

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391728 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.20(22) Дата подачи заявки
2022.01.10(51) Int. Cl. A61K 38/48 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)
A61K 38/49 (2006.01)

(54) ПРОТЕАЗЫ, РАСЩЕПЛЯЮЩИЕ ФАКТОР В

(31) 63/135,496; 63/221,108

(32) 2021.01.08; 2021.07.13

(33) US

(86) PCT/US2022/011873

(87) WO 2022/150729 2022.07.14

(71) Заявитель:
ВЕРТЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)

(72) Изобретатель:

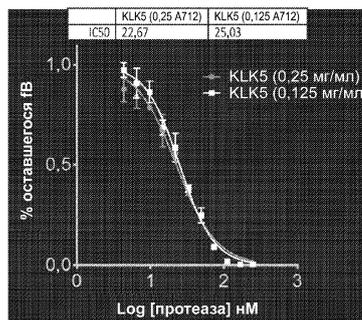
Попков Михаил, Сорос Ванесса, Ле
Моан Наташа, Блауз Грант И., Майлз
Тимоти (US)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)

(57) В изобретении предложены сконструированные протеазы семейства S1A, которые специфичны для расщепления фактора В и способны расщеплять его. Также предложены способы получения и применения таких сконструированных протеаз. Сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, могут быть полезны для лечения заболевания или состояния, связанного с нарушением регуляции системы комплемента, путем уменьшения активации комплемента посредством расщепления и инактивации фактора В.

Анализ расщепления FB при помощи KLK5



A1

202391728

202391728

A1

ПРОТЕАЗЫ, РАСЩЕПЛЯЮЩИЕ ФАКТОР В

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СМЕЖНУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/135,496, поданной 8 января 2021 г., и предварительной заявке на патент США № 63/221,108, поданной 13 июля 2021 г. содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Система комплемента включает в себя классические, альтернативные и лектиновые пути и строго контролируется рядом регуляторов и компонентов. Один такой компонент представляет собой фактор В комплемента (взаимозаменяемо называемый в настоящем документе CFB, фактор В, FB), профермент сериновой протеазы, который циркулирует в крови в виде одноцепочечного полипептида. Когда фактор В связывается с активными формами C3, такими как связанным с поверхностью C3b или жидкофазным C3(H₂O) с образованием проконвертазного комплекса, фактор В может далее расщепляться фактором D на два фрагмента, Ba и Bb. Сайт расщепления фактора В, который является мишенью для фактора D, включает связь Arg234-Lys235. Полученный продукт расщепления Ba является некаталитическим и высвобождается из комплекса, тогда как полученный продукт расщепления Bb представляет собой каталитическую сериновую протеазу, которая далее может расщеплять C3 на C3a и C3b. Такое образование C3b является частью контура усиления системы комплемента, что позволяет C3b связываться с другим фактором В с образованием C3bBb.

[0003] Фактор В и его продукты расщепления регулируют активацию комплемента. Нарушение регуляции комплемента происходит при заболеваниях, связанных с системой комплемента, и, таким образом, необходимы способы модуляции или ингибирования конкретных точек регуляции в системе комплемента, например генерация неактивных фрагментов фактора В. В настоящем документе предложены композиции и способы, которые удовлетворяют этим потребностям.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В настоящем документе предложены сконструированные, не встречающиеся в природе хомотрипсиноподобные сериновые протеазы. В настоящем документе также

предложены способы получения и применения такой не встречающейся в природе химотрипсиноподобной сериновой протеазы. Сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, могут быть полезны для лечения заболевания или состояния, связанного с нарушением регуляции системы комплемента или сверхактивации комплемента.

[0005] Соответственно, в одном аспекте в настоящем документе предложена сконструированная протеаза из семейства S1A сериновых протеаз, причем сконструированная протеаза специфична для фактора В и способна расщеплять его. Более конкретно, сконструированная протеаза по настоящему изобретению содержит модифицированный протеазный домен химазы, модифицированный протеазный домен сериновой протеазы мембранного типа 1 (MTSP-1), модифицированный протеазный домен активатора пламиногена урокиназного типа (uPA) или модифицированный протеазный домен родственной калликреину пептидазы 5 (KLK5), при этом сконструированная протеаза способна расщеплять фактор В. Модификации включают в себя одно или более из замены, добавления и делеции одного или более аминокислотных остатков и/или одного или более из замены, добавления и делеции одного или более доменов химотрипсиноподобной сериновой протеазы.

[0006] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза основана на домене MTSP-1 протеазы. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза не основана на протеазном домене MTSP-1. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза содержит одну или более модификаций относительно протеазного домена MTSP-1, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций выбраны из представленных в таблице 5А. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций выбраны из показательных мутационных строк, представленных в таблице 5В. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен сериновой протеазы 1 мембранного типа (MTSP-1), который содержит последовательность на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%,

на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 7.

[0007] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза основана на протеазном домене uPA. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза не основана на протеазном домене uPA. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза содержит одну или более модификаций относительно протеазного домена uPA, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций выбраны из представленных в таблице 3A. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций выбраны из показательных мутационных строк, представленных в таблице 3B. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен активатора плазминогена урокиназного типа (uPA), который содержит последовательность, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 22.

[0008] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза содержит одну или более модификаций относительно протеазного домена химазы, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций выбраны из представленных в таблице 7A. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций выбраны из показательных мутационных строк, представленных в таблице 7B. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен химазы, который содержит последовательность, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по

меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 6.

[0009] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза основана на протеазном домене KLK5, необязательно содержащем одну или более аминокислотных модификаций с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен родственной калликреину пептидазы 5 (KLK5), который содержит последовательность, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 23.

[0010] В некоторых вариантах осуществления расщепление фактора В сконструированной протеазой образует один или более функционально неактивных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления один или более функционально неактивных фрагментов способны уменьшать активацию комплемента. В некоторых вариантах осуществления расщепление фактора В приводит к формированию фрагмента фактора В со сниженной функциональностью.

[0011] В некоторых вариантах осуществления фактор В представляет собой фактор В грызуна. В некоторых вариантах осуществления фактор В представляет собой фактор В приматов, не являющихся человеком. В некоторых вариантах осуществления примат, не являющийся человеком, представляет собой яванского макака. В некоторых вариантах осуществления фактор В представляет собой фактор В человека. В некоторых вариантах осуществления фактор В содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

[0012] В некоторых вариантах осуществления расщепление фактора В происходит в сайте, который не является мишенью для фактора D. В некоторых вариантах осуществления расщепление в этом сайте генерирует по меньшей мере два фрагмента,

которые не являются Va и Vb. В некоторых вариантах осуществления расщепление в этом сайте приводит к снижению образования продуктов расщепления фактора В Va и Vb по сравнению с расщеплением фактором D.

[0013] В некоторых вариантах осуществления расщепление фактора В происходит в сайте, который является мишенью для фактора D. В некоторых вариантах осуществления сайт, являющийся мишенью для фактора D, содержит QQKR/KIV (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления фактора В содержит последовательность, выбранную из: WEHR/KGT (SEQ ID NO: 10), KNQKR/QKQ (SEQ ID NO: 11), DVFY/QMI (SEQ ID NO: 12), EGVD/AE (SEQ ID NO: 13), DHKL/KSG (SEQ ID NO: 14), TPW/SLA (SEQ ID NO: 15), KVSEAD (SEQ ID NO: 20), IRPSKG (SEQ ID NO: 4), GGEKRD (SEQ ID NO: 5), GKKEAG (SEQ ID NO: 3) и DHKL/KSG (SEQ ID NO: 21).

[0014] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза основана на MTSP-1 или uPA (включает в себя протеазный домен MTSP-1 или uPA), а сайт расщепления в факторе В содержит последовательность, выбранную из: WEHR/KGT (SEQ ID NO: 10) и KNQKR/QKQ (SEQ ID NO: 11).

[0015] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза основана на протеазном домене химазы. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза основана на протеазном домене химазы, а сайт расщепления содержит последовательность, выбранную из DVFY/QMI (SEQ ID NO: 12), EGVD/AE (SEQ ID NO: 13), DHKL/KSG (SEQ ID NO: 14) и TPW/SLA (SEQ ID NO: 15).

[0016] В некоторых вариантах осуществления расщепление фактора В приводит к образованию фрагмента фактора В, который имеет сниженную функциональность, или приводит к уменьшению функциональности фактора В. В некоторых вариантах осуществления функциональность фактора В или фрагмента фактора В представляет собой взаимодействие по меньшей мере с одним компонентом комплемента. В некоторых вариантах осуществления функциональность фактора В или фрагмента фактора В представляет собой взаимодействие с гидролизованным растворимым C3. В некоторых вариантах осуществления функциональность фактора В или фрагмента фактора В представляет собой взаимодействие с C3b. В некоторых вариантах осуществления

функциональность фактора В или фрагмента фактора В представляет собой взаимодействие со связанным с мембраной СЗб.

[0017] В некоторых вариантах осуществления расщепление происходит, когда фактор В не связан с СЗб.

[0018] В некоторых вариантах осуществления активность расщепления пептидного субстрата, не являющегося фактором В, примерно равна или меньше активности расщепления сайта фактора В.

[0019] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет отношение k_{cat}/K_m примерно 100, примерно 200, примерно 300, примерно 400, примерно 500, примерно 600, примерно 700, примерно 800, примерно 900, примерно 1000, примерно 1000, примерно 1100, примерно 1200, примерно 1300, примерно 1400, примерно 1500, примерно 1600, примерно 1,700, примерно 1800 или примерно 1900 $M^{-1} s^{-1}$ для расщепления фактора В. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет отношение k_{cat}/K_m от примерно 10^3 до примерно $10^9 M^{-1} s^{-1}$ для расщепления фактора В. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет EC_{50} для фактора В менее чем примерно 20 нМ. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет EC_{50} для фактора В менее чем примерно 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет EC_{50} для фактора В примерно 20, примерно 25 или примерно 60 нМ. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет EC_{50} для расщепления фактора В от примерно 1000 до примерно 4500 нМ.

