99	495.88	1.38	1.36
L229T	440	768.59	492.66	491.49	1.56	1.56
L229I	441	1470.04	753.87	1231.17	1.95	1.19
D233E	443	1195.07	959.25	1056.45	1.25	1.13
I234A	447	1402.15	1014.61	1127.63	1.38	1.24
I234T	446	857.79	644.52	712.49	1.33	1.20
I234E	444	2281.82	591.10	762.52	3.86	2.99
I240S	449	2678.36	776.88	1314.40	3.45	2.04
I240C	448	1540.91	474.82	666.63	3.25	2.31

Table 24B. Temperature Sensitive hMMP-1 Mutants, 2 hours incubation

hMMP-1 mutation	SEQ ID NO	RFU 25 °C	RFU 34 °C	RFU 37 °C	Ratio 25°C/ 34°C	Ratio 25°C/ 37°C
L95K	328	4650.42	748.29	746.89	6.21	6.23
D105A	340	5669.31	824.07	1336.14	6.88	4.24
D105F	336	2980.00	623.89	818.63	4.78	3.64
D105G	335	8821.81	2759.24	4313.40	3.20	2.05
D105I	338	6832.34	780.32	1110.07	8.76	6.15
D105L	339	4206.38	534.24	607.46	7.87	6.92
D105N	332	8920.05	918.13	1727.44	9.72	5.16
D105R	331	2821.20	722.46	813.68	3.90	3.47
D105S	334	9355.63	4607.18	7274.97	2.03	1.29
D105W	337	6663.80	1690.93	3081.59	3.94	2.16
D105T	333	4457.16	974.63	2220.03	4.57	2.01
R150P	345	8750.30	2315.11	2497.86	3.78	3.50
D151G	346	1264.62	589.27	616.51	2.15	2.05
F155A	348	2824.01	779.72	746.59	3.62	3.78
D156K	350	8576.47	2210.63	2310.30	3.88	3.71
D156T	352	8727.27	2679.17	2752.35	3.26	3.17
D156L	356	2916.24	576.84	688.08	5.06	4.24

Tabla 24B. Mutantes hMMP-1 sensibles a la temperatura, 2 horas de incubación

Mutación hMMP-1 **Relación** **Relación**

000405

D156A	357	2299.63	533.68	554.21	4.31	4.15
D156W	354	1502.86	539.74	575.12	2.78	2.61
D156V	355	1593.06	534.71	542.36	2.98	2.94
D156T	352	4469.68	690.87	848.14	6.47	5.27
D156H	349	5387.79	698.77	819.82	7.71	6.57
D156R	351	7020.81	793.83	872.40	8.84	8.05
G159V	363	4673.44	856.78	838.46	5.45	5.57
G159T	359	6704.95	2294.40	2347.74	2.92	2.86
A176F	365	1609.85	654.43	618.72	2.46	2.60
D179N	368	5660.69	644.51	656.31	8.78	8.63
E180Y	374	8557.09	4979.24	6079.36	1.72	1.41
E180T	373	7870.99	1532.35	1794.15	5.14	4.39
E180F	377	8508.13	3597.75	3975.22	2.36	2.14
D181L	382	2710.97	619.39	611.92	4.38	4.43
D181K	378	1130.63	625.01	608.68	1.81	1.86
E182T	384	3702.08	791.23	826.28	4.68	4.48
E182Q	383	1331.50	639.84	623.11	2.08	2.14
T185R	390	2637.31	1187.63	1183.37	2.22	2.23
T185H	389	5593.77	2278.26	2534.15	2.46	2.21
T185Q	391	7006.87	2250.58	2642.74	3.11	2.65
T185A	395	2474.96	663.82	707.09	3.73	3.50
T185E	388	3948.43	2088.15	2091.32	1.89	1.89
N187R	398	3006.08	1352.97	1421.87	2.22	2.11
N187M	402	4934.44	1811.35	1893.07	2.72	2.61
N187F	401	3227.96	877.21	931.04	3.68	3.47
N187K	397	4182.49	2425.34	2652.79	1.72	1.58
N187I	404	4218.55	849.11	887.80	4.97	4.75
R195V	411	4847.81	2724.92	2984.10	1.78	1.62
A198L	416	6756.76	2056.50	2642.76	3.29	2.56
A198M	415	3777.50	1708.61	2155.58	2.21	1.75
G206A	418	872.27	603.01	586.57	1.45	1.49
G206S	417	932.69	492.65	463.60	1.89	2.01
S210V	419	3349.95	1249.47	2314.86	2.68	1.45
Y218S	421	2878.50	2373.98	2350.27	1.21	1.22
F223E	422	8318.70	3685.68	6209.93	2.26	1.34
V227C	433	1998.67	950.01	992.19	2.10	2.01
V227E	430	7904.54	839.00	1015.12	9.42	7.79
V227W	437	996.55	729.20	787.87	1.37	1.26
Q228P	439	1082.56	607.78	586.63	1.78	1.85
L229T	440	1221.05	580.15	564.49	2.10	2.16
L229I	441	2790.27	1050.86	1803.44	2.66	1.55
D233E	443	2195.02	1393.95	1454.71	1.57	1.51
I234A	447	2375.42	1473.70	1594.08	1.61	1.49
I234T	446	1199.18	713.83	796.81	1.68	1.50
I234E	444	3920.02	705.86	923.57	5.55	4.24
I240S	449	3867.71	973.97	1575.05	3.97	2.46
I240C	448	2688.75	561.91	853.66	4.78	3.15

Tabla 24C. Mutantes hMMP-1 sensibles a la temperatura, durante la noche de incubación

Mutación hMMP-1	SEQ ID NO	RFU 25 °C	RFU 34 °C	RFU 37 °C	Relación 25°C/ 34°C	Relación 25°C/ 37°C
L95K	328	7744.34	1803.12	1677.96	4.29	4.62
D105A	340	8466.62	1302.84	1931.17	6.50	4.38
D105F	336	6725.59	938.60	1173.23	7.17	5.73
D105G	335	8940.06	3560.75	5390.32	2.51	1.66
D105I	338	8394.32	1614.57	1958.96	5.20	4.29
D105L	339	6546.78	957.95	1070.51	6.83	6.12
D105N	332	9119.04	1459.16	2347.74	6.25	3.88
D105R	331	5775.25	1407.06	1499.57	4.10	3.85
D105S	334	9300.85	5584.70	8234.95	1.67	1.13
D105W	337	8617.36	2851.22	4593.06	3.02	1.88
D105T	333	7910.47	1899.25	3292.01	4.17	2.40
R150P	345	9011.11	3533.16	3559.66	2.55	2.53
D151G	346	1956.65	959.80	1097.68	2.04	1.78
F155A	348	4891.89	2016.76	1843.31	2.43	2.65
D156K	350	8696.27	3968.92	3858.90	2.19	2.25
D156T	352	8972.20	3971.43	3854.84	2.26	2.33
D156L	356	5254.55	972.64	1232.94	5.40	4.26
D156A	357	3585.37	1098.25	1110.73	3.26	3.23
D156W	354	2570.24	1091.27	1206.22	2.36	2.13
D156V	355	2208.99	954.21	997.64	2.31	2.21
D156T	352	7229.28	1256.02	1540.11	5.76	4.69
D156H	349	7587.19	1451.49	1763.27	5.23	4.30
D156R	351	8622.23	1735.02	1846.71	4.97	4.67
G159V	363	6555.27	1821.53	1683.20	3.60	3.89
G159T	359	9105.95	3210.57	3160.07	2.84	2.88
A176F	365	4191.69	1414.21	1336.32	2.96	3.14
D179N	368	7317.57	1504.84	1485.28	4.86	4.93
E180Y	374	9281.77	6080.89	6894.61	1.53	1.35
E180T	373	8475.04	2585.89	2809.15	3.28	3.02
E180F	377	9360.74	5183.25	5335.15	1.81	1.75
D181L	382	4534.34	1078.98	1000.80	4.20	4.53
D181K	378	1869.47	946.27	928.55	1.98	2.01
E182T	384	6752.25	1483.52	1496.55	4.55	4.51
E182Q	383	2212.75	1065.07	1035.24	2.08	2.14
T185R	390	6281.97	2425.71	2300.61	2.59	2.73
T185H	389	8531.85	3164.69	3515.59	2.70	2.43
T185Q	391	9044.23	3639.00	4012.93	2.49	2.25
T185A	395	6156.97	1110.68	1059.61	5.54	5.81
T185E	388	8479.18	3868.06	3892.33	2.19	2.18
N187R	398	7593.11	2415.63	2370.01	3.14	3.20

N187M	402	8605.76	2769.52	2720.28	3.11	3.16
N187F	401	7352.85	1612.23	1704.23	4.56	4.31
N187K	397	8667.36	3458.94	3709.62	2.51	2.34
N187I	404	8306.40	1459.25	1465.77	5.69	5.67
R195V	411	8634.05	4648.03	4960.91	1.86	1.74
A198L	416	8795.36	3469.36	4181.78	2.54	2.10
A198M	415	8352.73	3215.69	3637.79	2.60	2.30
G206A	418	2492.53	1038.14	974.96	2.40	2.56
G206S	417	2845.84	908.82	808.42	3.13	3.52
S210V	419	7104.17	2441.96	3939.90	2.91	1.80
Y218S	421	7740.61	4057.37	4093.29	1.91	1.89
F223E	422	9650.44	4849.58	7645.34	1.99	1.26
V227C	433	5833.84	2207.20	2432.82	2.64	2.40
V227E	430	8630.90	2283.07	2152.81	3.78	4.01
V227W	437	3070.92	1370.13	1456.45	2.24	2.11
Q228P	439	3673.33	1162.95	1081.32	3.16	3.40
L229T	440	3543.75	1103.34	1030.05	3.21	3.44
L229I	441	7333.92	1832.18	3268.93	4.00	2.24
D233E	443	6694.93	2570.71	2661.43	2.60	2.52
I234A	447	6250.56	3890.90	4043.80	1.61	1.55
I234T	446	3507.08	1099.58	1228.23	3.19	2.86
I234E	444	7541.73	1365.08	1901.96	5.52	3.97
I240S	449	4376.99	2108.15	2592.19	2.08	1.69
I240C	448	6170.51	1174.96	2223.23	5.25	2.78

La Tabla 25 a continuación describe la actividad residual (la relación de mutante hMMP-1 RFU/p hMMP-1 RFU) de los mutantes hMMP-1 seguidos de incubación durante la noche con el péptido fluorescente. La actividad de mutantes a 25°C, 34°C, o 37°C se compararon con la actividad de hMMP-1 de tipo natural en las temperaturas respectivas. A 25°C, cinco mutantes hMMP-1 (E180F, E180Y, D156T, D156K, R150P) fueron más activos que hMMP-1 de tipo natural como se indica por una actividad residual >1. A temperaturas elevadas, todos de los mutantes hMMP-1 muestran una disminución general en la actividad cuando se comparan con hMMP-1 de tipo natural a la misma temperatura, de esta manera confirman el fenotipo de los mutantes hMMP-1 como mutantes sensibles a la temperatura.

Tabla 25. Actividad Residual de Mutantes Sensibles a la Temperatura hMMP-1 durante la noche de incubación

Mutación hMMP-1	SEQ ID NO	Actividad residual 25 °C	Actividad residual 34 °C	Actividad residual 37 °C
L95K	328	0.80	0.20	0.20
D105A	340	0.93	0.15	0.22
D105F	336	0.74	0.11	0.13
D105G	335	0.99	0.42	0.60
D105I	338	0.93	0.19	0.22
D105L	339	0.72	0.11	0.12
D105N	332	1.01	0.17	0.26
D105R	331	0.64	0.16	0.17
D105S	334	1.03	0.65	0.92
D105W	337	0.95	0.33	0.51
D105T	333	0.87	0.22	0.37
R150P	345	0.99	0.41	0.44
D151G	346	0.22	0.11	0.12
F155A	348	0.51	0.22	0.22
D156K	350	0.97	0.46	0.46
D156T	352	1.00	0.46	0.46
D156L	356	0.58	0.11	0.14
D156A	357	0.40	0.13	0.12
D156W	354	0.28	0.13	0.14
D156V	355	0.24	0.11	0.11
D156T	352	0.80	0.15	0.17
D156H	349	0.84	0.17	0.20
D156R	351	0.95	0.20	0.21
G159V	363	0.73	0.21	0.20
G159T	359	1.00	0.37	0.39
A176F	365	0.43	0.16	0.16
D179N	368	0.81	0.17	0.18
E180Y	374	1.02	0.70	0.85
E180T	373	0.93	0.30	0.35
E180F	377	1.03	0.60	0.66
D181L	382	0.50	0.12	0.12
D181K	378	0.21	0.11	0.11
E182T	384	0.74	0.17	0.18
E182Q	383	0.24	0.12	0.13
T185R	390	0.69	0.28	0.28
T185H	389	0.94	0.37	0.43
T185Q	391	1.00	0.42	0.49
T185A	395	0.68	0.13	0.13
T185E	388	0.93	0.45	0.48
N187R	398	0.84	0.28	0.29
N187M	402	0.95	0.32	0.33
N187F	401	0.81	0.19	0.21
N187K	397	0.95	0.40	0.46
N187I	404	0.92	0.17	0.18
R195V	411	0.96	0.54	0.59
A198L	416	0.98	0.40	0.49
A198M	415	0.87	0.36	0.42
G206A	418	0.27	0.12	0.12
G206S	417	0.31	0.10	0.10
S210V	419	0.78	0.29	0.44

Y218S	421	0.85	0.47	0.50
F223E	422	1.07	0.57	0.86
V227C	433	0.64	0.26	0.27
V227E	430	0.95	0.27	0.24
V227W	437	0.34	0.16	0.16
Q228P	439	0.38	0.13	0.13
L229T	440	0.37	0.12	0.12
L229I	441	0.76	0.20	0.38
D233E	443	0.69	0.28	0.31
I234A	447	0.69	0.45	0.45
I234T	446	0.39	0.13	0.14
I234E	444	0.83	0.16	0.21
I240S	449	0.48	0.25	0.29
I240C	448	0.68	0.14	0.25

C. Aciertos de Mutante Superior hMMP-1

Catorce (14) posiciones se identificaron en las posiciones de aciertos superiores: 95, 105, 150, 156, 159, 179, 180, 182, 185, 187, 198, 227, 234 y 240. Veintitrés (23) mutantes hMMP-1 en 14 posiciones se seleccionaron como aciertos superiores con base en dos criterios, incluyendo: 1) la relación de las actividades (25°C hasta 37°C y 25°C hasta 34°C); y 2) la actividad (en RFU). Todos de los mutantes enlistados en la Tabla 26 a continuación tienen una actividad mayor que 2000 y una relación de 25°C hasta 37°C mayor que 2. Los once Aciertos identificados como un ** son los Aciertos que están en el intervalo alto para tanto la relación o actividades y el nivel de actividad, y se usaron para desarrollar una colección combinatoria como se describe en el Ejemplo 29.