[0020] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет период полувыведения из плазмы крови человека более чем примерно 72 часа. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет период полувыведения из плазмы крови человека более чем примерно 120 часов. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет период полувыведения из плазмы крови человека примерно 7 дней. В некоторых вариантах осуществления каталитическая активность составляет от примерно 10% до примерно 50%, или от примерно 90% до примерно 100%.

[0021] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с протеазным доменом MTSP-1, который не является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет увеличенную биодоступность по сравнению с протеазным доменом MTSP-1, который не является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с протеазным доменом uPA, который не является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет увеличенную биодоступность по сравнению с протеазным доменом uPA, который не является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с химазой, которая не является модифицированной. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет увеличенную биодоступность по сравнению с протеазным доменом химазы, который не является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза имеет увеличенную биодоступность по сравнению с протеазным доменом KLK5, который не является модифицированным.

[0022] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза не является иммуногенной.

[0023] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза находится в форме зимогена. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза находится в активной форме.

[0024] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза дополнительно содержит средство увеличения периода полувыведения. Показательные средства увеличения периода полувыведения включают в себя сывороточный альбумин человека (HSA) и Fc (например, IgG1), слитый со сконструированной протеазой.

[0025] В другом аспекте предложен способ инактивации фактора В, включающий приведение фактора В в контакт с любой из сконструированных протеаз по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления активация комплемента ингибируется. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибируется классический путь комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибируется

альтернативный путь комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибируется лектиновый путь пути комплемента.

[0026] В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ *in vivo*.

[0027] В другом аспекте предложен способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту любой из сконструированных протеаз по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние связано с нарушением регуляции комплемента. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой воспалительное заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления лечение представляет собой заместительную терапию. В некоторых вариантах осуществления лечение блокирует активацию комплемента. В некоторых вариантах осуществления лечение модулирует аутоиммунную реакцию. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой врожденную недостаточность комплемента. В некоторых вариантах осуществления лечение предназначено для повреждения эндотелиальных клеток или почечных клеток.

[0028] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние выбрано из волчаночного нефрита, С3-гломерулосклероза (С3-ГП), первичной IgA-нефропатии, ишемически-реперфузионного (I/R) поражения трансплантата почки, ассоциированных с антителами к цитоплазме нейтрофилов (АНЦА) васкулитов (ААВ), атипичного гемолитико-уремического синдрома (аГУС), мембранозной нефропатии (МН) и пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ). В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой недостаточность белка контроля. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой вторичное нарушение комплемента. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние, связанное с иммунитетом.

[0029] В некоторых вариантах осуществления сконструированную протеазу вводят субъекту подкожно.

[0030] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза активируется *in situ* в месте нахождения компонента комплемента с нарушенной регуляцией.

[0031] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза представлена в жидком стабильном составе.

[0032] В другом аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая любую из сконструированных протеаз по настоящему изобретению и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

[0033] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза представлена в жидком стабильном составе.

[0034] В некоторых вариантах осуществления композиция приготовлена для подкожного введения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0035] На ФИГ. 1А представлена принципиальная схема встречающегося в природе фактора В, показывающая сайт, в котором фактор В расщепляется фактором D (сайт расщепления FD; SEQ ID NO: 13, 9, 20, остатки 1–6 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4, 5, 3 и остатки 1–6 SEQ ID NO: 11).

[0036] На ФИГ. 1В и ФИГ. 1С показаны два изображения белковой структуры фактора В, демонстрирующие различные сайты расщепления (SEQ ID NO: 13, 9, 11, 10, остатки 1–6 SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 14).

[0037] На ФИГ. 1D показан окрашенный кумасси гель, демонстрирующий примеры расщепления фактора В с помощью сконструированных протеаз на основе химазы.

[0038] На ФИГ. 1Е представлен график, на котором показаны примеры расщепления фактора В с помощью двух сконструированных протеаз на основе химазы, имеющих низкое значение EC_{50} .

[0039] На ФИГ. 2А и ФИГ. 2В представлены принципиальные схемы прохимазы и зрелой химазы соответственно. Зрелая химаза представляет собой показательный каркас по настоящему изобретению.

[0040] На ФИГ. 3А и ФИГ. 3В представлены принципиальные схемы внеклеточной части сериновой протеазы 1 мембранного типа (MTSP-1) и серинового протеазного домена MTSP-1 соответственно.

[0041] На ФИГ. 3С и ФИГ. 3D представлены принципиальные схемы активатора плазминогена урокиназного типа (uPA или u-PA).

[0042] На ФИГ. 4А, ФИГ. 4В, ФИГ. 4С, ФИГ. 4D и ФИГ. 4Е представлены графики, демонстрирующие стабильность сконструированных протеаз на основе химазы, протестированных с использованием пептидного субстрата.

[0043] На ФИГ. 5 показана гистограмма контролей, используемых для анализа на гемолиз с возвратным добавлением фактора В.

[0044] На ФИГ. 6 представлен график, на котором показаны стандартные кривые результатов анализа на гемолиз с возвратным добавлением фактора В.

[0045] На ФИГ. 7А представлен график, демонстрирующий ингибирование гемолиза при помощи KLK5 и сконструированной протеазы на основе химазы C22S/F173Y/D175N/A226R.

[0046] На ФИГ. 7В представлен график, демонстрирующий расщепление FB с помощью KLK5 в двух концентрациях и сконструированной протеазы на основе химазы C22S/F173Y/D175N/A226R.

[0047] На ФИГ. 8А и ФИГ. 8В показаны окрашенные кумасси гели, демонстрирующие примеры расщепления фактора В при помощи KLK5 и сконструированной протеазы на основе химазы C22S/F173Y/D175N/A226R.

[0048] На ФИГ. 9 представлены данные масс-спектрометрии (МС), идентифицирующие сайт расщепления ²³⁴Arg в пределах сайта расщепления QQKR/KIV (SEQ ID NO: 9) фактора В с помощью KLK5 и идентифицирующие сайт расщепления ²²¹Asp в пределах сайта расщепления EGVDAE (SEQ ID NO: 13) фактора В сконструированной протеазой на основе химазы C22S/A226R.

[0049] На ФИГ. 10 представлена схема, изображающая общий способ измерения активации комплемента и высвобождения цитокинов из тканей на мышинной модели острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) при лечении сконструированной протеазой на основе химазы.

[0050] На ФИГ. 11А, ФИГ. 11В и ФИГ. 11С показаны индекс застоя в легких, потеря массы тела и соотношение нейтрофилов и лимфоцитов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF NLR) соответственно, измеренные на модели острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у мышей.

[0051] На ФИГ. 12А, ФИГ. 12В, ФИГ. 12С и ФИГ. 12D показаны результаты измерения цитокинов в BALF и ткани легких мышей после лечения с помощью сконструированной протеазы на основе химазы.

[0052] На ФИГ. 13 представлена схема, демонстрирующая общий способ измерения функции легких на модели острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у мышей, получавших сконструированную протеазу на основе химазы по настоящему изобретению.

[0053] На ФИГ. 14 представлены результаты плетизмографических измерений и значительная защита от застоя в легких при введении одной из сконструированных протеаз на основе химазы по настоящему изобретению.

[0054] На ФИГ. 15 представлена электрофореграмма ДСН-ПААГ (с восстановлением), демонстрирующая экспрессию, очистку и активацию сконструированной протеазы на основе химазы по настоящему изобретению.

[0055] На ФИГ. 16 представлена электрофореграмма ДСН-ПААГ, демонстрирующая экспрессию сконструированных протеаз на основе химазы в клетках НЕК293.

[0056] На ФИГ. 17 представлена электрофореграмма ДСН-ПААГ, демонстрирующая экспрессию сконструированных протеаз на основе химазы, слитых с HSA человека или Fc, в клетках НЕК293.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0057] В настоящем изобретении предложены композиции и способы, пригодные для модулирования сигнализации и регуляции системы комплемента. В частности, в настоящем документе предложены сконструированные протеазы, содержащие протеазные домены семейства химотрипсиноподобных S1A сериновых протеаз, и такие сконструированные протеазы по настоящему изобретению специфичны к фактору В и способны расщеплять его. Эти сконструированные протеазы содержат

модифицированные протеазные домены и получены с использованием способов и последовательностей, предложенных в настоящем документе.

[0058] Сконструированные протеазы по настоящему изобретению нацелены на фактор В для его расщепления и взаимозаменяемо именуется «деструкторами фактора В комплемента» или «деструкторами СFB». Применение этих сконструированных протеаз может (1) приводить к расщеплению фактора В на фрагменты, которые не являются ни Va, ни Vb, или может (2) приводить к расщеплению фактора В на Va и Vb, которые являются функционально неактивными. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией или механизмом, фрагменты Va и Vb, полученные в результате расщепления фактора В, в то время как фактор В не связан в комплекс с C3 или C3b, считаются функционально неактивными фрагментами и могут дополнительно снижать или ингибировать активацию комплемента, действовать путем ограничения роста активации комплемента и/или ограничения/уменьшения усиления работы путей комплемента. В любом из этих сценариев эти продукты расщепления могут иметь функцию, которая не является нативной функцией Va и Vb, или могут быть неактивными фрагментами. Используемый в настоящем документе термин «функционально неактивный фрагмент» фактора В относится к фрагменту фактора В, который представляет собой продукт расщепления, который может снижать активацию комплемента, может ограничивать увеличение активации комплемента и/или может ограничивать/уменьшать усиление работы путей комплемента.

[0059] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы нацелены на фактор В для его расщепления в сайте расщепления, не являющемся мишенью для фактора D. В других вариантах осуществления сконструированные протеазы нацелены на фактор В в сайте, являющемся мишенью для фактора D до того, как фактор В свяжется с C3b и образует комплекс с C3b, таким образом предотвращая образование проконвертазного комплекса.

[0060] В настоящем описании также предложены способы получения и применения таких сконструированных протеаз, например, при лечении заболевания или состояния, связанного с нарушением регуляции комплемента, например при лечении сверхактивного ответа комплемента.