Tabla 26: Aciertos superiores

L95K**	D105I	D105N**	D105L
D105A	D105G	R150P**	D156R
D156H	D156K**	D156T**	G159V**
G159T	D179N**	E180T**	E180F
E182T	T185Q	N187I	A198L**
V227E**	I234E	I240S**	

000410

Ejemplo 29

Colección Variante hMMP-1 Combinatoria

En este ejemplo, una colección variante hMMP-1 combinatoria se generó de los mutantes seleccionados en el Ejemplo 28C y mostrados en la Tabla 26 con un asterisco doble. (**). Los mutantes en las posiciones 182, 185 y 187 se excluyeron en la generación de la colección combinatoria debido a la importancia de estas posiciones para la actividad catalítica hMMP-1. La colección contiene cada combinación posible de variantes de aminoácido para cada uno de los mutantes seleccionados. La Tabla 27 describe todas las combinaciones de mutante contenidas en la colección. Las posiciones indicadas están con respecto a las posiciones correspondientes para los residuos de aminoácidos de hMMP-1 establecidos en la SEQ ID NO: 327. Cada fila y columna indican un polipéptido que contiene las mutaciones anotadas. Por ejemplo, 156K 179N 227E, se refiere a un polipéptido que contiene tres reemplazos de aminoácido en las posiciones correspondientes a las posiciones establecidas en la SEQ ID NO: 327: D por K en la posición 156, D por N en la posición 179 y V por E en la posición 227. La colección se generó y expresó como se describe en el Ejemplo 27.

Tabla 27. Mutantes de Colección combinatoria

95K	150P 156T	156K 179N 227E	150P 156T 240S
105N	105N 240S	156K 179N 198L	150P 156T 227E
150P	105N 227E	156K 179N 180T	150P 156T 198L
156K	105N 198L	156K 159V 240S	150P 156T 180T
156T	105N 180T	156K 159V 227E	150P 156T 179N
159V	105N 179N	156K 159V 198L	150P 156T 159V
179N	105N 159V	156K 159V 180T	105N 227E 240S
180T	105N 156K	156K 159V 179N	105N 198L 240S
198L	105N 156T	156T 227E 240S	105N 198L 227E
227E	105N 150P	156T 198L 240S	105N 180T 240S
240S	95K 240S	156T 198L 227E	105N 180T 227E
227E 240S	95K 227E	156T 180T 240S	105N 180T 198L
198L 240S	95K 198L	156T 180T 227E	105N 179N 240S
198L 227E	95K 180T	156T 180T 198L	105N 179N 227E
180T 240S	95K 179N	156T 179N 240S	105N 179N 198L
180T 227E	95K 159V	156T 179N 227E	105N 179N 180T
180T 198L	95K 156T	156T 179N 198L	105N 159V 240S
179N 240S	95K 150P	156T 179N 180T	105N 159V 227E
179N 227E	95K 105N	156T 159V 240S	105N 159V 198L
179N 198L	95K 156K	156T 159V 227E	105N 159V 180T
179N 180T	180T 227E 240S	156T 159V 198L	105N 159V 179N
159V 240S	180T 198L 240S	156T 159V 180T	105N 156K 240S
159V 227E	180T 198L 227E	156T 159V 179N	105N 156K 227E
159V 198L	179N 227E 240S	150P 227E 240S	105N 156K 198L
159V 180T	179N 198L 240S	198L 227E 240S	105N 156K 180T
159V 179N	179N 198L 227E	150P 198L 240S	105N 156K 179N
156K 240S	179N 180T 240S	150P 198L 227E	105N 156K 159V
156K 227E	179N 180T 227E	150P 180T 240S	105N 156T 240S
156K 198L	179N 180T 198L	150P 180T 227E	105N 156T 227E

000412

156K 180T	159V 227E 240S	150P 180T 198L	105N 156T 198L
156K 179N	159V 198L 240S	150P 179N 240S	105N 156T 180T
156K 159V	159V 198L 227E	150P 179N 227E	105N 156T 179N
156T 240S	159V 180T 240S	150P 179N 198L	105N 156T 159V
156T 227E	159V 180T 227E	150P 179N 180T	105N 150P 240S
156T 198L	159V 180T 198L	150P 159V 240S	105N 150P 227E
156T 180T	159V 179N 240S	150P 159V 227E	105N 150P 198L
156T 179N	159V 179N 227E	150P 159V 198L	105N 150P 180T
156T 159V	159V 179N 198L	150P 159V 180T	105N 150P 179N
150P 240S	159V 179N 180T	150P 159V 179N	105N 150P 159V
150P 227E	156K 227E 240S	150P 156K 240S	105N 150P 156K
150P 198L	156K 198L 240S	150P 156K 227E	105N 150P 156T
150P 180T	156K 198L 227E	150P 156K 198L	95K 227E 240S
150P 179N	156K 180T 240S	150P 156K 180T	95K 198L 240S
150P 156K	156K 180T 227E	156K 180T 198L	150P 156K 179N
150P 159V	156K 179N 240S	150P 156K 159V	95K 180T 240S

95K 180T 227E	179N 180T 198L 240S	156T 159V 180T 198L
95K 180T 198L	179N 180T 198L 227E	156T 159V 179N 240S
95K 179N 240S	159V 198L 227E 240S	156T 159V 179N 227E
95K 179N 227E	159V 180T 227E 240S	156T 159V 179N 198L
95K 179N 198L	159V 180T 198L 240S	156T 159V 179N 180T
95K 179N 180T	159V 180T 198L 227E	150P 198L 227E 240S
95K 159V 240S	159V 179N 227E 240S	150P 180T 227E 240S
95K 159V 227E	159V 179N 198L 240S	150P 180T 198L 240S
95K 159V 198L	159V 179N 198L 227E	150P 180T 198L 227E
95K 159V 180T	159V 179N 180T 240S	150P 179N 227E 240S
95K 159V 179N	159V 179N 180T 227E	150P 179N 198L 240S
95K 156K 240S	159V 179N 180T 198L	150P 179N 198L 227E
95K 156K 227E	156K 198L 227E 240S	150P 179N 180T 240S
95K 156K 198L	156K 180T 227E 240S	150P 179N 180T 227E
95K 156K 180T	156K 180T 198L 240S	150P 179N 180T 198L
95K 156K 179N	156K 180T 198L 227E	150P 159V 227E 240S
95K 156K 159V	156K 179N 227E 240S	150P 159V 198L 240S
95K 198L 227E	156K 179N 198L 240S	150P 159V 198L 227E
95K 156T 240S	156K 179N 198L 227E	150P 159V 180T 240S
95K 156T 227E	156K 179N 180T 240S	150P 159V 180T 227E
95K 156T 198L	156K 179N 180T 227E	150P 159V 180T 198L
95K 156T 180T	156K 179N 180T 198L	150P 159V 179N 240S
95K 156T 179N	156K 159V 227E 240S	150P 159V 179N 227E
95K 156T 159V	156K 159V 198L 240S	150P 159V 179N 198L
95K 150P 240S	156K 159V 198L 227E	150P 159V 179N 180T
95K 150P 227E	156K 159V 180T 240S	150P 156K 227E 240S
95K 150P 198L	156K 159V 180T 227E	150P 156K 198L 240S
95K 150P 180T	156K 159V 180T 198L	150P 156K 198L 227E
95K 150P 179N	156K 159V 179N 240S	150P 156K 180T 240S
95K 150P 159V	156K 159V 179N 227E	150P 156K 180T 227E
95K 150P 156K	156K 159V 179N 198L	150P 156K 180T 198L

95K 150P 156T	156K 159V 179N 180T	150P 156K 179N 240S
95K 105N 240S	156T 198L 227E 240S	150P 156K 179N 227E
95K 105N 227E	156T 180T 227E 240S	150P 156K 179N 198L
95K 105N 198L	156T 180T 198L 240S	150P 156K 179N 180T
95K 105N 180T	156T 180T 198L 227E	150P 156K 159V 240S
95K 105N 179N	156T 179N 227E 240S	150P 156K 159V 227E
95K 105N 159V	156T 179N 198L 240S	156T 179N 180T 240S
95K 105N 156K	156T 179N 198L 227E	156T 179N 180T 227E
95K 105N 156T	156T 159V 227E 240S	156T 179N 180T 198L
95K 105N 150P	156T 159V 198L 240S	150P 156T 227E 240S
180T 198L 227E 240S	156T 159V 198L 227E	150P 156T 198L 240S
179N 198L 227E 240S	156T 159V 180T 240S	150P 156T 198L 227E
179N 180T 227E 240S	156T 159V 180T 227E	150P 156T 180T 240S
150P 156T 180T 227E	105N 156T 198L 240S	95K 180T 198L 227E
150P 156T 180T 198L	105N 156T 180T 227E	95K 179N 180T 227E
150P 156T 179N 240S	105N 156T 180T 198L	95K 179N 180T 198L
150P 156T 179N 227E	105N 156T 179N 240S	95K 159V 227E 240S
150P 156T 179N 198L	105N 156T 179N 227E	95K 159V 198L 240S
150P 156T 179N 180T	105N 156T 179N 198L	95K 159V 198L 227E
150P 156T 159V 240S	105N 156T 179N 180T	95K 159V 180T 240S
150P 156T 159V 227E	105N 156T 159V 240S	95K 159V 180T 227E
150P 156T 159V 198L	105N 156T 159V 227E	95K 159V 180T 198L
150P 156T 159V 180T	105N 156T 159V 198L	95K 159V 179N 240S
150P 156T 159V 179N	105N 156T 159V 180T	95K 159V 179N 227E
105N 198L 227E 240S	105N 156T 159V 179N	95K 159V 179N 198L
105N 180T 227E 240S	105N 150P 227E 240S	95K 159V 179N 180T
105N 180T 198L 240S	105N 150P 198L 240S	95K 156K 227E 240S
105N 180T 198L 227E	105N 150P 198L 227E	95K 156K 198L 240S
105N 179N 227E 240S	105N 150P 180T 240S	95K 156K 198L 227E
105N 179N 198L 240S	105N 150P 180T 227E	95K 156K 180T 240S
105N 179N 198L 227E	105N 150P 180T 198L	95K 156K 180T 227E
105N 179N 180T 240S	105N 150P 179N 240S	95K 156K 180T 198L
105N 179N 180T 227E	105N 150P 179N 227E	95K 156K 179N 240S
105N 179N 180T 198L	105N 150P 179N 198L	95K 156K 179N 227E
105N 159V 227E 240S	105N 150P 179N 180T	95K 156K 179N 198L
105N 159V 198L 240S	105N 150P 159V 240S	95K 156K 179N 180T
105N 159V 198L 227E	105N 150P 159V 227E	95K 156K 159V 240S
105N 159V 180T 240S	105N 150P 159V 198L	95K 156K 159V 227E
105N 159V 180T 227E	105N 150P 159V 180T	95K 156K 159V 198L
105N 159V 180T 198L	105N 150P 159V 179N	95K 156K 159V 180T
105N 159V 179N 240S	105N 150P 156K 240S	95K 156K 159V 179N
105N 159V 179N 227E	105N 150P 156K 227E	95K 156T 227E 240S
105N 159V 179N 198L	105N 150P 156K 198L	95K 156T 198L 240S
105N 159V 179N 180T	105N 150P 156K 180T	95K 156T 198L 227E
105N 156K 227E 240S	105N 156K 180T 227E	95K 156T 180T 240S
105N 156K 198L 240S	105N 156K 180T 198L	105N 150P 156K 179N
105N 156K 198L 227E	105N 156K 179N 240S	105N 150P 156K 159V

105N 156K 180T 240S	105N 156K 179N 227E	105N 150P 156T 240S
150P 156K 159V 198L	105N 156K 179N 198L	105N 150P 156T 227E
150P 156K 159V 180T	105N 156K 179N 180T	105N 150P 156T 198L
150P 156K 159V 179N	105N 150P 156T 179N	105N 150P 156T 180T
105N 156K 159V 240S	105N 150P 156T 159V	95K 156T 179N 198L
105N 156K 159V 227E	95K 198L 227E 240S	95K 156T 179N 180T
105N 156K 159V 198L	95K 180T 227E 240S	95K 156T 159V 240S
105N 156K 159V 180T	95K 180T 198L 240S	95K 156T 159V 227E
105N 156K 159V 179N	95K 179N 227E 240S	95K 156T 159V 198L
105N 156T 227E 240S	95K 179N 198L 240S	95K 156T 159V 180T
105N 156T 198L 227E	95K 179N 198L 227E	95K 156T 159V 179N
105N 156T 180T 240S	95K 179N 180T 240S	95K 150P 227E 240S

95K 150P 198L 240S	95K 105N 156K 179N
95K 150P 198L 227E	95K 105N 156K 159V
95K 150P 180T 240S	95K 105N 156T 240S
95K 150P 180T 227E	95K 105N 156T 227E
95K 150P 180T 198L	95K 105N 156T 198L
95K 150P 179N 240S	95K 105N 156T 180T
95K 150P 179N 227E	95K 105N 156T 179N
95K 150P 179N 198L	95K 105N 156T 159V
95K 150P 179N 180T	95K 105N 150P 240S
95K 150P 159V 240S	95K 105N 150P 227E
95K 150P 159V 227E	95K 105N 150P 198L
95K 150P 159V 198L	95K 105N 150P 180T
95K 150P 159V 180T	95K 105N 150P 179N
95K 150P 159V 179N	95K 105N 150P 159V
95K 150P 156K 240S	95K 105N 150P 156K
95K 150P 156K 227E	95K 105N 150P 156T
95K 150P 156K 198L	95K 105N 179N 227E
95K 150P 156K 180T	95K 105N 179N 198L
95K 150P 156K 179N	95K 105N 179N 180T
95K 150P 156K 159V	95K 105N 159V 240S
95K 150P 156T 240S	156K 159V 179N 198L 227E
95K 150P 156T 227E	179N 180T 198L 227E 240S
95K 150P 156T 198L	159V 180T 198L 227E 240S
95K 150P 156T 180T	159V 179N 198L 227E 240S
95K 150P 156T 179N	159V 179N 180T 227E 240S
95K 150P 156T 159V	159V 179N 180T 198L 240S
95K 105N 227E 240S	159V 179N 180T 198L 227E
95K 105N 198L 240S	156K 180T 198L 227E 240S
95K 105N 198L 227E	156K 179N 198L 227E 240S
95K 105N 180T 240S	156K 179N 180T 227E 240S
95K 105N 180T 227E	156K 179N 180T 198L 240S
95K 105N 180T 198L	156K 179N 180T 198L 227E
95K 105N 179N 240S	156K 159V 198L 227E 240S
95K 156T 180T 227E	156K 159V 180T 227E 240S
95K 156T 180T 198L	156K 159V 180T 198L 240S

95K 156T 179N 240S	156K 159V 180T 198L 227E
95K 156T 179N 227E	156K 159V 179N 227E 240S
95K 105N 159V 227E	156K 159V 179N 198L 240S
95K 105N 159V 198L	150P 156K 159V 198L 227E
95K 105N 159V 180T	156K 159V 179N 180T 240S
95K 105N 159V 179N	156K 159V 179N 180T 227E
95K 105N 156K 240S	156K 159V 179N 180T 198L
95K 105N 156K 227E	156T 180T 198L 227E 240S
95K 105N 156K 198L	156T 179N 198L 227E 240S
95K 105N 156K 180T	156T 179N 180T 227E 240S
156T 179N 180T 198L 240S	150P 156K 159V 179N 180T
156T 179N 180T 198L 227E	150P 156T 198L 227E 240S
156T 159V 198L 227E 240S	150P 156T 180T 227E 240S
156T 159V 180T 227E 240S	150P 156T 180T 198L 240S
156T 159V 180T 198L 240S	150P 156T 180T 198L 227E
156T 159V 180T 198L 227E	150P 156T 179N 227E 240S
156T 159V 179N 227E 240S	150P 156T 179N 198L 240S
156T 159V 179N 198L 240S	150P 156T 179N 198L 227E
156T 159V 179N 198L 227E	150P 156T 179N 180T 240S
156T 159V 179N 180T 240S	150P 156T 179N 180T 227E
156T 159V 179N 180T 227E	150P 156T 179N 180T 198L
156T 159V 179N 180T 198L	150P 156T 159V 227E 240S
150P 180T 198L 227E 240S	150P 156T 159V 198L 240S
150P 179N 198L 227E 240S	150P 156T 159V 198L 227E
150P 179N 180T 227E 240S	150P 156T 159V 180T 240S
150P 179N 180T 198L 240S	150P 156T 159V 180T 227E
150P 179N 180T 198L 227E	150P 156T 159V 180T 198L
150P 159V 198L 227E 240S	150P 156T 159V 179N 240S
150P 159V 180T 227E 240S	150P 156T 159V 179N 227E
150P 159V 180T 198L 240S	150P 159V 180T 198L 227E
150P 159V 179N 227E 240S	150P 156T 159V 179N 180T
150P 159V 179N 198L 240S	105N 180T 198L 227E 240S
150P 159V 179N 198L 227E	105N 179N 198L 227E 240S
150P 159V 179N 180T 240S	105N 179N 180T 227E 240S
150P 159V 179N 180T 227E	105N 179N 180T 198L 240S
150P 159V 179N 180T 198L	105N 179N 180T 198L 227E
150P 156K 198L 227E 240S	105N 159V 198L 227E 240S
150P 156K 180T 227E 240S	105N 159V 180T 227E 240S
150P 156K 180T 198L 240S	105N 159V 180T 198L 240S
150P 156K 180T 198L 227E	105N 159V 180T 198L 227E
150P 156K 179N 227E 240S	105N 159V 179N 227E 240S
150P 156K 179N 198L 240S	105N 159V 179N 198L 240S
150P 156K 179N 198L 227E	105N 159V 179N 198L 227E
150P 156K 179N 180T 240S	105N 159V 179N 180T 240S
150P 156K 179N 180T 227E	105N 159V 179N 180T 227E
150P 156K 179N 180T 198L	105N 159V 179N 180T 198L
150P 156K 159V 227E 240S	105N 156K 198L 227E 240S

150P 156K 159V 198L 240S	105N 156K 180T 227E 240S
105N 156K 180T 198L 240S	105N 150P 179N 180T 240S
150P 156K 159V 180T 240S	105N 156K 180T 198L 227E
150P 156K 159V 180T 227E	105N 156K 179N 227E 240S
150P 156K 159V 180T 198L	105N 156K 179N 198L 240S
150P 156K 159V 179N 240S	105N 156K 179N 198L 227E
150P 156K 159V 179N 227E	105N 156K 179N 180T 240S
150P 156K 159V 179N 198L	105N 156K 179N 180T 227E
105N 156K 179N 180T 198L	105N 150P 159V 180T 227E
105N 156K 159V 227E 240S	105N 150P 159V 180T 198L
105N 156K 159V 198L 240S	105N 150P 159V 179N 240S
105N 156K 159V 198L 227E	105N 150P 159V 179N 227E
105N 156K 159V 180T 240S	105N 150P 159V 179N 198L
105N 156K 159V 180T 227E	105N 150P 159V 179N 180T
105N 156K 159V 180T 198L	105N 150P 156K 227E 240S
105N 156K 159V 179N 240S	105N 150P 156K 198L 240S
105N 156K 159V 179N 227E	105N 150P 156K 198L 227E
105N 156K 159V 179N 198L	105N 150P 156K 180T 240S
105N 156K 159V 179N 180T	105N 150P 156K 180T 227E
105N 156T 198L 227E 240S	105N 150P 156K 180T 198L
105N 156T 180T 227E 240S	105N 150P 156K 179N 240S
105N 156T 180T 198L 240S	105N 150P 156K 179N 227E
105N 156T 180T 198L 227E	105N 150P 156K 179N 198L
105N 156T 179N 227E 240S	105N 150P 156K 179N 180T
105N 156T 179N 198L 240S	105N 150P 156K 159V 240S
105N 156T 179N 198L 227E	105N 150P 156K 159V 227E
105N 156T 179N 180T 240S	105N 150P 156K 159V 198L
150P 156T 159V 179N 198L	105N 156T 179N 180T 227E
105N 156T 179N 180T 198L	105N 150P 156K 159V 179N
105N 156T 159V 227E 240S	105N 150P 156T 227E 240S
105N 156T 159V 198L 240S	105N 150P 156T 198L 240S
105N 156T 159V 198L 227E	105N 150P 156T 198L 227E
105N 156T 159V 180T 240S	105N 150P 156T 180T 240S
105N 156T 159V 180T 227E	105N 150P 156T 180T 227E
105N 156T 159V 180T 198L	105N 150P 156T 180T 198L
105N 156T 159V 179N 240S	105N 150P 156T 179N 240S
105N 156T 159V 179N 227E	105N 150P 156T 179N 227E
105N 156T 159V 179N 198L	105N 150P 156T 179N 198L
105N 156T 159V 179N 180T	105N 150P 156T 179N 180T
105N 150P 198L 227E 240S	105N 150P 156T 159V 240S
105N 150P 180T 227E 240S	105N 150P 156T 159V 227E
105N 150P 180T 198L 240S	105N 150P 156T 159V 198L
105N 150P 180T 198L 227E	105N 150P 156T 159V 180T
105N 150P 179N 227E 240S	105N 150P 156T 159V 179N
105N 150P 179N 198L 240S	95K 180T 198L 227E 240S
105N 150P 179N 198L 227E	95K 179N 198L 227E 240S
95K 179N 180T 227E 240S	95K 156T 159V 198L 227E

105N 150P 179N 180T 227E	95K 179N 180T 198L 240S
105N 150P 179N 180T 198L	95K 179N 180T 198L 227E
105N 150P 159V 227E 240S	95K 159V 198L 227E 240S
105N 150P 159V 198L 240S	95K 159V 180T 227E 240S
105N 150P 159V 198L 227E	95K 159V 180T 198L 240S
105N 150P 159V 180T 240S	95K 159V 180T 198L 227E
95K 159V 179N 227E 240S	95K 156T 159V 179N 180T
95K 159V 179N 198L 240S	95K 150P 198L 227E 240S
95K 159V 179N 198L 227E	95K 150P 180T 227E 240S
95K 159V 179N 180T 240S	95K 150P 180T 198L 240S
95K 159V 179N 180T 227E	95K 150P 180T 198L 227E
95K 159V 179N 180T 198L	95K 150P 179N 227E 240S
95K 156K 198L 227E 240S	95K 150P 179N 198L 240S
95K 156K 180T 227E 240S	95K 150P 179N 198L 227E
95K 156K 180T 198L 240S	95K 150P 179N 180T 240S
95K 156K 180T 198L 227E	95K 150P 179N 180T 227E
95K 156K 179N 227E 240S	95K 150P 179N 180T 198L
95K 156K 179N 198L 240S	95K 150P 159V 227E 240S
95K 156K 179N 198L 227E	95K 150P 159V 198L 240S
95K 156K 179N 180T 240S	95K 150P 159V 198L 227E
95K 156K 179N 180T 227E	95K 150P 159V 180T 240S
95K 156K 179N 180T 198L	95K 150P 159V 180T 227E
95K 156K 159V 227E 240S	95K 150P 159V 180T 198L
95K 156K 159V 198L 240S	95K 150P 159V 179N 240S
95K 156K 159V 198L 227E	95K 150P 159V 179N 227E
105N 150P 156K 159V 180T	95K 156K 159V 180T 240S
95K 156K 159V 180T 227E	95K 150P 159V 179N 180T
95K 156K 159V 180T 198L	95K 150P 156K 227E 240S
95K 156K 159V 179N 240S	95K 150P 156K 198L 240S
95K 156K 159V 179N 227E	95K 150P 156K 198L 227E
95K 156K 159V 179N 198L	95K 150P 156K 180T 240S
95K 156K 159V 179N 180T	95K 150P 156K 180T 227E
95K 156T 198L 227E 240S	95K 150P 156K 180T 198L
95K 156T 180T 227E 240S	95K 150P 156K 179N 240S
95K 156T 180T 198L 240S	95K 150P 156K 179N 227E
95K 156T 180T 198L 227E	95K 150P 156K 179N 198L
95K 156T 179N 227E 240S	95K 150P 156K 179N 180T
95K 156T 179N 198L 240S	95K 150P 156K 159V 240S
95K 156T 179N 198L 227E	95K 150P 156K 159V 227E
95K 156T 179N 180T 240S	95K 150P 156K 159V 198L
95K 156T 179N 180T 227E	95K 150P 156K 159V 180T
95K 156T 179N 180T 198L	95K 150P 156K 159V 179N
95K 156T 159V 227E 240S	95K 150P 156T 227E 240S
95K 156T 159V 198L 240S	95K 150P 156T 198L 240S
95K 150P 156T 198L 227E	95K 105N 156K 159V 198L
95K 156T 159V 180T 240S	95K 150P 156T 180T 240S
95K 156T 159V 180T 227E	95K 150P 156T 180T 227E

95K 156T 159V 180T 198L	95K 150P 156T 180T 198L
95K 156T 159V 179N 240S	95K 150P 156T 179N 240S
95K 156T 159V 179N 227E	95K 150P 156T 179N 227E
95K 156T 159V 179N 198L	95K 150P 156T 179N 198L
95K 150P 156T 179N 180T	95K 105N 156T 180T 227E
95K 150P 156T 159V 240S	95K 105N 156T 180T 198L
95K 150P 156T 159V 227E	95K 105N 156T 179N 240S
95K 150P 156T 159V 198L	95K 105N 156T 179N 227E
95K 150P 156T 159V 180T	95K 105N 156T 179N 198L
95K 150P 156T 159V 179N	95K 105N 156T 179N 180T
95K 105N 198L 227E 240S	95K 105N 156T 159V 240S
95K 105N 180T 227E 240S	95K 105N 156T 159V 227E
95K 105N 180T 198L 240S	95K 105N 156T 159V 198L
95K 105N 180T 198L 227E	95K 105N 156T 159V 180T
95K 105N 179N 227E 240S	95K 105N 156T 159V 179N
95K 105N 179N 198L 240S	95K 105N 150P 227E 240S
95K 105N 179N 198L 227E	95K 105N 150P 198L 240S
95K 105N 179N 180T 240S	95K 105N 150P 198L 227E
95K 105N 179N 180T 227E	95K 105N 150P 180T 240S
95K 105N 179N 180T 198L	95K 105N 150P 180T 227E
95K 105N 159V 227E 240S	95K 105N 150P 180T 198L
95K 105N 159V 198L 240S	95K 105N 150P 179N 240S
95K 105N 159V 198L 227E	95K 105N 150P 179N 227E
95K 150P 159V 179N 198L	95K 105N 159V 180T 240S
95K 105N 159V 180T 227E	95K 105N 150P 179N 180T
95K 105N 159V 180T 198L	95K 105N 150P 159V 240S
95K 105N 159V 179N 240S	95K 105N 150P 159V 227E
95K 105N 159V 179N 227E	95K 105N 150P 159V 198L
95K 105N 159V 179N 198L	95K 105N 150P 159V 180T
95K 105N 159V 179N 180T	95K 105N 150P 159V 179N
95K 105N 156K 227E 240S	95K 105N 150P 156K 240S
95K 105N 156K 198L 240S	95K 105N 150P 156K 227E
95K 105N 156K 198L 227E	95K 105N 150P 156K 198L
95K 105N 156K 180T 240S	95K 105N 150P 156K 180T
95K 105N 156K 180T 227E	95K 105N 150P 156K 179N
95K 105N 156K 180T 198L	95K 105N 150P 156K 159V
95K 105N 156K 179N 240S	95K 105N 150P 156T 240S
95K 105N 156K 179N 227E	95K 105N 150P 156T 227E
95K 105N 156K 179N 198L	95K 105N 150P 156T 198L
95K 105N 156K 179N 180T	95K 105N 150P 156T 180T
95K 105N 156K 159V 240S	95K 105N 150P 156T 179N
95K 105N 156K 159V 227E	95K 105N 150P 156T 159V
95K 105N 150P 179N 198L	150P 156T 159V 179N 198L 240S
95K 105N 156K 159V 180T	159V 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 156K 159V 179N	156K 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 156T 227E 240S	156K 159V 180T 198L 227E 240S
95K 105N 156T 198L 240S	156K 159V 179N 198L 227E 240S