Химотрипсиноподобные сериновые протеазы, используемые для модуляции системы комплемента путем нацеливания на фактор В

[0061] В настоящем документе предложены сконструированные протеазы, содержащие одну или более модификаций относительно встречающейся в природе химотрипсиноподобной сериновой протеазы. В настоящем документе «сконструированная» протеаза по настоящему изобретению представляет собой сериновую протеазу семейства S1A, которая не встречается в природе и содержит одну или более модификаций относительно дикого типа или встречающейся в природе сериновой протеазы семейства S1A. Используемый в настоящем документе термин «модификация» применительно к встречающейся в природе химотрипсиноподобной сериновой протеазе семейства S1A включает одно или более из: делеции одного или более аминокислотных остатков, делеции одного или более доменов, замены одного или более аминокислотных остатков, вставки одного или более аминокислотных остатков, вставки одного или более доменов и замены одного или более доменов.

[0062] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы по настоящему изобретению содержат не встречающийся в природе домен сериновой протеазы семейства S1A, причем домен содержит одну или более модификаций относительно дикого типа или встречающегося в природе домена сериновой протеазы семейства S1A. Используемый в настоящем документе термин «модификация» применительно к встречающемуся в природе домену химотрипсиноподобной сериновой протеазы семейства S1A включает одно или более из: делеции одного или более аминокислотных остатков, замены одного или более аминокислотных остатков и вставки одного или более аминокислотных остатков.

[0063] Сконструированные протеазы по настоящему изобретению содержат не встречающийся в природе домен сериновой протеазы семейства S1A. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы согласно настоящему раскрытию содержат не встречающийся в природе домен сериновой протеазы семейства S1A, а также содержат дополнительные последовательности и/или дополнительные домены. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы по настоящему изобретению состоят из не встречающегося в природе домена сериновой протеазы семейства S1A. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы по настоящему изобретению состоят по существу из не встречающегося в природе домена

сериновой протеазы семейства S1A и могут включать дополнительные последовательности, полезные для экспрессии, стабильности, улучшения фармакокинетики, подкожной доставки, нацеливания на ткань и т. п.

[0064] Следует отметить, что в настоящем документе термин «встречающаяся в природе химотрипсиноподобная сериновая протеаза» семейства S1A относится к такой протеазе, которая присутствует в природе, даже если она не является последовательностью дикого типа. Другими словами, встречающаяся в природе сериновая протеаза не является сконструированной. Встречающаяся в природе сериновая протеаза может иметь или не иметь сигнальную последовательность, и может иметь или не иметь активирующий пептид, и может относиться к любому биологическому виду.

[0065] Модифицированные протеазы, предложенные в настоящем документе, предназначены для расщепления фактора В. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, нацеливаются на фактор В в сайте, отличном от сайта расщепления фактором D. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, нацеливаются на фактор В в сайте расщепления фактором D. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, могут нацеливаться на фактор В для его расщепления, когда фактор В находится в комплексе с С3. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, могут нацеливаться на фактор В для его расщепления, когда фактор В находится в комплексе с С3b. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, могут нацеливаться на фактор В для его расщепления, когда фактор В находится отдельно в кровотоке.

[0066] В некоторых вариантах осуществления продукты расщепления, полученные в результате расщепления фактора В сконструированными протеазами, представленными в настоящем документе, могут быть функционально неактивными фрагментами, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления функционально неактивные фрагменты не обладают встречающейся в природе физиологической функцией. В некоторых вариантах осуществления функционально неактивные фрагменты могут выполнять функцию, но не обязательно ту же функцию, что и Va и/или Vb.

[0067] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, способны модулировать активность системы комплемента путем снижения количества образующихся фрагментов Va и Vb фактора В, тем самым смягчая/ингибируя активацию комплемента, ограничивая увеличение активации комплемента и/или ограничивая/снижая усиление работы путей комплемента.

[0068] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, пригодны для введения нуждающемуся в этом субъекту. Используемые в настоящем документе термины «пациент» или «субъект» используются взаимозаменяемо применительно к млекопитающим, и включают, без ограничений, людей и других приматов (например, шимпанзе, яванских макаков и других видов приматов и обезьян), сельскохозяйственных животных (например, коров, овец, свиней, коз и лошадей), одомашненных млекопитающих (например, собак и кошек) и лабораторных животных (например, кроликов, грызунов, таких как мыши, крысы и морские свинки). В показательных вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[0069] В таблице 1 представлена аминокислотная последовательность фактора В человека, являющаяся мишенью для сконструированных протеаз по настоящему изобретению.

[0070] В таблице 1 также представлены аминокислотные последовательности показательных химотрипсиноподобных сериновых протеаз и протеазных доменов семейства S1A, которые можно использовать в качестве каркасов, на основе которых генерируются сконструированные протеазы по настоящему изобретению, включая: MTSP-1, uPA, химазу и родственную калликреину пептидазу 5 (KLK5). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, основаны на MTSP-1 или на ее сериновом протеазном домене. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, основаны на uPA или на ее сериновом протеазном домене. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, основаны на KLK5 или на ее сериновом протеазном домене. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, не основаны на химазе или ее сериновом протеазном домене. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в

настоящем документе, не основаны на MTSP-1 или на ее сериновом протеазном домене. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, не основаны на uPA или на ее сериновом протеазном домене. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, не основаны на KLK5 или на ее сериновом протеазном домене. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, не основаны на химазе или ее сериновом протеазном домене.

[0071] Таблица 1 также включает аминокислотную последовательность зрелого полипептида химотрипсина в SEQ ID NO: 19. Следует отметить, что протеазный домен сериновой протеазы можно сопоставлять с протеазным доменом химотрипсина таким образом, чтобы аминокислотные остатки сопоставленной протеазы (например, MTSP-1, uPA, KLK5 или химазы) соответствовали аминокислотам химотрипсина, и им дается нумерация по химотрипсину. В настоящем документе это по существу обозначается как нумерация по химотрипсину, а нумерация и соответствующие позиции сопоставленных протеаз могут быть определены специалистом в данной области. Стандартная номенклатура, пригодная для нумерации по химотрипсину, также может быть определена специалистом в данной области техники, например обозначения, используемые для добавлений или делеций остатков. Остаток, присутствующий в сопоставленной протеазе (например, MTSP-1, uPA, KLK5 или химазе), и отсутствующий в химотрипсине, обозначен буквой нижнего регистра. Например, при использовании нумерации по химотрипсину для домена uPA-протеазы (таблица 2), модификация S37dP (нумерация по химотрипсину) транслируется в S184P в традиционной записи аминокислотной последовательности. Сигнальные, или лидерные, последовательности в таблице 1 обозначены подчеркиванием, а последовательности сайтов расщепления выделены жирным шрифтом. В некоторых случаях описание и формула изобретения содержат ссылку на традиционную нумерацию аминокислот и/или на нумерацию на основе химотрипсина, и это указано соответствующим образом.

[0072] Химаза из таблицы 1 представляет собой химазу тучных клеток, последовательность которой можно найти на веб-сайте <https://www.uniprot.org/uniprot/P23946>.

Таблица 1. Последовательности фактора В человека и сериновых протеаз дикого типа

Фактор В человека	<p>MGSNLSPQLCLMPFILGLLSGGVTTTPWSLARPQGSCSLEGVEI KGGSFRLLEQEQALEYVCPSPGFYPYPVQTRTRCRSTGWSSTLKT QDQKTVRKAECRAIHCPRPHDFENGEYWPRSPYYNVSDEISFH CYDGYTLRGSANRTCQVNGRWSGQTAICDNGAGYCSNPGPIG TRKVGSQYRLEDSVTYHCSRGLTLRGSQRRTCQEGGSWSGTEP SCQDSFMYDTPQEVAEAFSSLTETIEGVDAEDGHGPGEQQR KIVLDPSGSMNIYL VLDGSDSIGASNFTGAKKCLVNLIKVASIY GVKPRYGLVTYATYPKIWVKVSEADSSNADWVTKQLNEINYE DHKLKSGTNTKKALQAVYSMMSWPDDVPPEGWNRTRHVILM TDGLHNMGGDPITVIDEIRDLLYIGKDRKNPREDYLDVYVFGV GPLVNQVNINALASKKDNEQHVFKVKDMENLEDVFYQMIDES QSLSLCGMVWEHRKGTDYHKQPWQAKISVIRPSKGHESCMG AVVSEYFVLTAHCFTVDDKEHSIKVSVGGEKRDLEIEVVLFIH PNYNINGKKEAGIPFIFYDYVALIKLKNKLKYGQTIRPICLPCT EGTTRALRLPPTTTCQQQKEELLPAQDIKALFVSEEEKLTRKE VYIKNGDKKGSCERDAQYAPGYDKVKDISEVVTPrFLCTGGVS PYADPNTCRGDSGGPLIVHKRSRFIQVGVISWGVVDVCKNQKR QKQVPAHARDFHINLFQVLPWLKEKLQDEDLGFL (SEQ ID NO: 1)</p>
Химаза человека (сигнальная последовательность, протеазный домен)	<p><u>MRGSHHHHHHGSDYKDDDDKIIGGTECKPHSRPYMAYLEIVTS</u> NGPSKFCGGFLIRNFVLTAHCAGRSITVTLGAHNITEEEDTW QKLEVIKQFRHPKYNTSTLHHDIMLLKLKEKASLTLAVGTLFPF SQFNFPVPPGRMCRVAGWGRTGVLKPGSDTLQEVKLRLMDPQA CSHFRDFDHNLQLCVGNPRKTKSAFKGDSGGPLLCAGVAQGIV SYGRSDAKPPAVFTRISHYRPWINQILQAN (SEQ ID NO: 24)</p>
Протеазный домен химазы человека)	<p>IIGGTECKPHSRPYMAYLEIVTSNGPSKFCGGFLIRNFVLTAH CAGRSITVTLGAHNITEEEDTWQKLEVIKQFRHPKYNTSTLHHD IMLLKLKEKASLTLAVGTLFPFSQFNFPVPPGRMCRVAGWGRTG VLKPGSDTLQEVKLRLMDPQACSHFRDFDHNLQLCVGNPRKT KSAFKGDSGGPLLCAGVAQGIVSYGRSDAKPPAVFTRISHYRP WINQILQAN (SEQ ID NO: 6)</p>
MTSP-1 человека, полноразмерная	<p>MGSDRARKGGGGPKDFGAGLKYNRHEKVNGLEEGVEFLPVN NVKKVEKHGPRWVVLAAVLIGLLLVLGIGFLVWHLQYRDV RVQKVFNGYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLL YSGVPFLGPYHKESAVTAFSEGSVIAYYWSEFSIPQHLVEEAER VMAEERVVMLPPRARSLKSFVVTSVVAFPTDSKTQRTQDNSC SFGHLHARGVELMRFTTPGFDPSPYPAHARCQWALRGDADSVLS LTFRSFDLASCDEGSDLVTVYNLSPMEPHALVQLCGTYPPSY NLTFHSSQNVLLITLITNERRHPGFEATFFQLPRMSSCGGRLRK AQGTFNSPYYPGHYPPNIDCTWNIEVPNNQHVKVRFKFFYLLEP GVPAGTCKDYVEINGEKYCGERSQFVVTSSNSKITVRFHSDQS YTDGTGLAEYLSYDSSDPCPGQFTCRTGRCIRKELRCDGWADC TDHSDELNCSCDAGHQFTCKNKFKPLFWVCDVNDVCGDSD EQGCSCPAQTFRCNSGKCLSKSQQCNGKDDCGDGSDEASCPK VNVVTCTKHTYRCLNGLCLSKGNPECDGKEDCSDGSDEKDCD CGLRSFTRQARVVGGTDADEGEWPWQVSLHALGQGHICGASL</p>