95K 105N 156T 198L 227E	156K 159V 179N 180T 227E 240S
95K 105N 156T 180T 240S	156K 159V 179N 180T 198L 240S
150P 156T 159V 179N 198L 227E	105N 159V 179N 198L 227E 240S
150P 156T 159V 179N 180T 240S	105N 159V 179N 180T 227E 240S
150P 156T 159V 179N 180T 227E	105N 159V 179N 180T 198L 240S
150P 156T 159V 179N 180T 198L	105N 159V 179N 180T 198L 227E
105N 179N 180T 198L 227E 240S	105N 156K 180T 198L 227E 240S
105N 159V 180T 198L 227E 240S	105N 156K 179N 198L 227E 240S
156K 159V 179N 180T 198L 227E	105N 156K 179N 180T 227E 240S
156T 179N 180T 198L 227E 240S	105N 156K 179N 180T 198L 240S
156T 159V 180T 198L 227E 240S	105N 156K 179N 180T 198L 227E
156T 159V 179N 198L 227E 240S	105N 156K 159V 198L 227E 240S
156T 159V 179N 180T 227E 240S	105N 156K 159V 180T 227E 240S
156T 159V 179N 180T 198L 240S	105N 156K 159V 180T 198L 240S
156T 159V 179N 180T 198L 227E	105N 156K 159V 180T 198L 227E
150P 179N 180T 198L 227E 240S	105N 156K 159V 179N 227E 240S
150P 159V 180T 198L 227E 240S	105N 156K 159V 179N 198L 240S
150P 159V 179N 198L 227E 240S	105N 156K 159V 179N 198L 227E
150P 159V 179N 180T 227E 240S	105N 156K 159V 179N 180T 240S
150P 159V 179N 180T 198L 240S	105N 156K 159V 179N 180T 227E
150P 159V 179N 180T 198L 227E	105N 156K 159V 179N 180T 198L
150P 156K 180T 198L 227E 240S	105N 156T 180T 198L 227E 240S
150P 156K 179N 198L 227E 240S	105N 156T 179N 198L 227E 240S
150P 156K 179N 180T 227E 240S	105N 156T 179N 180T 227E 240S
150P 156K 179N 180T 198L 240S	105N 156T 179N 180T 198L 240S
150P 156K 179N 180T 198L 227E	105N 156T 179N 180T 198L 227E
150P 156K 159V 198L 227E 240S	105N 156T 159V 198L 227E 240S
150P 156K 159V 180T 227E 240S	105N 156T 159V 180T 227E 240S
150P 156K 159V 180T 198L 240S	105N 156T 159V 180T 198L 240S
150P 156K 159V 180T 198L 227E	105N 156T 159V 180T 198L 227E
150P 156K 159V 179N 227E 240S	105N 156T 159V 179N 227E 240S
150P 156K 159V 179N 198L 240S	105N 156T 159V 179N 198L 240S
150P 156K 159V 179N 198L 227E	105N 156T 159V 179N 198L 227E
150P 156K 159V 179N 180T 240S	105N 156T 159V 179N 180T 240S
150P 156K 159V 179N 180T 227E	105N 156T 159V 179N 180T 227E
150P 156K 159V 179N 180T 198L	105N 156T 159V 179N 180T 198L
150P 156T 180T 198L 227E 240S	105N 150P 180T 198L 227E 240S
150P 156T 179N 198L 227E 240S	105N 150P 179N 198L 227E 240S
150P 156T 179N 180T 227E 240S	105N 150P 179N 180T 227E 240S
150P 156T 179N 180T 198L 240S	105N 150P 179N 180T 198L 240S
150P 156T 179N 180T 198L 227E	105N 150P 156T 159V 180T 227E
150P 156T 159V 198L 227E 240S	105N 150P 159V 179N 227E 240S
150P 156T 159V 180T 227E 240S	105N 150P 159V 179N 198L 240S
150P 156T 159V 180T 198L 240S	105N 150P 159V 179N 198L 227E
150P 156T 159V 180T 198L 227E	105N 150P 159V 179N 180T 240S
150P 156T 159V 179N 227E 240S	105N 150P 159V 179N 180T 227E
105N 150P 179N 180T 198L 227E	105N 150P 159V 179N 180T 198L

105N 150P 156K 198L 227E 240S	95K 159V 180T 198L 227E 240S
105N 150P 156K 180T 227E 240S	95K 159V 179N 198L 227E 240S
105N 150P 156K 180T 198L 240S	95K 159V 179N 180T 227E 240S
105N 150P 156K 180T 198L 227E	95K 159V 179N 180T 198L 240S
105N 150P 156K 179N 227E 240S	95K 159V 179N 180T 198L 227E
105N 150P 156K 179N 198L 240S	95K 156K 180T 198L 227E 240S
105N 150P 156K 179N 198L 227E	95K 156K 179N 198L 227E 240S
105N 150P 156K 179N 180T 240S	95K 156K 179N 180T 227E 240S
105N 150P 156K 179N 180T 227E	95K 156K 179N 180T 198L 240S
105N 150P 156K 179N 180T 198L	95K 156K 179N 180T 198L 227E
105N 150P 156K 159V 227E 240S	95K 156K 159V 198L 227E 240S
105N 150P 156K 159V 198L 240S	95K 156K 159V 180T 227E 240S
105N 150P 156K 159V 198L 227E	95K 156K 159V 180T 198L 240S
105N 150P 156K 159V 180T 240S	95K 156K 159V 180T 198L 227E
105N 150P 156K 159V 180T 227E	95K 156K 159V 179N 227E 240S
105N 150P 156K 159V 180T 198L	95K 156K 159V 179N 198L 240S
105N 150P 156K 159V 179N 240S	95K 156K 159V 179N 198L 227E
105N 150P 156K 159V 179N 227E	95K 156K 159V 179N 180T 240S
105N 150P 156K 159V 179N 198L	95K 156K 159V 179N 180T 227E
105N 150P 156K 159V 179N 180T	95K 156K 159V 179N 180T 198L
105N 150P 159V 198L 227E 240S	95K 156T 180T 198L 227E 240S
105N 150P 159V 180T 227E 240S	95K 156T 179N 198L 227E 240S
105N 150P 159V 180T 198L 240S	95K 156T 179N 180T 227E 240S
105N 150P 159V 180T 198L 227E	95K 156T 179N 180T 198L 240S
105N 150P 156T 198L 227E 240S	95K 156T 179N 180T 198L 227E
105N 150P 156T 180T 227E 240S	95K 156T 159V 198L 227E 240S
105N 150P 156T 180T 198L 240S	95K 156T 159V 180T 227E 240S
105N 150P 156T 180T 198L 227E	95K 156T 159V 180T 198L 240S
105N 150P 156T 179N 227E 240S	95K 156T 159V 180T 198L 227E
105N 150P 156T 179N 198L 240S	95K 156T 159V 179N 227E 240S
105N 150P 156T 179N 198L 227E	95K 156T 159V 179N 198L 240S
105N 150P 156T 179N 180T 240S	95K 156T 159V 179N 198L 227E
105N 150P 156T 179N 180T 227E	95K 156T 159V 179N 180T 240S
105N 150P 156T 179N 180T 198L	95K 156T 159V 179N 180T 227E
105N 150P 156T 159V 227E 240S	95K 156T 159V 179N 180T 198L
105N 150P 156T 159V 198L 240S	95K 150P 180T 198L 227E 240S
105N 150P 156T 159V 198L 227E	95K 150P 179N 198L 227E 240S
105N 150P 156T 159V 180T 240S	95K 150P 179N 180T 227E 240S
95K 150P 179N 180T 198L 240S	95K 150P 156T 159V 180T 240S
105N 150P 156T 159V 180T 198L	95K 150P 179N 180T 198L 227E
105N 150P 156T 159V 179N 240S	95K 150P 159V 198L 227E 240S
105N 150P 156T 159V 179N 227E	95K 150P 159V 180T 227E 240S
105N 150P 156T 159V 179N 198L	95K 150P 159V 180T 198L 240S
105N 150P 156T 159V 179N 180T	95K 150P 159V 180T 198L 227E
95K 179N 180T 198L 227E 240S	95K 150P 159V 179N 227E 240S
95K 150P 159V 179N 198L 240S	95K 105N 179N 198L 227E 240S
95K 150P 159V 179N 198L 227E	95K 105N 179N 180T 227E 240S

95K 150P 159V 179N 180T 240S	95K 105N 179N 180T 198L 240S
95K 150P 159V 179N 180T 227E	95K 105N 179N 180T 198L 227E
95K 150P 159V 179N 180T 198L	95K 105N 159V 198L 227E 240S
95K 150P 156K 198L 227E 240S	95K 105N 159V 180T 227E 240S
95K 150P 156K 180T 227E 240S	95K 105N 159V 180T 198L 240S
95K 150P 156K 180T 198L 240S	95K 105N 159V 180T 198L 227E
95K 150P 156K 180T 198L 227E	95K 105N 159V 179N 227E 240S
95K 150P 156K 179N 227E 240S	95K 105N 159V 179N 198L 240S
95K 150P 156K 179N 198L 240S	95K 105N 159V 179N 198L 227E
95K 150P 156K 179N 198L 227E	95K 105N 159V 179N 180T 240S
95K 150P 156K 179N 180T 240S	95K 105N 159V 179N 180T 227E
95K 150P 156K 179N 180T 227E	95K 105N 159V 179N 180T 198L
95K 150P 156K 179N 180T 198L	95K 105N 156K 198L 227E 240S
95K 150P 156K 159V 227E 240S	95K 105N 156K 180T 227E 240S
95K 150P 156K 159V 198L 240S	95K 105N 156K 180T 198L 240S
95K 150P 156K 159V 198L 227E	95K 105N 156K 180T 198L 227E
95K 150P 156K 159V 180T 240S	95K 105N 156K 179N 227E 240S
95K 150P 156K 159V 180T 227E	95K 105N 156K 179N 198L 240S
95K 150P 156K 159V 180T 198L	95K 105N 156K 179N 198L 227E
95K 150P 156K 159V 179N 240S	95K 105N 156K 179N 180T 240S
95K 150P 156K 159V 179N 227E	95K 105N 156K 179N 180T 227E
95K 150P 156K 159V 179N 198L	95K 105N 156K 179N 180T 198L
95K 150P 156K 159V 179N 180T	95K 105N 156K 159V 227E 240S
95K 150P 156T 198L 227E 240S	95K 105N 156K 159V 198L 240S
95K 150P 156T 180T 227E 240S	95K 105N 156K 159V 198L 227E
95K 150P 156T 180T 198L 240S	95K 105N 156K 159V 180T 240S
95K 150P 156T 180T 198L 227E	95K 105N 156K 159V 180T 227E
95K 150P 156T 179N 227E 240S	95K 105N 156K 159V 180T 198L
95K 150P 156T 179N 198L 240S	95K 105N 156K 159V 179N 240S
95K 150P 156T 179N 198L 227E	95K 105N 156K 159V 179N 227E
95K 150P 156T 179N 180T 240S	95K 105N 156K 159V 179N 198L
95K 150P 156T 179N 180T 227E	95K 105N 156K 159V 179N 180T
95K 150P 156T 179N 180T 198L	95K 105N 156T 198L 227E 240S
95K 150P 156T 159V 227E 240S	95K 105N 156T 180T 227E 240S
95K 150P 156T 159V 198L 240S	95K 105N 156T 180T 198L 240S
95K 150P 156T 159V 198L 227E	95K 105N 156T 179N 227E 240S
95K 150P 156T 159V 180T 227E	95K 105N 156T 179N 198L 240S
95K 150P 156T 159V 180T 198L	95K 105N 156T 179N 198L 227E
95K 150P 156T 159V 179N 240S	95K 105N 156T 179N 180T 240S
95K 150P 156T 159V 179N 227E	95K 105N 156T 179N 180T 227E
95K 150P 156T 159V 179N 198L	95K 105N 156T 179N 180T 198L
95K 150P 156T 159V 179N 180T	95K 105N 156T 159V 227E 240S
95K 105N 180T 198L 227E 240S	95K 105N 156T 159V 198L 240S
95K 105N 156T 159V 198L 227E	
95K 105N 156T 159V 180T 240S	
95K 105N 156T 159V 180T 227E	
95K 105N 156T 159V 180T 198L	

95K 105N 156T 159V 179N 240S
95K 105N 156T 159V 179N 227E
95K 105N 156T 159V 179N 198L
95K 105N 156T 159V 179N 180T
95K 105N 150P 198L 227E 240S
95K 105N 150P 180T 227E 240S
95K 105N 150P 180T 198L 240S
95K 105N 150P 180T 198L 227E
95K 105N 150P 179N 227E 240S
95K 105N 150P 179N 198L 240S
95K 105N 150P 179N 198L 227E
95K 105N 150P 179N 180T 240S
95K 105N 150P 179N 180T 227E
95K 105N 150P 179N 180T 198L
95K 105N 150P 159V 227E 240S
95K 105N 150P 159V 198L 240S
95K 105N 150P 159V 198L 227E
95K 105N 150P 159V 180T 240S
95K 105N 150P 159V 180T 227E
95K 105N 150P 159V 180T 198L
95K 105N 150P 159V 179N 240S
95K 105N 150P 159V 179N 227E
95K 105N 150P 156K 179N 198L
95K 105N 150P 156K 179N 180T
95K 105N 150P 156K 159V 240S
95K 105N 150P 156K 159V 227E
95K 105N 150P 156K 159V 198L
95K 105N 150P 156K 159V 180T
95K 105N 150P 156K 159V 179N
95K 105N 150P 159V 179N 198L
95K 105N 150P 159V 179N 180T
95K 105N 150P 156K 227E 240S
95K 105N 150P 156K 198L 240S
95K 105N 150P 156K 198L 227E
95K 105N 150P 156K 180T 240S
95K 105N 150P 156K 180T 227E
95K 105N 150P 156K 180T 198L
95K 105N 150P 156T 227E 240S
95K 105N 150P 156T 198L 240S
95K 105N 150P 156T 198L 227E
95K 105N 150P 156T 180T 240S
95K 105N 150P 156T 180T 227E
95K 105N 150P 156T 180T 198L
95K 105N 150P 156T 179N 240S
95K 105N 150P 156T 179N 227E
95K 105N 150P 156T 179N 198L
95K 105N 150P 156T 179N 180T