	ISPNWLVSAAHCYIDDRGFYSDPTQWTAFLGLHDQSQRSAPGVQERRLKRIISHPPFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMVRPICLPDASHVFPAGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTTCENLLPQQITPRMMCVGFLSGGVSDSCQGDSGGPLSSVEADGRIFQAGVVSWDGCAQRNKPGVYTRLPLFRDWIKENTGV (SEQ ID NO: 18)
MTSP-1 человека (сигнальная последовательность, протеазный домен)	<u>MRGSHHHHHHGSDEKSDSGLRSFTRQARVVGGTDADEGEWPWQVSLHALGQGHICGASLISPNWLVSAAHCYIDDRGFYSDPTQWTAFLGLHDQSQRSAPGVQERRLKRIISHPPFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMVRPICLPDASHVFPAGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTTCENLLPQQITPRMMCVGFLSGGVSDSCQGDSGGPLSSVEADGRIFQAGVVSWDGCAQRNKPGVYTRLPLFRDWIKENTGV</u> (SEQ ID NO: 25)
Протеазный домен MTSP-1 человека	VVGGTDADEGEWPWQVSLHALGQGHICGASLISPNWLVSAAHCYIDDRGFYSDPTQWTAFLGLHDQSQRSAPGVQERRLKRIISHPPFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMVRPICLPDASHVFPAGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTTCENLLPQQITPRMMCVGFLSGGVSDSCQGDSGGPLSSVEADGRIFQAGVVSWDGCAQRNKPGVYTRLPLFRDWIKENTGV (SEQ ID NO: 7)
uPA человека, полноразмерная	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHC EIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYHAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCADGKKPSSPEELKFQCGQKTLRPRFKIIGGEFTTIENQPWFAAIYRRHRGGSVTYVCGGSLISPCWVISATHCFIDYPKKE DYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADTLAHHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDYLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGRGCALKDKDPGVYTRVSHFLPWIRSHSHTKEENGLAL (SEQ ID NO: 8)
uPA человека (сигнальная последовательность, протеазный домен)	<u>MYRMQLLSICIALSLALVTNSIIGGEFTTIENQPWFAAIYRRHRGGSVTYVCGGSLISPCWVISATHCFIDYPKKE DYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADTLAHHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDYLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGRGCALKDKDPGVYTRVSHFLPWIRSHSHTKEENGLAL</u> (SEQ ID NO: 26)
Протеазный домен uPA человека	IIGGEFTTIENQPWFAAIYRRHRGGSVTYVCGGSLISPCWVISATHCFIDYPKKE DYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADTLAHHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDYLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGRGCALKDKDPGVYTRVSHFLPWIRSHSHTKEENGLA (SEQ ID NO: 22)

Калликреин 5 человека (KLK5) (сигнальная последовательность (подчеркнута я), пропептид и протеазный домен)	<u>MATARPPWMWVLCALITALLLGVTEHVLANNDVSCDHPSTV</u> PSGSNQDLGAGAGEDARSDDSSSRINGSDCDMHTQPWQA ALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLS PVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNDLMLIKLNRIRPTKD VRPINVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFPKVLQCLNISVL SQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDESCOGDSGGPVVCNGS LQGLVSWGDYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS (SEQ ID NO: 27)
Калликреин 5 человека (KLK5) (пропептид и протеазный домен)	VTEHVLANNDVSCDHPSTVPSGSNQDLGAGAGEDARSDDSSSRINGSDCDMHTQPWQA ALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLS PVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNDLMLIKLNRIRPTKD VRPINVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFPKVLQCLNISVL SQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDESCOGDSGGPVVCNGS LQGLVSWGDYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS (SEQ ID NO: 28)
Протеазный домен калликреина 5 человека	IINGSDCDMHTQPWQA ALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLS PVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNDLMLIKLNRIRPTKD VRPINVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFPKVLQCLNISVL SQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDESCOGDSGGPVVCNGS LQGLVSWGDYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS (SEQ ID NO: 23)
Химотрипсин	MAFLWLLSCWALLGTTFGCGVPAIHPVLSGLSRIVNGEDAVPG SWPWQVSLQDKTGFHFCGGLISEDWVVTAHCGVRTSDVVV AGEFDQGSDEENIQVLKIAKVFNPKFSILTVNNDITLLKLATPA RFSQTVSAVCLPSADDDFPAGTLCATTGWGKTKYNANKTPDK LQQAALPLLSNAECKKSWGRRITDVMICAGASGVSSCMGDSG GPLVCQKDGAWTLVGIVSWGSDTCSTSSPGVYARVTKLIPWV QKILAAAN (SEQ ID NO: 19)

[0073] На ФИГ. 1А представлена принципиальная схема встречающегося в природе фактора В, показывающая последовательности различных сайтов расщепления, включая сайт, в котором фактор В расщепляется фактором D (сайт расщепления FD) на Ва и Вb. Ва состоит из трех доменов белка контроля комплемента (CCP) и линкера. Вb состоит из домена фактора фон Виллебранда типа А (VWA) и домена сериновой протеазы (SP). На ФИГ. 1В–1С показаны два изображения белковой структуры фактора В, демонстрирующие различные сайты расщепления.

[0074] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения предложены сконструированные протеазы, которые расщепляют фактор В, что может происходить в сайте расщепления, который не является мишенью для фактора D, т. е. не в сайте расщепления FD. В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены сконструированные протеазы, которые расщепляют фактор В в сайте расщепления, который является мишенью для фактора D. Как предусмотрено в настоящем документе, сайт расщепления FD представляет собой сайт, который имеет аминокислотную последовательность QQKR/KIV (SEQ ID NO: 9). В других вариантах осуществления в изобретении также предложены сконструированные протеазы, способные расщеплять фактор В в сайте расщепления, который является мишенью для фактора D (SEQ ID NO: 9), прежде чем фактор В образует комплекс с С3b и, без ограничений, накладываемых какой-либо теорией или механизмом, ожидается, что такое расщепление может приводить к образованию фрагментов, которые не увеличивают активность комплемента.

[0075] Различные показательные сайты расщепления фактора В, которые являются мишенью для сконструированных протеаз по настоящему изобретению, указаны на принципиальной схеме ФИГ. 1, и они включают, без ограничений: QQKR/KIV (SEQ ID NO: 9), WEHR/KGT (SEQ ID NO: 10), KNQKR/QKQ (SEQ ID NO: 11), DVFY/QMI (SEQ ID NO: 12), EGVD/AE (SEQ ID NO: 13), DHKL/KSG (SEQ ID NO: 14), TPW/SLA (SEQ ID NO: 15), KVSEAD (SEQ ID NO: 20), IRPSKG (SEQ ID NO: 4), GGEKRD (SEQ ID NO: 5), GKKEAG (SEQ ID NO: 3) и DHKL/KSG (SEQ ID NO: 21). В некоторых показательных сайтах расщепления для обозначения сайта расщепления применяется косая черта. Однако расщепление этими сайтами не ограничивается.

[0076] На ФИГ. 1D показан окрашенный кумасси гель, демонстрирующий примеры расщепления фактора В с помощью сконструированных протеаз на основе химазы. Использовали две партии каждого набора сконструированной протеазы, и каждая партия показала способность сконструированных протеаз расщеплять фактор В. На ФИГ. 1E показан график, иллюстрирующий примеры расщепления фактора В двумя сконструированными протеазами на основе химазы с низким значением EC₅₀. Эти результаты более подробно описаны ниже в примере 1.

[0077] Аминокислотная последовательность фактора В дикого типа человека представлена в таблице 1 ниже и показана в SEQ ID NO: 1. Как показано в таблице 1, в

некоторых вариантах осуществления сайт, содержащий аминокислотную последовательность KVSEAD (SEQ ID NO: 2), может быть мишенью как сайт расщепления сконструированной протеазы по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза, которая может нацеливаться на последовательность SEQ ID NO: 2 для ее расщепления, основана на химазе. В некоторых вариантах сайт, который содержит аминокислотную последовательность GKKEAG (SEQ ID NO: 3), может быть мишенью как сайт расщепления сконструированной протеазы по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза, которая может нацеливаться на последовательность SEQ ID NO: 3 для ее расщепления основана на MTSP-1 или uPA. В некоторых вариантах осуществления сайт, содержащий аминокислотную последовательность IRPSKG (SEQ ID NO: 4) и/или GGEKRD (SEQ ID NO: 5) может быть мишенью как сайт расщепления сконструированной протеазы по настоящему изобретению, и в некоторых вариантах осуществления такая сконструированная протеаза построена на каркасе на основе MTSP-1.