95K 105N 150P 156T 159V 240S
95K 105N 150P 156T 159V 227E
95K 105N 150P 156T 159V 198L
95K 105N 150P 156T 159V 180T
95K 105N 150P 156T 159V 179N
95K 105N 150P 156K 179N 240S
95K 105N 150P 156K 179N 227E
95K 105N 156T 180T 198L 227E
156K 159V 179N 180T 198L 227E 240S
156T 159V 179N 180T 198L 227E 240S
150P 159V 179N 180T 198L 227E 240S
150P 156K 179N 180T 198L 227E 240S
150P 156K 159V 180T 198L 227E 240S
150P 156K 159V 179N 198L 227E 240S
150P 156K 159V 179N 180T 227E 240S
150P 156K 159V 179N 180T 198L 240S
150P 156K 159V 179N 180T 198L 227E
150P 156T 179N 180T 198L 227E 240S
150P 156T 159V 180T 198L 227E 240S
150P 156T 159V 179N 198L 227E 240S
150P 156T 159V 179N 180T 227E 240S
150P 156T 159V 179N 180T 198L 240S
150P 156T 159V 179N 180T 198L 227E
105N 156K 179N 180T 198L 227E 240S
105N 156K 159V 180T 198L 227E 240S
105N 156K 159V 179N 198L 227E 240S
105N 156K 159V 179N 180T 198L 240S
105N 156K 159V 179N 180T 198L 227E
105N 159V 179N 180T 198L 227E 240S
105N 156K 159V 179N 180T 227E 240S
105N 156T 159V 179N 180T 198L 227E
105N 156T 179N 180T 198L 227E 240S
105N 150P 179N 180T 198L 227E 240S
105N 150P 159V 180T 198L 227E 240S
105N 150P 159V 179N 198L 227E 240S
105N 150P 159V 179N 180T 227E 240S
105N 150P 159V 179N 180T 198L 240S
105N 150P 159V 179N 180T 198L 227E
105N 150P 156K 180T 198L 227E 240S
105N 150P 156K 179N 198L 227E 240S
105N 150P 156K 179N 180T 227E 240S
105N 150P 156K 179N 180T 198L 240S
105N 150P 156K 179N 180T 198L 227E
105N 150P 156K 159V 198L 227E 240S
105N 150P 156K 159V 180T 227E 240S
105N 150P 156K 159V 180T 198L 240S
105N 150P 156K 159V 180T 198L 227E

105N 150P 156K 159V 179N 227E 240S
105N 150P 156K 159V 179N 198L 240S
105N 150P 156K 159V 179N 198L 227E
105N 150P 156K 159V 179N 180T 240S
105N 150P 156K 159V 179N 180T 227E
105N 150P 156K 159V 179N 180T 198L
105N 150P 156T 179N 198L 227E 240S
105N 150P 156T 179N 180T 227E 240S
105N 150P 156T 179N 180T 198L 240S
105N 150P 156T 179N 180T 198L 227E
105N 150P 156T 159V 198L 227E 240S
105N 150P 156T 159V 180T 227E 240S
105N 150P 156T 159V 180T 198L 240S
105N 150P 156T 159V 180T 198L 227E
105N 150P 156T 159V 179N 198L 240S
105N 150P 156T 159V 179N 198L 227E
105N 150P 156T 180T 198L 227E 240S
105N 156T 159V 179N 198L 227E 240S
105N 156T 159V 179N 180T 198L 240S
105N 156T 159V 179N 180T 227E 240S
105N 156T 159V 180T 198L 227E 240S
95K 156T 159V 179N 198L 227E 240S
95K 156T 159V 179N 180T 227E 240S
95K 156T 159V 179N 180T 198L 240S
95K 156T 159V 179N 180T 198L 227E
95K 150P 179N 180T 198L 227E 240S
95K 150P 159V 180T 198L 227E 240S
95K 150P 159V 179N 198L 227E 240S
95K 150P 159V 179N 180T 227E 240S
95K 150P 159V 179N 180T 198L 240S
95K 150P 159V 179N 180T 198L 227E
105N 150P 156T 159V 179N 227E 240S
105N 150P 156T 159V 179N 180T 240S
105N 150P 156T 159V 179N 180T 227E
105N 150P 156T 159V 179N 180T 198L
95K 159V 179N 180T 198L 227E 240S
95K 156K 179N 180T 198L 227E 240S
95K 156K 159V 180T 198L 227E 240S
95K 156K 159V 179N 198L 227E 240S
95K 156K 159V 179N 180T 227E 240S
95K 156K 159V 179N 180T 198L 240S
95K 156K 159V 179N 180T 198L 227E
95K 156T 179N 180T 198L 227E 240S
95K 156T 159V 180T 198L 227E 240S
95K 150P 156K 159V 179N 180T 227E
95K 150P 156K 159V 179N 180T 198L
95K 150P 156T 180T 198L 227E 240S

95K 150P 156T 179N 198L 227E 240S
95K 150P 156T 179N 180T 227E 240S
95K 150P 156T 179N 180T 198L 240S
95K 150P 156T 179N 180T 198L 227E
95K 150P 156T 159V 198L 227E 240S
95K 150P 156T 159V 180T 227E 240S
95K 150P 156T 159V 180T 198L 240S
95K 150P 156T 159V 180T 198L 227E
95K 150P 156T 159V 179N 227E 240S
95K 150P 156T 159V 179N 198L 240S
95K 150P 156T 159V 179N 198L 227E
95K 150P 156T 159V 179N 180T 240S
95K 150P 156T 159V 179N 180T 227E
95K 150P 156K 180T 198L 227E 240S
95K 150P 156K 179N 198L 227E 240S
95K 150P 156K 179N 180T 227E 240S
95K 150P 156K 179N 180T 198L 240S
95K 150P 156K 179N 180T 198L 227E
95K 150P 156K 159V 198L 227E 240S
95K 150P 156K 159V 180T 227E 240S
95K 150P 156K 159V 180T 198L 240S
95K 150P 156K 159V 180T 198L 227E
95K 150P 156K 159V 179N 227E 240S
95K 150P 156K 159V 179N 198L 240S
95K 150P 156K 159V 179N 198L 227E
95K 150P 156K 159V 179N 180T 240S
95K 105N 156K 180T 198L 227E 240S
95K 105N 156K 179N 198L 227E 240S
95K 105N 156K 179N 180T 227E 240S
95K 105N 156K 179N 180T 198L 240S
95K 105N 156K 179N 180T 198L 227E
95K 105N 156K 159V 198L 227E 240S
95K 105N 156K 159V 180T 227E 240S
95K 105N 156K 159V 180T 198L 240S
95K 105N 156K 159V 180T 198L 227E
95K 105N 156K 159V 179N 227E 240S
95K 105N 156K 159V 179N 198L 240S
95K 105N 156K 159V 179N 198L 227E
95K 105N 156K 159V 179N 180T 240S
95K 105N 156K 159V 179N 180T 227E
95K 105N 156K 159V 179N 180T 198L
95K 105N 156T 180T 198L 227E 240S
95K 150P 156T 159V 179N 180T 198L
95K 105N 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 159V 180T 198L 227E 240S
95K 105N 159V 179N 198L 227E 240S
95K 105N 159V 179N 180T 227E 240S

95K 105N 159V 179N 180T 198L 240S
95K 105N 159V 179N 180T 198L 227E
95K 105N 156T 159V 180T 198L 227E
95K 105N 156T 159V 179N 227E 240S
95K 105N 156T 159V 179N 198L 240S
95K 105N 156T 159V 179N 198L 227E
95K 105N 156T 159V 179N 180T 240S
95K 105N 156T 159V 179N 180T 227E
95K 105N 156T 159V 179N 180T 198L
95K 105N 150P 180T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 179N 198L 227E 240S
95K 105N 150P 179N 180T 227E 240S
95K 105N 150P 179N 180T 198L 240S
95K 105N 150P 179N 180T 198L 227E
95K 105N 150P 159V 198L 227E 240S
95K 105N 150P 159V 180T 227E 240S
95K 105N 150P 159V 180T 198L 240S
95K 105N 150P 159V 180T 198L 227E
95K 105N 150P 159V 179N 227E 240S
95K 105N 150P 159V 179N 198L 240S
95K 105N 150P 159V 179N 198L 227E
95K 105N 150P 159V 179N 180T 240S
95K 105N 150P 159V 179N 180T 227E
95K 105N 150P 159V 179N 180T 198L
95K 105N 150P 156K 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156T 179N 227E 240S
95K 105N 150P 156T 179N 198L 240S
95K 105N 150P 156T 179N 198L 227E
95K 105N 150P 156T 179N 180T 240S
95K 105N 150P 156T 179N 180T 227E
95K 105N 150P 156T 179N 180T 198L
95K 105N 150P 156T 159V 227E 240S
95K 105N 150P 156T 159V 198L 240S
95K 105N 150P 156T 159V 198L 227E
95K 105N 150P 156T 159V 180T 240S
95K 105N 150P 156T 159V 180T 227E
95K 105N 150P 156T 159V 180T 198L
95K 105N 150P 156T 159V 179N 240S
95K 105N 150P 156T 159V 179N 227E
95K 105N 150P 156T 159V 179N 198L
95K 105N 150P 156T 159V 179N 180T
95K 105N 156T 179N 198L 227E 240S
95K 105N 156T 179N 180T 227E 240S
95K 105N 156T 179N 180T 198L 240S
95K 105N 156T 179N 180T 198L 227E
95K 105N 156T 159V 198L 227E 240S
95K 105N 156T 159V 180T 227E 240S

95K 105N 156T 159V 180T 198L 240S
95K 105N 150P 156K 180T 227E 240S
95K 105N 150P 156K 180T 198L 240S
95K 105N 150P 156K 180T 198L 227E
95K 105N 150P 156K 179N 227E 240S
95K 105N 150P 156K 179N 198L 240S
95K 105N 150P 156K 179N 198L 227E
95K 105N 150P 156K 179N 180T 240S
95K 105N 150P 156K 179N 180T 227E
95K 105N 150P 156K 179N 180T 198L
95K 105N 150P 156K 159V 227E 240S
95K 105N 150P 156K 159V 198L 240S
95K 105N 150P 156K 159V 198L 227E
95K 105N 150P 156K 159V 180T 240S
95K 105N 150P 156K 159V 180T 227E
95K 105N 150P 156K 159V 180T 198L
95K 105N 150P 156K 159V 179N 240S
95K 105N 150P 156K 159V 179N 227E
95K 105N 150P 156K 159V 179N 198L
95K 105N 150P 156K 159V 179N 180T
95K 105N 150P 156T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156T 180T 227E 240S
95K 105N 150P 156T 180T 198L 240S
95K 105N 150P 156T 180T 198L 227E
105N 150P 156K 159V 179N 198L 227E 240S
105N 150P 156K 159V 179N 180T 227E 240S
105N 150P 156K 159V 179N 180T 198L 240S
105N 150P 156K 159V 179N 180T 198L 227E
105N 150P 156T 179N 180T 198L 227E 240S
105N 150P 156T 159V 180T 198L 227E 240S
105N 150P 156T 159V 179N 198L 227E 240S
105N 150P 156T 159V 179N 180T 227E 240S
105N 150P 156T 159V 179N 180T 198L 240S
105N 150P 156T 159V 179N 180T 198L 227E
95K 150P 156T 159V 179N 180T 198L 240S
95K 150P 156T 159V 179N 180T 198L 227E
95K 105N 159V 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 156K 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 156K 159V 180T 198L 227E 240S
95K 105N 156K 159V 179N 198L 227E 240S
95K 105N 156K 159V 179N 180T 227E 240S
95K 105N 156K 159V 179N 180T 198L 240S
95K 105N 156K 159V 179N 180T 198L 227E
95K 105N 156T 179N 180T 198L 227E 240S
95K 156K 159V 179N 180T 198L 227E 240S
95K 156T 159V 179N 180T 198L 227E 240S
95K 150P 159V 179N 180T 198L 227E 240S

95K 150P 156K 179N 180T 198L 227E 240S
95K 150P 156K 159V 180T 198L 227E 240S
95K 150P 156K 159V 179N 198L 227E 240S
95K 105N 150P 159V 180T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156T 179N 180T 198L 227E
95K 105N 150P 156T 159V 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156T 159V 180T 227E 240S
95K 105N 150P 156T 159V 180T 198L 240S
95K 105N 150P 156T 159V 180T 198L 227E
95K 105N 150P 156T 159V 179N 180T 227E
105N 150P 156K 159V 180T 198L 227E 240S
105N 150P 156K 179N 180T 198L 227E 240S
105N 150P 159V 179N 180T 198L 227E 240S
105N 156K 159V 179N 180T 198L 227E 240S
105N 156T 159V 179N 180T 198L 227E 240S
150P 156K 159V 179N 180T 198L 227E 240S
150P 156T 159V 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156T 179N 180T 198L 240S
95K 105N 150P 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 156T 159V 179N 180T 198L 240S
95K 105N 156T 159V 179N 180T 198L 227E
95K 105N 156T 159V 179N 180T 227E 240S
95K 105N 156T 159V 179N 198L 227E 240S
95K 105N 156T 159V 180T 198L 227E 240S
95K 150P 156K 159V 179N 180T 198L 240S
95K 150P 156K 159V 179N 180T 198L 227E
95K 150P 156K 159V 179N 180T 227E 240S
95K 150P 156T 159V 179N 180T 227E 240S
95K 150P 156T 159V 179N 198L 227E 240S
95K 150P 156T 159V 180T 198L 227E 240S
95K 150P 156T 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156T 159V 179N 180T 198L
95K 105N 150P 159V 179N 198L 227E 240S
95K 105N 150P 159V 179N 180T 227E 240S
95K 105N 150P 159V 179N 180T 198L 240S
95K 105N 150P 159V 179N 180T 198L 227E
95K 105N 150P 156K 180T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156K 179N 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156K 179N 180T 227E 240S
95K 105N 150P 156K 179N 180T 198L 240S
95K 105N 150P 156K 179N 180T 198L 227E
95K 105N 150P 156K 159V 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156K 159V 180T 227E 240S
95K 105N 150P 156K 159V 180T 198L 240S
95K 105N 150P 156K 159V 180T 198L 227E
95K 105N 150P 156K 159V 179N 227E 240S
95K 105N 150P 156K 159V 179N 198L 240S