[0078] На ФИГ. 2А–2В представлены принципиальные схемы прохимазы и зрелой химазы соответственно. Прохимаза содержит домен химазы и активирующий пептид, и зрелая химаза образуется, когда сигнальный пептид и активирующий пептид отщепляются в сайте расщепления, указанном на ФИГ. 2А. Зрелая химаза, как показано на ФИГ. 2В, может использоваться в качестве каркаса для создания сконструированных протеаз по настоящему изобретению. Аминокислотная последовательность протеазного домена зрелой химазы дикого типа представлена в таблице 1 и показана в SEQ ID NO: 6.

[0079] На ФИГ. 3А–3В представлены принципиальные схемы внеклеточной части сериновой протеазы 1 мембранного типа (MTSP-1) и серинового протеазного домена MTSP-1 соответственно. Сериновый протеазный домен MTSP-1, показанный на ФИГ. 3В, может использоваться в качестве каркаса для создания сконструированных протеаз по настоящему изобретению. Аминокислотная последовательность протеазного домена встречающейся в природе MTSP-1 представлена в SEQ ID NO: [7] в таблице 1.

[0080] На ФИГ. 3С–3D представлены принципиальные схемы активатора плазминогена урокиназного типа (uPA или u-PA). На ФИГ. 3С представлена принципиальная схема зимогена uPA, а на ФИГ. 3D представлена принципиальная схема зрелого двухцепочечного uPA. Зрелый полипептид uPA генерируется протеолитическим расщеплением. Домен сериновой протеазы uPA, показанный на ФИГ. 3D, можно

использовать в качестве каркаса для получения сконструированных протеаз по настоящему изобретению. В uPA дикого типа протеазный домен соединен с «А»-цепью дисульфидным мостиком (как показано на ФИГ. 3D). В сконструированных протеазах на основе uPA, предложенных в настоящем документе, содержащих сериновый протеазный домен uPA, возможна замена С на S (С122S согласно нумерации по химотрипсину, SEQ ID NO: 22) для уменьшения агрегации.

[0081] Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предложены сконструированные протеазы, причем сериновые протеазы специфичны для фактора В в сайте, который не является мишенью для фактора D. В других вариантах осуществления настоящего изобретения предложены сконструированные протеазы, причем сериновые протеазы специфичны для фактора В в сайте, который является мишенью для фактора D. В некоторых вариантах осуществления расщепление фактора В сконструированными протеазами, предложенными в настоящем документе, в сайте, являющемся мишенью для фактора D, или в сайте, не являющемся мишенью для фактора D, приводит к снижению активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления расщепление в сайте генерирует по меньшей мере два функционально неактивных фрагмента. В некоторых вариантах осуществления расщепление фактора В сконструированными протеазами, предложенными в настоящем документе, в сайте, являющемся мишенью для фактора D, или в сайте, не являющемся мишенью для фактора D, приводит к образованию одного или более функционально неактивных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления расщепление фактора В сконструированными протеазами, предложенными в настоящем документе, в сайте, являющемся мишенью для фактора D, или в сайте, не являющемся мишенью для фактора D, приводит к снижению функции фактора В. В некоторых вариантах осуществления расщепление фактора В сконструированными протеазами, предложенными в настоящем документе, в сайте, являющемся мишенью для фактора D, или в сайте, не являющемся мишенью для фактора D, приводит к снижению количества продуктов расщепления фактора В Va и Vb.

[0082] В некоторых вариантах осуществления фактор В, являющийся мишенью сконструированных протеаз по настоящему изобретению, может относиться к любому биологическому виду. В некоторых вариантах осуществления фактор В представляет собой фактор В приматов. В некоторых вариантах осуществления фактор В представляет

собой человеческий фактор В. В некоторых вариантах осуществления фактор В человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления фактор В примата представляет собой фактор В примата, не являющегося человеком. В некоторых вариантах осуществления примат, не являющийся человеком, представляет собой яванского макака. В некоторых вариантах осуществления фактор В представляет собой фактор В грызуна, например фактор В крысы или мыши.

[0083] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, специфичны для фактора В в сайте, который не является мишенью для фактора D, причем сайт, являющийся мишенью для фактора D, содержит аминокислотную последовательность QQKR/KIV (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления сайт фактора В, который не является мишенью для фактора D, содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из WEHR/KGT (SEQ ID NO: 10), KNQKR/QKQ (SEQ ID NO: 11), DVFY/QMI (SEQ ID NO: 12), EGVD/AE (SEQ ID NO: 13), DHKL/KSG (SEQ ID NO: 14), TPW/SLA (SEQ ID NO: 15), KVSEAD (SEQ ID NO: 20), IRPSKG (SEQ ID NO: 4), GGEKRD (SEQ ID NO: 5), GKKEAG (SEQ ID NO: 3), DHKL/KSG (SEQ ID NO: 21) и WEHR/KGT (SEQ ID NO: 10).

[0084] В других вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, специфичны для фактора В в сайте, который является мишенью для фактора D, причем сайт, являющийся мишенью для фактора D, содержит аминокислотную последовательность QQKR/KIV (SEQ ID NO: 9).

[0085] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, основаны на химотрипсиноподобной сериновой протеазе семейства S1A, включая, без ограничений, сериновую протеазу 1 мембранного типа (MTSP-1), активатор плазминогена урокиназного типа (uPA), KLK5 и химазу. Сконструированные протеазы по настоящему изобретению содержат модифицированные протеазные домены на основе каркаса сериновой протеазы, такой как MTSP-1, uPA, KLK5 или химаза.

Сконструированные протеазы на основе uPA

[0086] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы основаны на uPA, например, основаны на сериновом протеазном домене uPA. В некоторых вариантах осуществления такие сконструированные протеазы специфичны к фактору В в сайте, который не является мишенью для фактора D, например, сайт расщепления содержит последовательность, выбранную из: WEHR/KGT (SEQ ID NO: 10) и KNQKR/QKQ (SEQ ID NO: 11).

[0087] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы на основе uPA содержат одну или более модификаций относительно uPA, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

[0088] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы на основе uPA содержат одну или более модификаций относительно протеазного домена uPA, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

[0089] Модификации uPA или протеазного домена uPA могут обозначаться номерами остатков домена uPA протеазы согласно нумерации по химитрипсину. В таблице 2 представлены соответствующие номера по химотрипсину в протеазном домене uPA с SEQ ID NO: 22 (эквивалентно положениям аминокислот 159–411 uPA согласно SEQ ID NO: 8).

[0090] В таблице 2 представлены четыре строки для каждой аминокислоты. В первой строке указана стандартная нумерация аминокислотных последовательностей по SEQ ID NO: 22, протеазный домен uPA. Во второй строке указана стандартная аминокислотная последовательность остатков 159–411 SEQ ID NO: 8, протеазный домен uPA. В третьей строке представлены однобуквенные сокращенные названия аминокислот. В четвертой строке представлена соответствующая нумерация по химотрипсину под каждым однобуквенным сокращенным названием аминокислоты. Остаток, который присутствует в протеазном домене и отсутствует химотрипсине, представлен буквой в конце нотации. Например, остатки в химотрипсине, которые являются частью петли с аминокислотой 60 согласно нумерации по химотрипсину, которые вставлены в сконструированную uPA, называются D60a, Y60b, P60c.

[0091] В таблице 2 представлена схема нумерации по химотрипсину и соответствующая стандартная схема нумерации для протеазного домена uPA. В последующих таблицах и в тексте описания модификации протеазного домена uPA показаны согласно нумерации по химотрипсину традиционной нумерации аминокислот. Если конкретная модификация представлена только согласно нумерации по химотрипсину, специалисту в данной области будет понятно, как обратиться к таблице 2 и выполнить необходимые преобразования для понимания модификации в стандартной нумерации аминокислот, и наоборот.

Таблица 2. Нумерация домена uPA протеазы по химотрипсину

Станд. нумерация (SEQ ID 22)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Станд. нумерация (SEQ ID 8)	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173
Аминокислота	I	I	G	G	E	F	T	T	I	E	N	Q	P	W	F
Нумерация по химотр.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Станд. нумерация (SEQ ID 22)	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Станд. нумерация (SEQ ID 8)	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188
Аминокислота	A	A	I	Y	R	R	H	R	G	G	S	V	T	Y	V
Нумерация по химотр.	31	32	33	34	35	36	37	37 A	37 b	37 c	37 d	38	39	40	41
Станд. нумерац	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45

ия (SEQ ID 22)															
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	18 9	19 0	19 1	19 2	19 3	19 4	19 5	19 6	19 7	19 8	19 9	20 0	20 1	20 2	20 3
Амино- кислота	C	G	G	S	L	I	S	P	C	W	V	I	S	A	T
Нумерац ия по химотр.	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
Станд. нумерац ия (SEQ ID 22)	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	20 4	20 5	20 6	20 7	20 8	20 9	21 0	21 1	21 2	21 3	21 4	21 5	21 6	21 7	21 8
Аминоки слота	H	C	F	I	D	Y	P	K	K	E	D	Y	I	V	Y
Нумерац ия по химотр.	57	58	59	60	60a	60b	60c	61	62	62a	63	64	65	66	67
Станд. нумерац ия (SEQ ID 22)	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233
Амино- кислота	L	G	R	S	R	L	N	S	N	T	Q	G	E	M	K
Нумерац ия по химотр.	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
Станд. нумерац ия	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90

(SEQ ID 22)															
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248
Амино-кислота	F	E	V	E	N	L	I	L	H	K	D	Y	S	A	D
Нумерац ия по химотр.	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97
Станд. нумерац ия (SEQ ID 22)	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263
Амино-кислота	T	L	A	H	H	N	D	I	A	L	L	K	I	R	S
Нумерац ия по химотр.	97a	97b	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
Станд. нумерац ия (SEQ ID 22)	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278
Аминоки слота	K	E	G	R	C	A	Q	P	S	R	T	I	Q	T	I
Нумерац ия по химотр.	110 a	110 b	110 c	110 d	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121
Станд. нумерац ия	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135