95K 105N 150P 156K 159V 179N 198L 227E
95K 105N 150P 156K 159V 179N 180T 240S
95K 105N 150P 156K 159V 179N 180T 227E
95K 105N 150P 156K 159V 179N 180T 198L
95K 105N 150P 156T 180T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156T 179N 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156T 179N 180T 227E 240S
95K 105N 150P 156T 159V 179N 227E 240S
95K 105N 150P 156T 159V 179N 198L 240S
95K 105N 150P 156T 159V 179N 198L 227E
95K 105N 150P 156T 159V 179N 180T 240S
105N 150P 156K 159V 179N 180T 198L 227E 240S
105N 150P 156T 159V 179N 180T 198L 227E 240S
95K 150P 156K 159V 179N 180T 198L 227E 240S
95K 150P 156T 159V 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 156K 159V 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 156T 159V 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 159V 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156K 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156K 159V 180T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156K 159V 179N 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156K 159V 179N 180T 227E 240S
95K 105N 150P 156K 159V 179N 180T 198L 240S
95K 105N 150P 156K 159V 179N 180T 198L 227E
95K 105N 150P 156T 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156T 159V 180T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156T 159V 179N 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156T 159V 179N 180T 227E 240S
95K 105N 150P 156T 159V 179N 180T 198L 240S
95K 105N 150P 156T 159V 179N 180T 198L 227E
95K 105N 150P 156K 159V 179N 180T 198L 227E 240S
95K 105N 150P 156T 159V 179N 180T 198L 227E 240S

Ejemplo 30

Reversibilidad de la Actividad Enzimática Después de la Disminución en Temperatura

En este ejemplo, los mutantes hMMP-1 sensibles a la temperatura que se confirmaron en el Ejemplo 28B se procesaron por ensayo adicional para determinar si la actividad enzimática a 25°C fue reversible o irreversible seguida de exposición posterior a temperaturas elevadas seguidas por un regreso hasta 25°C. Los mutantes hMMP-1 se expresaron en tubos de cultivo de 14 ml, como se describen en el Ejemplo 28B. Los aciertos supuestos se probaron para

sus actividades bajo cinco condiciones: a 25°C, 34°C o 37°C, y a 34°C o 37°C y volvieron a exponer después a la temperatura requerida de 25°C (ver Tabla 16 para condiciones de reacción). Los mutantes que fueron activos a 25°C, muestran actividad disminuida cuando se elevan hasta 34°C o 37°C (esto es la relación de las actividades da 25°C/34°C o 25°C/37°C es igual a o mayor que 1.5), y muestran una actividad de línea basal cuando disminuyen de nuevo hasta 25°C se registraron como "Aciertos Reversibles". Los mutantes que fueron activos a 25°C, muestran actividad disminuida cuando se elevan hasta 34°C o 37°C (esto es la relación de las actividades a 25°C/34°C o 25°C/37°C es igual a o mayor que 1.5), y muestran la misma cantidad de actividad disminuida cuando se disminuyen de nuevo hasta 25°C se registraron como "Aciertos Irreversibles".

A. Condiciones de Reacción

La reversibilidad de la actividad enzimática de cada mutante hMMP-1 se determinó usando el ensayo de fluorescencia descrito previamente como se modifica a continuación. En pocas palabras, los 4 ul del sobrenadante de cada mutante hMMP-1 se diluyó en TCNB con APMA 1 mM y transfirió a una placa de 96 pozos. Cinco pozos diferentes se prepararon para cada mutante hMMP-1 como se establece en la Tabla 16. La solución se incubó a la temperatura de reacción inicial (25°C, 34°C, o 37°C) durante 2 horas. Esta etapa de activación desdobla el pro-péptido y genera hMMP-1 maduro.

Después de la activación, 100 µl de TCNB con 10 µM de sustrato fluorescente Mca-K-P-L-G-L-Dpa-A-R-NH_2 se agregó a cada pozo y las condiciones de reacción fueron como se resume en la Tabla 28, a continuación. Brevemente, cada mutante hMMP-1 se expuso a cada una de las cinco condiciones de reacción por incubación del mutante hMMP-1 en la presencia del sustrato fluorogénico durante una hora a la temperatura inicial. Para cada mutante, la actividad de línea basal a 25°C, 34°C, o 37°C se evaluó por incubación con el sustrato durante 1 hora adicional (condición de 2 horas) o durante la noche (condición durante la noche), seguido por medición de fluorescencia. Para evaluar la reversibilidad/irreversibilidad de la actividad, las muestras incubadas durante 1 hora adicional a 34°C, o 37°C se disminuyeron hasta 25°C y permitieron incubar durante ya sea una hora (condición de 2 horas) o 16 horas (condición durante la noche), seguido por la medición de fluorescencia. El hMMP-1 de tipo natural se usó como un control positivo y sobrenadante de células transformadas con solo vector se usó como un control negativo. La fluorescencia se detectó al medir la fluorescencia en un lector de placa fluorescente a 320 nm de excitación/405 nm de emisión. Las unidades de fluorescencia relativas (RFU) se determinaron. Las reacciones en duplicado se realizaron para cada muestra, temperatura de reacción, y control positivo y negativo.

Tabla 28. Condiciones de Reacción				
Condición	**Temperatura inicial**	**Incubación a 25 °C**	**2 Horas**	**Durante la noche**
25 °C	25 °C	-	2 horas	durante la noche
34 °C	34 °C	-	2 horas	durante la noche
34 °C to 25 °C	34 °C	25 °C	a) 34°C durante 1 hora b) 25°C durante 1 hora	a) 34°C durante 1 hora b) 25°C durante 16 horas
37 °C	37 °C	-	2 horas	durante la noche
37 °C to 25 °C	37 °C	25 °C	a) 37°C durante 1 hora b) 25°C durante 1 hora	a) 37°C durante 1 hora b) 25°C durante 16 horas

B. Resultados: Mutantes hMMP-1 parcialmente reversibles

Veintiséis mutantes hMMP-1 se determinaron para ser parcialmente reversibles. Aunque la actividad (en RFU) no regresa a la actividad de línea basal observada a 25°C, un incremento general en la actividad se observó cuando la temperatura se regresó hasta 25°C comparada con la actividad a 34°C o 37°C. Los resultados se muestran en las Tablas 29-32 a continuación, que enlistan las actividades (en RFU) y las relaciones de las actividades. Las Tablas 29 y 30 resumen los resultados de reversibilidad a 34°C o 37°C, respectivamente, de los mutantes parcialmente reversibles hMMP-1 bajo la condición de 2 horas. Las Tablas 31 y 32 resumen los resultados de reversibilidad a 34°C o 37°C, respectivamente, de los mutante hMMP-1 parcialmente reversibles bajo la condición durante la noche. Los resultados son similares bajo todas las condiciones de reacción, temperatura y tiempo. La actividad a 34°C o 37°C durante la noche es menor que la actividad cuando se incuba a 34°C o 37°C durante una hora luego 25°C durante la noche. Por ejemplo, la actividad de E180Y a 34°C es 6080 RFU pero

su actividad a 34°C luego durante la noche a 25°C incrementa hasta 8570 RFU (ver Tabla 31, a continuación).

Tabla 29. Mutantes hMMP-1 parcialmente reversibles (2 Horas, 34°C)

mutación hMMP-1	SEQ ID NO	RFU 25 °C	RFU 34 °C	RFU 34 to 25°C	Relación 25°C/ 34°C	Relación 25°C/ 34 to 25°C
D105A	340	5669.31	824.07	922.97	6.88	6.14
D105F	336	2980.00	623.89	725.03	4.78	4.11
D105G	335	8821.81	2759.24	2966.37	3.20	2.97
D105S	334	9355.63	4607.18	6681.63	2.03	1.40
D105T	333	4457.16	974.63	1534.71	4.57	2.90
R150P	345	8750.30	2315.11	2506.15	3.78	3.49
G159T	359	6704.95	2294.40	2344.57	2.92	2.86
E180Y	374	8557.09	4979.24	6224.87	1.72	1.37
E180T	373	7870.99	1532.35	1852.46	5.14	4.25
E180F	377	8508.13	3597.75	3915.71	2.36	2.17
T185H	389	5593.77	2278.26	2429.05	2.46	2.30
T185Q	391	7006.87	2250.58	2397.60	3.11	2.92
T185A	395	2474.96	663.82	822.83	3.73	3.01
T185E	388	3948.43	2088.15	1862.83	1.89	2.12
N187R	398	3006.08	1352.97	1343.94	2.22	2.24
N187M	402	4934.44	1811.35	1793.14	2.72	2.75
N187K	397	4182.49	2425.34	2415.57	1.72	1.73
R195V	411	4847.81	2724.92	2517.49	1.78	1.93
A198L	416	6756.76	2056.50	2046.15	3.29	3.30
A198M	415	3777.50	1708.61	1725.14	2.21	2.19
S210V	419	3349.95	1249.47	1622.57	2.68	2.06
Y218S	421	2878.50	2373.98	2187.48	1.21	1.32
F223E	422	8318.70	3685.68	5283.08	2.26	1.57
V227W	437	996.55	729.20	834.38	1.37	1.19
L229I	441	2790.27	1050.86	1738.46	2.66	1.61
I240C	448	2688.75	561.91	884.15	4.78	3.04

006439

mutación Relación Relación

hMMP-1 Mutantes hMMP-1 parcialmente reversibles (2 Horas, 37°C)

hMMP-1 mutation	SEQ ID NO	RFU 25 °C	RFU 37 °C	RFU 37 to 25°C	Ratio 25°C/ 37°C	Ratio 25°C/ 37 to 25°C
D105A	340	5669.31	1336.14	1509.52	4.24	3.76
D105F	336	2980.00	818.63	1004.23	3.64	2.97
D105G	335	8821.81	4313.40	4643.53	2.05	1.90
D105S	334	9355.63	7274.97	7453.42	1.29	1.26
D105T	333	4457.16	2220.03	2177.84	2.01	2.05
R150P	345	8750.30	2497.86	3115.73	3.50	2.81
G159T	359	6704.95	2347.74	2530.78	2.86	2.65
E180Y	374	8557.09	6079.36	6421.56	1.41	1.33
E180T	373	7870.99	1794.15	1824.99	4.39	4.31
E180F	377	8508.13	3975.22	3981.79	2.14	2.14
T185H	389	5593.77	2534.15	2693.25	2.21	2.08
T185Q	391	7006.87	2642.74	2589.77	2.65	2.71
T185A	395	2474.96	707.09	730.58	3.50	3.39
T185E	388	3948.43	2091.32	2106.55	1.89	1.87
N187R	398	3006.08	1421.87	1476.42	2.11	2.04
N187M	402	4934.44	1893.07	1998.97	2.61	2.47
N187K	397	4182.49	2652.79	2902.79	1.58	1.44

000435

R195V	411	4847.81	2984.10	3555.03	1.62	1.36
A198L	416	6756.76	2642.76	2540.07	2.56	2.66
A198M	415	3777.50	2155.58	2802.78	1.75	1.35
S210V	419	3349.95	2314.86	2277.32	1.45	1.47
Y218S	421	2878.50	2350.27	2383.67	1.22	1.21
F223E	422	8318.70	6209.93	7415.02	1.34	1.12
V227W	437	996.55	787.87	850.67	1.26	1.17
L229I	441	2790.27	1803.44	2453.07	1.55	1.14
I240C	448	2688.75	853.66	872.62	3.15	3.08

Tabla 31. Mutantes hMMP-1 parcialmente reversibles (durante la noche , 34°C)

mutación hMMP-1	SEQ ID NO	RFU 25 °C	RFU 34 °C	RFU 34 to 25°C	Relación 25°C/ 34°C	Relación 25°C/ 34 to 25°C
D105A	340	8466.62	1302.84	1532.38	6.50	5.53
D105F	336	6725.59	938.60	1172.86	7.17	5.73
D105G	335	8940.06	3560.75	5314.44	2.51	1.68
D105S	334	9300.85	5584.70	9413.56	1.67	0.99
D105T	333	7910.47	1899.25	3254.16	4.17	2.43
R150P	345	9011.11	3533.16	4443.96	2.55	2.03
G159T	359	9105.95	3210.57	4179.05	2.84	2.18
E180Y	374	9281.77	6080.89	8570.48	1.53	1.08
E180T	373	8475.04	2585.89	3901.87	3.28	2.17
E180F	377	9360.74	5183.25	7022.64	1.81	1.33
T185H	389	8531.85	3164.69	5520.76	2.70	1.55
T185Q	391	9044.23	3639.00	5467.27	2.49	1.65
T185A	395	6156.97	1110.68	1585.53	5.54	3.88
T185E	388	8479.18	3868.06	4836.97	2.19	1.75
N187R	398	7593.11	2415.63	3156.74	3.14	2.41
N187M	402	8605.76	2769.52	4008.68	3.11	2.15
N187K	397	8667.36	3458.94	5465.35	2.51	1.59
R195V	411	8634.05	4648.03	5966.81	1.86	1.45
A198L	416	8795.36	3469.36	5027.30	2.54	1.75
A198M	415	8352.73	3215.69	4220.51	2.60	1.98
S210V	419	7104.17	2441.96	3664.23	2.91	1.94
Y218S	421	7740.61	4057.37	5769.79	1.91	1.34
F223E	422	9650.44	4849.58	9311.40	1.99	1.04
V227W	437	3070.92	1370.13	1632.51	2.24	1.88
L229I	441	7333.92	1832.18	4427.24	4.00	1.66
I240C	448	6170.51	1174.96	2389.06	5.25	2.58

Tabla 32. Mutantes hMMP-1 parcialmente reversibles (durante la noche, 37°C)

mutación hMMP-1	SEQ ID NO	RFU 25 °C	RFU 37 °C	RFU 37 to	Relación 25°C/	Relación 25°C/

				25°C	37°C	37a 25°C
D105A	340	8466.62	1931.17	2589.08	4.38	3.27
D105F	336	6725.59	1173.23	1759.31	5.73	3.82
D105G	335	8940.06	5390.32	7139.57	1.66	1.25
D105S	334	9300.85	8234.95	8615.33	1.13	1.08
D105T	333	7910.47	3292.01	4482.74	2.40	1.76
R150P	345	9011.11	3559.66	5181.30	2.53	1.74
G159T	359	9105.95	3160.07	4338.35	2.88	2.10
E180Y	374	9281.77	6894.61	8986.47	1.35	1.03
E180T	373	8475.04	2809.15	3649.72	3.02	2.32
E180F	377	9360.74	5335.15	7183.36	1.75	1.30
T185H	389	8531.85	3515.59	6101.91	2.43	1.40
T185Q	391	9044.23	4012.93	5623.60	2.25	1.61
T185A	395	6156.97	1059.61	1315.46	5.81	4.68
T185E	388	8479.18	3892.33	5330.81	2.18	1.59
N187R	398	7593.11	2370.01	3425.18	3.20	2.22
N187M	402	8605.76	2720.28	4400.27	3.16	1.96
N187K	397	8667.36	3709.62	6374.32	2.34	1.36
R195V	411	8634.05	4960.91	7212.05	1.74	1.20
A198L	416	8795.36	4181.78	5395.22	2.10	1.63
A198M	415	8352.73	3637.79	5914.49	2.30	1.41
S210V	419	7104.17	3939.90	4626.58	1.80	1.54
Y218S	421	7740.61	4093.29	6181.92	1.89	1.25
F223E	422	9650.44	7645.34	9149.09	1.26	1.05
V227W	437	3070.92	1456.45	1695.81	2.11	1.81
L229I	441	7333.92	3268.93	5729.00	2.24	1.28
I240C	448	6170.51	2223.23	2050.31	2.78	3.01

C. Resultados: Mutantes hMMP-1 no reversibles

Treinta y ocho mutantes hMMP-1 se determinaron para ser no reversibles. La actividad de estos mutantes a 34°C o 37°C, que se disminuye comparada con la actividad a 25°C, permanece disminuida cuando disminuye hasta 25°C. Los resultados se muestran en las Tablas 33-36 a continuación, que enlista las actividades (en RFU) y las relaciones de las actividades. Las Tablas 33 y 34 resumen los resultados o a 34°C o 37°C, respectivamente, de los mutantes hMMP-1 irreversibles bajo la condición de dos

horas. Las Tablas 35 y 36 resumen los resultados de reversibilidad a 34°C o 37°C, respectivamente, de los mutantes hMMP-1 irreversibles bajo la condición de durante la noche. Los resultados son similares bajo todas las condiciones de reacción, temperatura y tiempo. La actividad a 34°C o 37°C durante la noche es la misma o similar a la actividad cuando se incuba a 34°C o 37°C durante una hora luego 25°C durante la noche. Por ejemplo, la actividad de D105R a 34°C es 1407 RFU y su actividad a 34°C luego durante la noche a 25°C es 1424 RFU (ver Tabla 35, a continuación).

Tabla 33. Mutantes hMMP-1 no reversibles (2 horas, 34°C)						
mutación hMMP-1	SEQ ID NO	RFU 25 °C	RFU 34 °C	RFU 34 hasta 25°C	Relación 25°C/ 34°C	Relación 25°C/ 34 to 25°C
L95K	328	4650.42	748.29	833.29	6.21	5.58
D105I	338	6832.34	780.32	908.39	8.76	7.52
D105L	339	4206.38	534.24	630.66	7.87	6.67
D105N	332	8920.05	918.13	1128.03	9.72	7.91
D105R	331	2821.20	722.46	843.19	3.90	3.35
D105W	337	6663.80	1690.93	2266.26	3.94	2.94
D151G	346	1264.62	589.27	664.86	2.15	1.90
F155A	348	2824.01	779.72	735.02	3.62	3.84
D156K	350	8576.47	2210.63	2318.28	3.88	3.70
D156T	352	8727.27	2679.17	2770.95	3.26	3.15
D156L	356	2916.24	576.84	655.46	5.06	4.45
D156A	357	2299.63	533.68	635.67	4.31	3.62
D156W	354	1502.86	539.74	637.12	2.78	2.36
D156V	355	1593.06	534.71	634.83	2.98	2.51
D156H	349	5387.79	698.77	784.55	7.71	6.87
D156R	351	7020.81	793.83	881.39	8.84	7.97
G159V	363	4673.44	856.78	789.92	5.45	5.92
A176F	365	1609.85	654.43	633.13	2.46	2.54
D179N	368	5660.69	644.51	644.98	8.78	8.78
D181L	382	2710.97	619.39	645.65	4.38	4.20
D181K	378	1130.63	625.01	609.58	1.81	1.85
E182T	384	3702.08	791.23	805.48	4.68	4.60
E182Q	383	1331.50	639.84	623.88	2.08	2.13
T185R	390	2637.31	1187.63	1158.47	2.22	2.28
N187F	401	3227.96	877.21	823.16	3.68	3.92
N187I	404	4218.55	849.11	869.19	4.97	4.85
G206A	418	872.27	603.01	592.13	1.45	1.47
G206S	417	932.69	492.65	507.75	1.89	1.84
V227C	433	1998.67	950.01	1115.17	2.10	1.79
V227E	430	7904.54	839.00	906.06	9.42	8.72
Q228P	439	1082.56	607.78	617.33	1.78	1.75
L229T	440	1221.05	580.15	605.83	2.10	2.02
D233E	443	2195.02	1393.95	1332.07	1.57	1.65
I234A	447	2375.42	1473.70	1456.58	1.61	1.63
I234T	446	1199.18	713.83	775.40	1.68	1.55
I234E	444	3920.02	705.86	829.15	5.55	4.73
I240S	449	3867.71	973.97	1027.84	3.97	3.76

Tabla 34. Mutantes hMMP-1 no reversibles (2 horas, 37°C)						
mutación hMMP-1	SEQ ID NO	RFU 25 °C	RFU 37 °C	RFU 37 hasta 25°C	Relación 25°C/ 37°C	Relación 25°C/ 37 hasta 25°C
L95K	328	4650.42	746.89	1092.61	6.23	4.26
D105I	338	6832.34	1110.07	1104.96	6.15	6.18
D105L	339	4206.38	607.46	624.88	6.92	6.73
D105N	332	8920.05	1727.44	1820.97	5.16	4.90
D105R	331	2821.20	813.68	846.09	3.47	3.33
D105W	337	6663.80	3081.59	3123.49	2.16	2.13
D151G	346	1264.62	616.51	628.65	2.05	2.01
F155A	348	2824.01	746.59	867.76	3.78	3.25
D156K	350	8576.47	2310.30	2080.22	3.71	4.12
D156T	352	8727.27	2752.35	2251.21	3.17	3.88
D156L	356	2916.24	688.08	652.06	4.24	4.47
D156A	357	2299.63	554.21	606.45	4.15	3.79
D156W	354	1502.86	575.12	582.43	2.61	2.58
D156V	355	1593.06	542.36	544.49	2.94	2.93
D156H	349	5387.79	819.82	881.23	6.57	6.11
D156R	351	7020.81	872.40	944.17	8.05	7.44
G159V	363	4673.44	838.46	932.14	5.57	5.01
A176F	365	1609.85	618.72	741.21	2.60	2.17
D179N	368	5660.69	656.31	636.18	8.63	8.90
D181L	382	2710.97	611.92	668.31	4.43	4.06
D181K	378	1130.63	608.68	646.77	1.86	1.75
E182T	384	3702.08	826.28	746.25	4.48	4.96
E182Q	383	1331.50	623.11	629.01	2.14	2.12
T185R	390	2637.31	1183.37	1158.87	2.23	2.28
N187F	401	3227.96	931.04	856.03	3.47	3.77
N187I	404	4218.55	887.80	879.78	4.75	4.80
G206A	418	872.27	586.57	654.37	1.49	1.33
G206S	417	932.69	463.60	552.97	2.01	1.69
V227C	433	1998.67	992.19	1130.51	2.01	1.77
V227E	430	7904.54	1015.12	1127.74	7.79	7.01
Q228P	439	1082.56	586.63	777.28	1.85	1.39
L229T	440	1221.05	564.49	747.87	2.16	1.63
D233E	443	2195.02	1454.71	1976.42	1.51	1.11
I234A	447	2375.42	1594.08	1460.23	1.49	1.63
I234T	446	1199.18	796.81	833.55	1.50	1.44
I234E	444	3920.02	923.57	867.78	4.24	4.52
I240S	449	3867.71	1575.05	1594.10	2.46	2.43

Tabla 35. Mutantes hMMP-1 no reversibles (Durante la noche, 34°C)						
mutación hMMP-1	SEQ ID NO	RFU 25 °C	RFU 34 °C	RFU 34 hasta	Relación 25°C/	Relación 25°C/

				25°C	34°C	34 hasta 25°C
L95K	328	7744.34	1803.12	1892.59	4.29	4.09
D105I	338	8394.32	1614.57	1736.52	5.20	4.83
D105L	339	6546.78	957.95	988.23	6.83	6.62
D105N	332	9119.04	1459.16	1822.40	6.25	5.00
D105R	331	5775.25	1407.06	1424.59	4.10	4.05
D105W	337	8617.36	2851.22	4709.94	3.02	1.83
D151G	346	1956.65	959.80	1013.03	2.04	1.93
F155A	348	4891.89	2016.76	1493.70	2.43	3.28
D156K	350	8696.27	3968.92	4371.25	2.19	1.99
D156T	352	8972.20	3971.43	4480.62	2.26	2.00
D156L	356	5254.55	972.64	1011.27	5.40	5.20
D156A	357	3585.37	1098.25	1057.84	3.26	3.39
D156W	354	2570.24	1091.27	1126.01	2.36	2.28
D156V	355	2208.99	954.21	954.54	2.31	2.31
D156H	349	7587.19	1451.49	1440.25	5.23	5.27
D156R	351	8622.23	1735.02	1760.60	4.97	4.90
G159V	363	6555.27	1821.53	1524.05	3.60	4.30
A176F	365	4191.69	1414.21	1181.99	2.96	3.55
D179N	368	7317.57	1504.84	1458.70	4.86	5.02
D181L	382	4534.34	1078.98	984.43	4.20	4.61
D181K	378	1869.47	946.27	841.77	1.98	2.22
E182T	384	6752.25	1483.52	1570.77	4.55	4.30
E182Q	383	2212.75	1065.07	929.49	2.08	2.38
T185R	390	6281.97	2425.71	2808.30	2.59	2.24
N187F	401	7352.85	1612.23	1533.32	4.56	4.80
N187I	404	8306.40	1459.25	1598.90	5.69	5.20
G206A	418	2492.53	1038.14	906.63	2.40	2.75
G206S	417	2845.84	908.82	816.00	3.13	3.49
V227C	433	5833.84	2207.20	2739.65	2.64	2.13
V227E	430	8630.90	2283.07	2096.30	3.78	4.12
Q228P	439	3673.33	1162.95	1213.48	3.16	3.03
L229T	440	3543.75	1103.34	1105.90	3.21	3.20
D233E	443	6694.93	2570.71	3171.20	2.60	2.11
I234A	447	6250.56	3890.90	3608.10	1.61	1.73
I234T	446	3507.08	1099.58	1194.99	3.19	2.93
I234E	444	7541.73	1365.08	1817.16	5.52	4.15
I240S	449	4376.99	2108.15	2290.56	2.08	1.91

Tabla 36. Mutantes hMMP-1 no reversibles (Durante la noche, 37°C)

mutación hMMP-1	SEQ ID NO	RFU 25 °C	RFU 37 °C	RFU 37 hasta 25°C	Relación 25°C/ 37°C	Relación 25°C/ 37 hasta 25°C
L95K	328	7744.34	1677.96	2463.18	4.62	3.14

D105I	338	8394.32	1958.96	1925.73	4.29	4.36
D105L	339	6546.78	1070.51	939.53	6.12	6.97
D105N	332	9119.04	2347.74	2813.87	3.88	3.24
D105R	331	5775.25	1499.57	1312.01	3.85	4.40
D105W	337	8617.36	4593.06	5698.08	1.88	1.51
D151G	346	1956.65	1097.68	900.59	1.78	2.17
F155A	348	4891.89	1843.31	1882.95	2.65	2.60
D156K	350	8696.27	3858.90	4126.13	2.25	2.11
D156T	352	8972.20	3854.84	3990.29	2.33	2.25
D156L	356	5254.55	1232.94	1008.08	4.26	5.21
D156A	357	3585.37	1110.73	940.62	3.23	3.81
D156W	354	2570.24	1206.22	997.15	2.13	2.58
D156V	355	2208.99	997.64	777.35	2.21	2.84
D156H	349	7587.19	1763.27	1536.01	4.30	4.94
D156R	351	8622.23	1846.71	1764.13	4.67	4.89
G159V	363	6555.27	1683.20	1842.91	3.89	3.56
A176F	365	4191.69	1336.32	1553.01	3.14	2.70
D179N	368	7317.57	1485.28	1378.59	4.93	5.31
D181L	382	4534.34	1000.80	1020.08	4.53	4.45
D181K	378	1869.47	928.55	895.45	2.01	2.09
E182T	384	6752.25	1496.55	1319.53	4.51	5.12
E182Q	383	2212.75	1035.24	916.32	2.14	2.41
T185R	390	6281.97	2300.61	2829.34	2.73	2.22
N187F	401	7352.85	1704.23	1533.08	4.31	4.80
N187I	404	8306.40	1465.77	1560.83	5.67	5.32
G206A	418	2492.53	974.96	1057.32	2.56	2.36
G206S	417	2845.84	808.42	908.44	3.52	3.13
V227C	433	5833.84	2432.82	2707.71	2.40	2.15
V227E	430	8630.90	2152.81	2615.26	4.01	3.30
Q228P	439	3673.33	1081.32	1681.57	3.40	2.18
L229T	440	3543.75	1030.05	1488.58	3.44	2.38
D233E	443	6694.93	2661.43	4531.45	2.52	1.48
I234A	447	6250.56	4043.80	3433.03	1.55	1.82
I234T	446	3507.08	1228.23	1397.18	2.86	2.51
I234E	444	7541.73	1901.96	1783.16	3.97	4.23
I240S	449	4376.99	2592.19	3417.53	1.69	1.28

Ejemplo 31

Actividad Proteolítica de hMMP-1 en colágeno insoluble

En este ejemplo, la actividad de colagenasa de hMMP-1 se evaluó para el colágeno de sustrato de proteína usando análisis SDS-PAGE. El hMMP-1 de tipo natural desdobla colágeno insoluble (cadenas α1 (I) y α2(I)) en productos de digestión de longitud de tres cuartos y un cuarto. En este ensayo, un colágeno

006442

conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se usó como el sustrato y la reacción se vigiló por SDS-PAGE de los productos reacción. El desdoblamiento de cadenas de colágeno α1(I) y α 2(I) resulta en productos de digestión de longitud de tres cuartos y un cuarto que son distinguibles del colágeno de longitud completa por separación en geles de poliacrilamida SDS. Alternativamente, el desdoblamiento se evaluó por análisis fluorométrico. Un ensayo similar puede usarse para evaluar la actividad de hMMP mutantes para la actividad de desdoblamiento a 25°C contra 34°C o 37°C.