(SEQ ID 22)															
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293
Амино-кислота	C	L	P	S	M	Y	N	D	P	Q	F	G	T	S	C
Нумерац ия по химотр.	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136
Станд. нумерац ия (SEQ ID 22)	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308
Амино-кислота	E	I	T	G	F	G	K	E	N	S	T	D	Y	L	Y
Нумерац ия по химотр.	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151
Станд. нумерац ия (SEQ ID 22)	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323
Амино-кислота	P	E	Q	L	K	M	T	V	V	K	L	I	S	H	R
Нумерац ия по химотр.	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166
Станд. нумерац ия	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180

(SEQ ID 22)															
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338
Амино-кислота	E	C	Q	Q	P	H	Y	Y	G	S	E	V	T	T	K
Нумерац ия по химотр.	167	168	169	170	170 _a	170 _b	171	172	173	174	175	176	177	178	179
Станд. нумерац ия (SEQ ID 22)	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353
Амино-кислота	M	L	C	A	A	D	P	Q	W	K	T	D	S	C	Q
Нумерац ия по химотр.	180	181	182	183	184	185	185 _a	185 _b	186	187	188	189	190	191	192
Станд. нумерац ия (SEQ ID 22)	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368
Амино-кислота	G	D	S	G	G	P	L	V	C	S	L	Q	G	R	M
Нумерац ия по химотр.	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207
Станд. нумерац ия	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225

(SEQ ID 22)															
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383
Амино-кислота	T	L	T	G	I	V	S	W	G	R	G	C	A	L	K
Нумерац ия по химотр.	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	220	221	222	223
Станд. нумерац ия (SEQ ID 22)	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398
Амино-кислота	D	K	P	G	V	Y	T	R	V	S	H	F	L	P	W
Нумерац ия по химотр.	223 а	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237
Станд. нумерац ия (SEQ ID 22)	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253		
Станд. нумерац ия (SEQ ID 8)	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411		
Амино-кислота	I	R	S	H	T	K	E	E	N	G	L	A	L		
Нумерац ия по химотр.	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250		

[0092] Сконструированные протеазы на основе uPA по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну модификацию в домене uPA сериновой протеазы. Как

отмечалось выше, модификации могут представлять собой любое одно или более из: делеции одного или более аминокислотных остатков, делеции одного или более доменов, замены одного или более аминокислотных остатков, вставки одного или более аминокислотных остатков, вставки одного или более доменов и замены одного или более доменов. В таблице 3А представлены показательные модификации домена uPA сериновой протеазы. В качестве примера в таблице 3А представлены три столбца — в первом столбце указана модификация с использованием нумерации по химотрипсину; во втором столбце представлена стандартная нумерация аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO: 8; в третьем столбце представлена нумерация аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO: 22.

[0093] Сконструированная протеаза может быть получена путем применения любой одной или более показательных модификаций, представленных в таблице 3А.

Соответственно, сконструированная протеаза на основе uPA по настоящему изобретению может содержать любую одну или более модификаций, представленных в таблице 3А.

[0094] В некоторых вариантах осуществления модификация находится в любом одном или более положениях, соответствующих положениям G18, R36, S37, V38, Y40, D60, A96, L97, A98, H99, C122, Y151, V159, A184, Q192, R217, K224 согласно нумерации по химотрипсину. В качестве примера модификация G18E представляет собой замену E в положении, соответствующем положению 18 домена uPA сериновой протеазы согласно нумерации по химотрипсину. В качестве примера модификация D97delinsEG обозначает делецию D в остатке 97 и вставку EG на ее месте согласно нумерации по химотрипсину. В качестве примера модификация L97b_H99del обозначает делецию остатков от L97b до H99 согласно нумерации по химотрипсину.

Таблица 3А. Показательные модификации серинового протеазного домена uPA

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 8)	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 22)
G18E	G161E	G3E
R36H	R179H	R21H
R36S	R179S	R21S
S37dP	S184P	S26P
V38D	V185D	V27D

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 8)	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 22)
Y40H	Y187H	Y29H
Y40N	Y187N	Y29N
D60aR	D208R	D50R
D60aY	D208Y	D50Y
D60aA	D208A	D50A
D60aK	D208K	D50K
D60aH	D208H	D50H
L73R	L224R	L66R
A96del	A247del	A89del
A96_H99del	A247_H252del	A89_H94del
A96_H99delinsPGVE	A247_H252delinsPGVE	A89_H94delinsPGVE
A96D	A247D	A89D
A96E	A247E	A89E
A96N	A247N	A89N
A96G	A247G	A89G
L97bM	L250M	L92M
L97bH	L250H	L92H
L97bY	L250Y	L92Y
L97bI	L250I	L92I
T97a_L97bdel	T249_L250del	T91_L92del
T97a_H99del	T249_H252del	T91_H94del
D97A	D248A	D90A
D97E	D248E	D90E
D97G	D248G	D90G
D97L	D248L	D90L
D97R	D248R	D90R
D97T	D248T	D90T
D97W	D248W	D90W
L97bV	L250V	L92V
L97b_H99del	L250_H252del	L92_H94del
L97bV	L250V	L92V

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 8)	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 22)
L97bG	L250G	L92G
D97delinsEG	D249delinsEG	D90delinsEG
T97aS	T249S	T91S
A98_H99del	A251_H252del	A93_H94del
A98G	A251G	A93G
A98N	A251N	A93N
A98T	A251T	A93T
H99A	H252A	H94A
H99E	H252E	H94E
H99K	H252K	H94K
H99L	H252L	H94L
H99M	H252M	H94M
H99N	H252N	H94N
H99P	H252P	H94P
H99Q	H252Q	H94Q
H99R	H252R	H94R
H99S	H252S	H94S
H99T	H252T	H94T
H99V	H252V	H94V
H99W	H252W	H94W
H99Y	H252Y	H94Y
C122S	C279S	C121S
Y151N	Y308	Y150N
V159A	V316A	V158A
Y172L	Y331L	Y173L
A184T	A343T	A185T
Q192A	Q353A	Q195A
Q192C	Q353C	Q195C
Q192D	Q353D	Q195D
Q192E	Q353E	Q195E
Q192F	Q353F	Q195F

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 8)	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 22)
Q192G	Q353G	Q195G
Q192H	Q353H	Q195H
Q192I	Q353I	Q195I
Q192K	Q353K	Q195K
Q192L	Q353L	Q195L
Q192M	Q353M	Q195M
Q192N	Q353N	Q195N
Q192P	Q353P	Q195P
Q192R	Q353R	Q195R
Q192S	Q353S	Q195S
Q192T	Q353T	Q195T
Q192W	Q353W	Q195W
Q192V	Q353V	Q195V
Q192Y	Q353Y	Q195Y
R217C	R378C	R220C
R217D	R378D	R220D
R217H	R378H	R220H
R217L	R378L	R220L
R217V	R378V	R220V
R217Y	R378Y	R220Y
K224N	K385N	K227N
K224V	K385V	K227V
K224Y	K385Y	K227Y
K224T	K385T	K227T
K224R	K385R	K227R
K224A	K385A	K227A
A98_H99delinsLK	A251_H252delinsLK	A93_H94delinsLK
A98_H99delinsRS	A251_H252delinsRS	A93_H94delinsRS
H99delinsSPG	H252delinsSPG	H94delinsSPG

[0095] В таблице 3В представлены показательные модификации (называемые в настоящем документе мутационными строками) по настоящему изобретению. Соответственно, в настоящем документе предложены сконструированные протеазы на основе uPA, содержащие одну или более модификаций, представленных в таблице 3А. Такие показательные сконструированные протеазы могут быть способны расщеплять фактор В или демонстрировать другую активность по расщеплению. Во втором столбце представлены показательные модификации с использованием стандартной нумерации относительно SEQ ID NO: 22.

Таблица 3В. Показательные сконструированные протеазы на основе uPA

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 22)
C122S	C121S
H99L/C122S	H94L/C121S
H99P/C122S	H94P/C121S
G18E/R36S/V38D/C122S/V159A	G3E/R21S/V27D/C121S/V158A
H99D/C122S	H94D/C121S
H99N/C122S	H94N/C121S
H99C/C122S	H94C/C121S
C122S/R217V	C121S/R220V
R36H/S37dP/V38D/C122S/A184T	R21H/S26P/V27D/C121S/A185T
V38D/A96E/D97G/C122S/Y172L/A98G/H99M/T97a_L97bdel	V27D/A89E/D90G/C121S/Y173L/A93G/H94M/T91_L92del
V38D/C122S/T97a_L97bdel	V27D/C121S/T91_L92del
V38D/A96G/D97E/A98G/H99V/C122S/T97a_L97bdel	V27D/A89G/D90E/A93G/H94V/C121S/T91_L92del
C122S/V38D/A96N/D97A/A98G/H99V/T97a_L97bdel	C121S/V27D/A89N/D90A/A93G/H94V/T91_L92del
V38D/C122S/D97L/A98G/H99V/T97a_L97bdel	V27D/C121S/D90L/A93G/H94V/T91_L92del