A. Análisis SDS-PAGE

En pocas palabras, 2 µg de hMMP-1 (adquirido de R&D Systems, #901-MP; o BAP006_2 y BAP006_10 purificado como se describe en el Ejemplo 27) se diluyó en TCNB que contiene AMPA 1 mM e incubó a la temperatura de reacción (25°C o 37°C) durante 2 horas. Esta etapa de activación desdobla el pro-péptido y genera hMMP-1 maduro. Posteriormente, 6 µg de colágeno insoluble conjugado para isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Anaspec #85111 o Sigma Collagen #C4361) en 20 µl de TCNB se agregó a cada alícuota hMMP-1 activada y la mezcla se incubó a 25°C o 37°C durante 24 horas o 6 días. El desdoblamiento del colágeno insoluble se observó por SDS/PAGE. La mezcla de reacción se separó en un gel de poliacrilamida SDS al 7.5% y visualizó por tinción con pigmento Coomassie Blue. Los resultados SDS/PAGE muestran que después de 24 horas de incubación a 25°C o 37°C, hMMP-1 parcialmente desdobla las cadenas de colágeno α1(I) y α2(I) en productos de digestión de

longitud ¾ y ¼ para todas las proteínas hMMP-1 probadas. Después de 6 días a 25°C, se observó el desdoblamiento completo en productos de digestión de longitud ¾ y ¼. Después de 6 días a 37°C, el colágeno se digirió completamente. Los productos de digestión de colágeno de longitud ¾ y ¼ están térmicamente inestables a temperatura corporal.

B. Análisis fluorométrico

Alternativamente, la actividad de colagenasa se midió usando un ensayo de fluorescencia. 5 µg de hMMP-1 (adquirido de R&D Systems, #901 -MP; o BAP006_2 y BAP006_10 purificado como se describe en el Ejemplo 27) se diluyó en TCNB que contiene AMPA 1 mM a una concentración final e incubó a 37°C durante 2 horas. La actividad de hMMP-1 para colágeno etiquetado FITC (Sigma #C4361 o Elastin #CF3O8) se evaluó usando un protocolo adaptado de Baici A et al. (1980) Anal. Biochem., 108: 230-232). Brevemente, hMMP-1 se incubó con el sustrato durante 144 horas a 37°C. Como un control negativo, el sustrato se incubó con solución amortiguadora únicamente. Después de la incubación, la mezcla de reacción se centrifugó primero para remover partículas insolubles. La fluorescencia del sobrenadante se detectó al medir la fluorescencia en un lector de placas fluorescentes a excitación 495 nm/emisión 520 nm. Las unidades de fluorescencia relativas (RFU) se determinaron. Las reacciones duplicadas se realizaron para cada muestra.

Los resultados (ver Tablas 37 y 38 a continuación) muestran que la incubación de colágeno insoluble con hMMP-1 de tipo natural a 37°C durante 144 horas resulta en desdoblamiento

de colágeno como se indica por valores RFU altos comparados con la solución amortiguadora únicamente de control. Por ejemplo, para el desdoblamiento de colágeno de Sigma, todos los hMMP probados tienen un RFU entre alrededor de 1000.00-1200.00 comparado con la solución amortiguadora únicamente con un valor RFU de alrededor de 400.00. La actividad de colágenos purificados de CHO-S (BAP006_2) y células BL21 (BAP006_10) para el desdoblamiento de colágeno insoluble Sigma fue comparable con hMMP-1 adquirido de sistemas R&D. Para el desdoblamiento de colágeno de Elastina, la actividad de hMMP-1 recombinante adquirida de R&D y BAP006_10 fueron alrededor de 3000.00 RFU, mientras que la actividad de BAP006_2 fue alrededor de 2000.00 RFU. La solución amortiguadora únicamente muestra una fluorescencia de respaldo para el desdoblamiento de colágeno de Elastina de alrededor de 1500.00 RFU.

Tabla 37. Desdoblamiento de Colágeno (Sustrato Insoluble Sigma)

hMMP-1	37 °C	37 °C	37°C promedio	Desv. Estándar
Sistemas R&D	1163.17	1137.81	1150.49	17.93
Solución amortiguadora únicamente	481.49	490.57	486.03	6.42
BAP006_2 (CHO)	1265.61	1275.17	1270.39	6.76
BAP006_10 (BL21)	1292.36	1335.14	1313.75	30.25

Tabla 38. Desdoblamiento de Colágeno (Sustrato Insoluble Elastina)

hMMP-1	37 °C	37 °C	37°C promedio	Desv. Estándar
Sistemas R&D	3488.224	2981.417	3235.32	357.66
Solución amortiguadora únicamente	1312.511	1807.479	1560.00	350.00
BAP006_2 (CHO)	1729.757	2297.573	2013.67	401.51
BAP006_10 (BL21)	2669.758	3056.381	2863.07	273.38

Ya que las modificaciones serán aparentes para aquellos de experiencia en esta técnica, se pretende que esta invención se limite únicamente por el alcance de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Una metaloproteasa-1 de matriz modificada (MMP-1), que comprende reemplazos de aminoácidos en la secuencia de los residuos de aminoácido de un polipéptido MMP-1 no modificado o un fragmento activo del mismo, en donde:

el polipéptido MMP-1 no modificado o el fragmento activo del mismo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 327, un fragmento activo del mismo, o una secuencia de aminoácidos que exhibe por lo menos 90% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 327 o un fragmento activo del mismo;

las modificaciones confieren al MMP o un fragmento activo del mismo, una relación de actividad enzimática de por lo menos 1.6 en una temperatura permisiva de 25° C comparado con una temperatura no permisiva de 37° C; y

si el MMP modificado es un fragmento activo del mismo, el fragmento activo exhibe la relación de actividad enzimática.

2. El polipéptido MMP modificado-1 de la reivindicación 1, en donde el fragmento activo comprende la secuencia de

aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 99, o una secuencia de aminoácidos que exhibe por lo menos 90 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO: 99.

3. El polipéptido MMP modificado-1 de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la modificación se reemplaza de aminoácidos y los reemplazos están en una posición que corresponde a una cualquiera o más posiciones 84, 85, 95, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 106, 109, 110, 111, 112, 118, 123, 124, 126, 147, 150, 151, 152, 153, 155, 156, 158, 159, 170, 171, 176, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 185, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 194, 195, 197, 198, 206, 207, 208, 210, 211, 212, 218, 223, 227, 228, 229, 230, 233, 234, 237, 240, 251, 254, 255, 256, 257 y 258 en un polipéptido MMP-1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 327.

4. El polipéptido MMP modificado-1 de la reivindicación 3, en donde el reemplazo de aminoácidos se selecciona de entre un reemplazo de aminoácidos que corresponde a R89S, R89N, L95K, D105A, D105F, D105G, D105I, D105L, D105N, D105R, D105S, D105T, D105W, L106P, H113D, R150P, D151G, D151M, F155A, D156L, D156A, D156W, D156V, D156H, D156K, D156T, D156R, D156M, P158W, P158F, G159V, G159T, A176F, D179N, E180Y, E180T, E180F, D181L, D181K, E182T, T185R, T185Y, T185H, T185G, T185V, T185Q, T185A, T185E, N187R, N187M, N187F, N187K, N187I, N187A, N192H, N192D, H194A, R195C,

R195G, R195V, A198L, A198M, S204V, G206A, G206S, L207R, S210V, Y218S, F223E, V227C, V227D, V227E, V227W, Q228P, L229T, L229I, A230L, D232S, D232L, D233E, I234A, I234T, I234E, I240S y I240C en polipéptido MMP-1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 327.

5. El polipéptido MMP modificado-1 de la reivindicación 4, en donde el reemplazo de aminoácidos se selecciona de entre un reemplazo de aminoácidos que corresponde a L95K, D105I, D105N, D105L, D105A, D105G, R150P, D156R, D156H, D156K, D156T, G159V, G159T, D179N, E180T, E180F, E182T, T185Q, N187I, A198L, V227E, I234E y I240S en un polipéptido MMP-1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 327.

6. El polipéptido MMP modificado-1 de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde el reemplazo de aminoácidos se selecciona de entre L95K, D105N, R150P, D156K, D156T, G159V, D179N, E180T, A198L, V227E, y I240S en un polipéptido MMP-1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 327.

7. El polipéptido MMP modificado-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde:

el polipéptido comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 reemplazo de aminoácidos comparado con el MMP-1 no modificado; y

por lo menos uno de los reemplazos confiere la relación de actividad enzimática.

8. El polipéptido MMP modificado-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polipéptido comprende dos o más reemplazos de aminoácidos y los reemplazos están en una posición que corresponde a cualquiera dos o más posiciones 95, 105, 150, 156, 159, 179, 180, 182, 185, 187, 198, 227, 234 y 240 en un polipéptido MMP-1 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 327.

9. El polipéptido MMP modificado-1 de la reivindicación 8, en donde los dos o más reemplazos de aminoácidos se seleccionan de entre reemplazos de aminoácidos que corresponden a L95K, D105N, R150P, D156K, D156T, G159V, D179N, E180T, A198L, V227E, y I240S en un polipéptido MMP-1 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 327.

10. El polipéptido MMP modificado-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el polipéptido MMP modificado-1 exhibe por lo menos 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 20.0, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o actividad enzimática más aumentada a una temperatura permisiva comparado con una temperatura no permisiva.

11. El MMP modificado-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde en la temperatura no permisiva, el polipéptido MMP modificado-1 tienen menor actividad ya que el polipéptido MMP-1 no modificado no incluyen el reemplazo de aminoácidos.

12. El polipéptido MMP modificado-1 de la reivindicación 11, en donde la actividad es menor de 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 3%, 1% o menor que la actividad del MMP-1 no modificado.

13. El polipéptido MMP modificado-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el polipéptido retiene la actividad del MMP-1 no modificado a la temperatura permisiva.

14. El polipéptido MMP modificado-1 de la reivindicación 13, en donde el polipéptido retiene por lo menos o aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 140%, 150% o más actividad.

15. El polipéptido MMP modificado-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 que es un zimógeno.

16. El polipéptido MMP modificado-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 que es una enzima activa.

17. El polipéptido MMP modificado-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 que solo contiene el dominio catalítico de un MMP, en donde el dominio catalítico contiene por lo menos uno de los reemplazos de aminoácidos que confiere la relación de actividad enzimática.

18. Una proteína de fusión, que comprende el MMP modificado-1 de la reivindicación 17 con un segundo polipéptido pero diferente que no es un MMP.

19. El polipéptido MMP modificado-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 que carece de todo o una parte de un ligador rico en prolina y/o un dominio hemopexina.

20. El polipéptido MMP modificado-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1-19 que comprende una o más modificaciones adicionales que confieren aumento en la estabilidad, aumento en la vida útil, especificidad alterada del sustrato y/o aumento en la resistencia a los inhibidores.

21. El polipéptido MMP modificado-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1-20 que se glucosila o PEGila.

22. El polipéptido MMP modificado-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1-21 que es una proteína de fusión.

23. El polipéptido MMP modificado-1 de la reivindicación 22 que se fusiona a un dominio Fc.

24. Una molécula de ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MMP-1 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-23.

25. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 24.

26. El vector de la reivindicación 25, en donde el vector es un vector procariótico, vector vírico o un vector eucariótico.

27. El vector de la reivindicación 26, en donde el vector es un vector de mamífero o un vector de levadura.

28. El vector de la reivindicación 26, en donde el vector se selecciona de entre un adenovirus, un virus adenoasociado, un retrovirus, un virus herpes, un lentivirus, un poxvirus, un citomegalovirus y *Pichia*.

29. Una célula, que comprende el vector de cualquiera de las reivindicaciones 25-28.

30. La célula de la reivindicación 29 que es una célula procariótica o una célula de mamífero.

31. Una composición farmacéutica, un polipéptido MMP-1 modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-23.

32. La composición farmacéutica de la reivindicación 31, en donde la composición se formula para administración de dosificación única.

33. La composición farmacéutica de la reivindicación 32, en donde la cantidad es o se aproxima a 10 µg a 100 mg, 50 µg a 75 mg, 100 µg a 50 mg, 250 µg a 25 mg, 500 µg a 10 mg, 1 mg a 5 mg, o 2 mg a 4 mg.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan métodos y combinaciones para controlar la duración de acción, *in vivo*, de enzimas que degradan matriz. Los métodos y combinaciones permiten la activación in vivo temporal de las enzimas que degradan matriz durante la administración a la matriz extracelular (o "ECM"). Las enzimas que degradan matriz que tienen una duración controlada de acción pueden usarse para tratar enfermedades o trastornos mediados por ECM caracterizados al incrementar la deposición o acumulación de uno o más componentes ECM.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0054099

Bogotá D.C., Junio 05 de 2013 - 15:12:10

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	155835536	05/06/2013	51.930.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
				$450.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-111097- -00010-0000
Fecha: 2013-06-26 15:35:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 457

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5
No. 13-151939- -00000-0000
Fecha: 2013-06-26 15:35:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 457

000456

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0059534

Bogotá D.C., Junio 18 de 2013 - 09:22:46

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643 R

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	54168	05/06/2013		125.000.00
RECIBO DE CA	999999999	54169	05/06/2013		125.000.00
RECIBO DE CA	999999999	119191	09/12/2011		728.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
23	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	690.000.00
				$690.000.00

SON: **SEISCIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-******-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-111097- -00010-0000
Fecha: 2013-06-26 15:35:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 457

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5
No. 13-151939- -00000-0000
Fecha: 2013-06-26 15:35:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 457

000457