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 22)
V38D/C122S/A96E/D97R/A98G/H99V/T9 7a_L97b del	V27D/C121S/A89E/D90R/A93G/H94V/T9 1_L92 del
V38D/C122S/A96E/D97H/A98G/H99L/T9 7a_L97b del	V27D/C121S/A89E/D90H/A93G/H94L/T9 1_L92 del
V38D/A96E/D97E/C122S/A98G/H99A/T9 7a_L97b del	V27D/A89E/D90E/C121S/A93G/H94A/T9 1_L92 del
V38D/C122S/A96D/D97G/A98G/H99A/T9 7a_L97b del	V27D/C121S/A89D/D90G/A93F/H94A/T9 1_L92 del
V38D/D97A/C122S/A98G/H99L/T97a_L97 b del	V27D/D90A/C121S/A93G/H94L/T91_L92 del
V38D/C122S/A96D/D97W/A98N/H99L/T9 7a_L97b del	V27D/C121S/A89D/D90W/A93N/H94L/T9 1_L92 del
V38D/C122S/A96D/D97T/A98G/H99M/T9 7a_L97b del	V27D/C121S/A89G/H94M/T91_L92 del
V38D/D97E/L97bV/A98G/H99V/C122S/A 96_H99 del	V27D/D90E/L92V/A93G/H94V/C121S/A8 9_H94 del
V38D/A96G/D97A/H99E/C122S/L97b_H9 9 del	V27D/A89G/D90A/H94E/C121S/L92_H94 del
V38D/C122S/A96_H99 del insPGVE	V27D/C121S/A89_H94 del insPGVE
V38D/C122S/L97b_H99 del /D97 del insEG	V27D/C121S/L92_H94 del /D90 del insEG
V38D/T97aS/L97bV/A98T/H99E/C122S/A 96_H99 del	V27D/T91S/L92V/A93T/H94E/C121S/A89 _H94 del
V38D/C122S/A96 del /A98_H99 del / null del insLK	V27D/C121S/A89 del /A93_H94 del / null del insLK
V38D/A96G/D97E/A98G/H99E/C122S/T9 7a_H99 del	V27D/A89G/D90E/A93G/H94E/C121S/T9 1_H94 del
V38D/C122S/A96 del /A98_H99 del / null del insRS	V27D/C121S/A89 del /A93_H94 del / null del insRS
V38D/D97E/C122S/-null_H99 del insSPG	V27D/D90E/C121S/-null_H94 del insSPG
Y40H/C122S	Y29H/C121S
V38D/A98G/H99A/C122S/T97a_L97b del	V27D/A93G/H94A/C121S/T91_L92 del

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 22)
V38D/A98G/H99A/C122S/L97b del	V27D/A93G/H94A/C121S/L92 del
V38D/A98G/H99L/C122S/T97a_L97b del	V27D/A93G/H94L/C121S/T91_L92 del

[0096] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе uPA по настоящему изобретению содержит последовательность, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 8.

[0097] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе uPA по настоящему изобретению содержит последовательность, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 22.

[0098] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе uPA содержит протеазный домен, который содержит последовательность, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 22.

Сконструированные протеазы на основе MTSP-1

[0099] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы основаны на MTSP-1, например на основе модифицированного серинового протеазного домена MTSP-1. В некоторых вариантах осуществления такие сконструированные протеазы специфичны к фактору В в сайте, который не является мишенью для фактора D, причем сайт расщепления содержит последовательность, выбранную из: WEHR/KGT (SEQ ID NO: 10) и KNQKR/QKQ (SEQ ID NO: 11).

[0100] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы MTSP-1 содержат одну или более модификаций относительно MTSP-1, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

[0101] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы на основе MTSP-1 содержат одну или более модификаций относительно протеазного домена MTSP-1, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

[0102] Модификации MTSP-1 или домена MTSP-1 протеазы могут быть обозначены номерами остатков протеазного домена MTSP-1 согласно нумерации по химотрипсину. В таблице 4 представлены соответствующие номера по химотрипсину в протеазном домене MTSP-1 с SEQ ID NO: 7 (эквивалентно положениям аминокислот 615–855 MTSP-1 согласно SEQ ID NO: 18).

[0103] В таблице 4 представлены четыре строки для каждой аминокислоты. В первой строке указана стандартная нумерация аминокислотных последовательностей по SEQ ID NO: 7, протеазный домен MTSP-1. Во второй строке указана стандартная аминокислотная последовательность остатков 615–855 SEQ ID NO: 18, протеазный домен MTSP-1. В третьей строке представлены однобуквенные сокращенные названия аминокислот. В четвертой строке представлена соответствующая нумерация по химотрипсину под каждым однобуквенным сокращенным названием аминокислоты. Остаток, который присутствует в протеазном домене и отсутствует химотрипсине, представлен буквой в конце нотации. Например, остатки в химотрипсине, являющиеся частью петли с аминокислотой 60 согласно нумерации по химотрипсину, которые вставлены в сконструированный домен MTSP-1, называются D60a и R60c.

[0104] В таблице 4 представлена схема нумерации по химотрипсину и соответствующая стандартная схема нумерации для домена MTSP-1 протеазы. В последующих таблицах и в тексте описания модификации домена MTSP-1 протеазы показаны согласно нумерации по химотрипсину или с помощью традиционной нумерации аминокислот. Если конкретная модификация представлена только согласно нумерации по химотрипсину, специалисту в данной области будет понятно, как обратиться к таблице 4 и выполнить необходимые преобразования для понимания модификации в стандартной нумерации аминокислот, и наоборот.

Таблица 4. Нумерация протеазного домена MTSP-1 по химотрипсину

Станд. нумерация (SEQ ID 7)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Станд. нумерация (SEQ ID 18)	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629
Аминокислота	V	V	G	G	T	D	A	D	E	G	E	W	P	W	Q
Нумерация по химотр.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Станд. нумерация (SEQ ID 7)	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Станд. нумерация (SEQ ID 18)	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644
Аминокислота	V	S	L	H	A	L	G	Q	G	H	I	C	G	A	S
Нумерация по химотр.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Станд. нумерация (SEQ ID 7)	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Станд. нумерация (SEQ ID 18)	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659

Аминокислота	L	I	S	P	N	W	L	V	S	A	A	H	C	Y	I	
Нумерация по химотр.	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
Станд. нумерация (SEQ ID 7)	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
Станд. нумерация (SEQ ID 18)	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	
Аминокислота	D	D	R	G	F	R	Y	S	D	P	T	Q	W	T	A	
Нумерация по химотр.	60a	60b	60c	60d	60e	60f	60g	60h	60i	61	62	63	64	65	66	
Станд. нумерация (SEQ ID 7)	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	
Станд. нумерация (SEQ ID 18)	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	
Аминокислота	F	L	G	L	H	D	Q	S	Q	R	S	A	P	G	V	
Нумерация по химотр.	67	68	69	70	71	72	73	74	74a	75	76	77	78	79	80	
Станд. нумерация (SEQ ID 7)	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	
Станд. нумерация (SEQ ID 18)	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	
Аминокислота	Q	E	R	R	L	K	R	I	I	S	H	P	F	F	N	
Нумерация по химотр.	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	
Станд. нумерация (SEQ ID 7)	91	92			94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105

Станд. нумерация (SEQ ID 7)	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
Станд. нумерация (SEQ ID 18)	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777
Аминокислота	L	Q	K	G	E	I	R	V	I	N	Q	T	T	C	E
Нумерация по химотр.	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169
Станд. нумерация (SEQ ID 7)	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
Станд. нумерация (SEQ ID 18)	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792
Аминокислота	N	L	L	P	Q	Q	I	T	P	R	M	M	C	V	G
Нумерация по химотр.	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184
Станд. нумерация (SEQ ID 7)	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
Станд. нумерация (SEQ ID 18)	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807
Аминокислота	F	L	S	G	G	V	D	S	C	Q	G	D	S	G	G
Нумерация по химотр.	184a	185	186	186a	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
Станд. нумерация (SEQ ID 7)	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
Станд. нумерация (SEQ ID 18)	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822
Аминокислота	P	L	S	S	V	E	A	D	G	R	I	F	Q	A	G

Нумерация по химотр.	198	199	200	201	202	203	204	204a	205	206	207	208	209	210	211
Станд. нумерация (SEQ ID 7)	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
Станд. нумерация (SEQ ID 18)	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837
Аминокислота	V	V	S	W	G	D	G	C	A	Q	R	N	K	P	G
Нумерация по химотр.	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226
Станд. нумерация (SEQ ID 7)	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
Станд. нумерация (SEQ ID 18)	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852
Аминокислота	V	Y	T	R	L	P	L	F	R	D	W	I	K	E	N
Нумерация по химотр.	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
Станд. нумерация (SEQ ID 7)	241	242	243												
Станд. нумерация (SEQ ID 18)	853	854	855												
Аминокислота	T	G	V												
Нумерация по химотр.	242	243	244												

[0105] Сконструированные протеазы на основе MTSP-1 согласно настоящему раскрытию содержат по меньшей мере одну модификацию в сериновом протеазном домене MTSP-1. Как отмечалось выше, модификации могут представлять собой любое

одно или более из: делеции одного или более аминокислотных остатков, делеции одного или более доменов, замены одного или более аминокислотных остатков, вставки одного или более аминокислотных остатков, вставки одного или более доменов и замены одного или более доменов. В таблице 5А представлены показательные модификации серинового протеазного домена MTSP-1. В качестве примера в таблице 5А представлены три столбца — в первом столбце указана модификация с использованием нумерации по химотрипсину; во втором столбце представлена стандартная нумерация аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO: 18; в третьем столбце представлена нумерация аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO: 7.

[0106] Модификации MTSP-1 или домена MTSP-1 протеазы могут быть обозначены номерами остатков домена MTSP-1 протеазы согласно нумерации по химотрипсину. В таблице 4 представлены соответствующие номера по химотрипсину в протеазном домене MTSP-1 с SEQ ID NO: 7 (эквивалентно положениям аминокислот 615–855 MTSP-1 согласно SEQ ID NO: 18).

[0107] Сконструированная протеаза может быть получена путем применения любой одной или более показательных модификаций, представленных в таблице 5А. Соответственно, сконструированная протеаза на основе MTSP-1 по настоящему изобретению может содержать любую одну или более модификаций, представленных в таблице 5А.

[0108] В некоторых вариантах осуществления модификация находится в любом одном или более положениях, соответствующих положениям D23, I41, L70, A77, F94, D96, F97, T98, F99, K110, C122, D125, Y146, Q175, V183, Q192, A204, D217 и K224 согласно нумерации по химотрипсину. В качестве примера модификация F99S в MTSP-1 представляет собой модификацию в виде замены в положении, соответствующем положению 99 домена MTSP-1 сериновой протеазы согласно нумерации по химотрипсину.

Таблица 5А. Показательные модификации серинового протеазного домена MTSP-1

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 18)	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 7)
D23Y	D622Y	D8Y
I41A	I640A	I26A

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 18)	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 7)
I41F	I640F	I26F
I41G	I640G	I26G
I41K	I640K	I26K
I41N	I640N	I26N
I41Q	I640Q	I26Q
I41R	I640R	I26R
I41S	I640S	I26S
L70Q	L678Q	L64
A77T	A686T	A72T
F94Y	F703Y	F89Y
D96A	D705A	D91A
D96P	D705P	D9P1
D96S	D705S	D91S
D96T	D705T	D91T
D96insD	D705insD	D91insD
F97A	F706A	F92A
F97D	F706D	F92D
F97E	F706E	F92E
F97G	F706G	F92G
F97K	F706K	F92K
F97L	F706L	F92L
F97M	F706M	F92M
F97R	F706R	F92R
F97S	F706S	F92S
F97T	F706T	F92T
ins 97aA	ins 706aA	ins 93A
ins 97aS	ins 706aS	ins 93S
ins 97aC	ins 706aC	ins 93C
ins 97bG	ins 706bG	ins 93aG
ins 97bL	ins 706bL	ins 93aL
ins 97bN	ins 706bN	ins 93aN

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 18)	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 7)
ins 97aV	ins 706aV	ins 93V
ins 97aY	ins 706aY	ins 93Y
ins 97bS	ins 706bS	ins 93aS
ins 97bT	ins 706bT	ins 93aT
T98insA	T707insA	T94insA
T98insAA	T707insAA	T94insAA
T98A	T707A	T94A
T98G	T707G	T94G
T98P	T707P	T94P
T98S	T707S	T94S
T98V	T707V	T94V
F99H	F708H	F95H
F99I	F708I	F95I
F99L	F708L	F95L
F99M	F708M	F95M
F99N	F708N	F95N
F99P	F708P	F95P
F99S	F708S	F95S
F99V	F708V	F95V
F99Y	F708Y	F95Y
K110I	K719I	K106I
C122S	C731S	C118S
D125G	D734G	D121G
Y146D	Y755D	Y142D
Y146E	Y755E	Y142E
R161G	R769G	R157G
L172M	L780M	L168M
Q175H	Q783H	Q171H
Q175L	Q783L	Q171L
Q175N	Q783N	Q171N
Q175P	Q783P	Q171P

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 18)	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 7)
Q175R	Q783R	Q171R
Q175S	Q783S	Q171S
Q175T	Q783T	Q171T
Q175W	Q783W	Q171W
V183A	V791A	V179A
Q192M	Q802M	Q190M
Q192R	Q802R	Q190R
Q192T	Q802T	Q190T
Q192V	Q802V	Q190V
G197A	G807A	G195A
A204V	A814V	A202V
D217F	D828F	D216F
D217I	D828I	D216I
D217M	D828M	D216M
D217T	D828T	D216T
D217Y	D828Y	D216Y
D217V	D828V	D216V
D217Y	D828Y	D216Y
K224A	K835A	K223A
K224G	K835G	K223G
K224L	K835L	K223L
K224M	K835M	K223M
K224N	K835N	K223N
K224Q	K835Q	K223Q
K224R	K835R	K223R
K224T	K835T	K223T
K224Y	K835Y	K223Y

[0109] В таблице 5В представлены показательные модификации (мутационные строки) по настоящему изобретению. Соответственно, в настоящем документе предложены сконструированные протеазы на основе MTSP-1, содержащие одну или более

мутационных строк, представленных в таблице 5В. Такие показательные сконструированные протеазы могут быть способны расщеплять фактор В или демонстрировать другую активность по расщеплению. Остатки, которые указаны в скобках, например С[17] и С[19], относятся к остаткам, которые являются частью цепи протеазы в форме зимогена, которые впоследствии отщепляются и не остаются в зрелой протеазе.

Таблица 5В. Показательные сконструированные протеазы на основе MTSP-1

Нумерация по химотрипсину
C122S
Y146E/K224N
F97E/K224N/F99L/D217I/C122S/C[17]S/C[19]S
C[17]S/C[19]S/F97E/F99L/C122S/Q175L/Q192M/D217I/K224R
C[17]S/C[19]S/F97M/F99L/C122S/Q175W/D217I/K224A
F97E/K224N/F99L/D217I/C122S
F97E/F99L/C122S/Q175L/Q192M/D217I/K224R
F97M/F99L/C122S/Q175W/D217I/K224A
I41G/F97D/F99L/C122S
A77aT/F94Y/C122S/D125G
I41A/F97D/F99L/C122S
I41S/F97D/F99V/C122S/Y146D/C[17]S/C[19]S
I41G/F97D/F99L/C122S/Y146D/C[17]S/C[19]S
I41G/F97E/F99L/C122S/C[17]S/C[19]S
I41N/F97D/F99L/C122S/C[17]S/C[19]S
I41A/F97D/F99V/C122S/Y146D/Q175T/C[17]S/C[19]S
I41G/F97D/F99M/C122S/C[17]S/C[19]S
F97L/T98G/F99V/C122S/C[17]S/C[19]S/-null_D96insD
C122S/C[17]S/C[19]S/-null_T98insA
C122S/C[17]S/C[19]S/-null_T98insAA
C[17]S/C[19]S/I41Q/F97T/F99L/C122S/Y146D/Q175W
C[17]S/C[19]S/I41F/F97D/F99I/C122S/Y146D/Q175S/D217T
C[17]S/C[19]S/I41R/F97D/F99N/C122S/Y146D/D217V/K224Q

Нумерация по химотрипсину
C[17]S/C[19]S/I41R/F97E/F99N/C122S/Y146D/D217Y/K224M
C[17]S/C[19]S/I41G/F97E/F99L/C122S/R161G/D217Y/K224Q
C[17]S/C[19]S/I41R/F97D/F99H/C122S/Y146D/Q175P/Q192M/D217F/K224L
C[17]S/C[19]S/I41R/F97E/F99S/C122S/Y146D/Q175R/D217I/K224M
C[17]S/C[19]S/I41K/F97D/F99Y/C122S
I41K/F97D/F99H/C122S/C[17]S/C[19]S
F94Y/F99L/C122S/G197A/C[17]S/C[19]S
F99L/C122S/L172M/G197A/C[17]S/C[19]S
D23Y/L70Q/F99L/K110I/C122S/V183A/A204V/C[17]S/C[19]S
F94Y/C122S/C[17]S/C[19]S
I41A/F97D/F99L/C122S
I41N/F97D/F99L/C122S/C[17]S/C[19]S
I41S/F97D/F99V/C122S/Y146D
I41G/F97D/F99L/C122S/Y146D/
I41G/F97E/F99L/C122S
I41N/F97D/F99L/C122S
I41A/F97D/F99V/C122S/Y146D/Q175T
I41G/F97D/F99M/C122S
F97L/T98G/F99V/C122S/-null_D96insD
C122S/-null_T98insA
C122S/-null_T98insAA
I41Q/F97T/F99L/C122S/Y146D/Q175W
I41F/F97D/F99I/C122S/Y146D/Q175S/D217T
I41R/F97D/F99N/C122S/Y146D/D217V/K224Q
I41R/F97E/F99N/C122S/Y146D/D217Y/K224M
I41G/F97E/F99L/C122S/R161G/D217Y/K224Q
I41R/F97D/F99H/C122S/Y146D/Q175P/Q192M/D217F/K224L
I41R/F97E/F99S/C122S/Y146D/Q175R/D217I/K224M
I41K/F97D/F99Y/C122S
I41K/F97D/F99H/C122S
F94Y/F99L/C122S/G197A

Нумерация по химотрипсину
F99L/C122S/L172M/G197A
D23Y/L70Q/F99L/K110I/C122S/V183A/A204V
F94Y/C122S
I41A/F97D/F99L/C122S
I41N/F97D/F99L/C122S
Y146E/K224N

[0110] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе MTSP-1 по настоящему изобретению содержит последовательность, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 18.

[0111] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе MTSP-1 по настоящему изобретению содержит последовательность, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 7.

[0112] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе MTSP-1 содержит протеазный домен, который содержит последовательность, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере

мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 7.

Сконструированные протеазы на основе химазы

[0113] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы основаны на химазе, например на основе модифицированного серинового протеазного домена химазы. В некоторых вариантах осуществления такие сконструированные протеазы специфичны к фактору В в сайте, который не является мишенью для фактора D, причем сайт расщепления содержит последовательность, выбранную из: DVFY/QMI (SEQ ID NO: 12), EGVD/AE (SEQ ID NO: 13), DHKL/KSG (SEQ ID NO: 14) и TPW/SLA (SEQ ID NO: 15).

[0114] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы на основе химазы содержат одну или более модификаций относительно протеазного домена химазы, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

[0115] Модификации химазы или протеазного домена химазы могут быть обозначены номерами остатков протеазного домена химазы согласно нумерации по химотрипсину. В таблице 6 представлены соответствующие химотрипсинные номера аминокислотных позиций 1–226 протеазного домена химазы с SEQ ID NO: 6.

[0116] В таблице 6 представлены три строки для каждой аминокислоты. В первой строке указана стандартная нумерация аминокислотных последовательностей по SEQ ID NO: 6, протеазный домен химазы. Во второй строке представлены однобуквенные сокращенные названия аминокислот. Третья строка представляет соответствующую нумерацию по химотрипсину протеазного домена химазы под каждым однобуквенным сокращенным названием аминокислоты. Остаток, который присутствует в протеазном домене и отсутствует химотрипсину, представлен буквой в конце нотации. Например, остатки в химотрипсине в позиции аминокислоты 36 согласно нумерации по химотрипсину, которые вставлены в сконструированную химазу, обозначены V36a, S36b и N36c.

[0117] В таблице 6 представлена схема нумерации по химотрипсину и соответствующая стандартная схема нумерации для протеазного домена химазы. В последующих таблицах и в тексте описания модификации в протеазного домена химазы показаны согласно нумерации по химотрипсину или традиционной нумерации аминокислот. Если конкретная

модификация представлена только согласно нумерации по химотрипсину, специалисту в данной области будет понятно, как обратиться к таблице 6 и выполнить необходимые преобразования для понимания модификации в стандартной нумерации аминокислот, и наоборот.

Таблица 6. Нумерация протеазного домена химазы по химотрипсину

Станд. нумерация (SEQ ID 6)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Аминокислота	I	I	G	G	T	E	C	K	P	H	S	R	P	Y	M
Нумерация по химотр.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Станд. нумерация (SEQ ID 6)	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Аминокислота	A	Y	L	E	I	V	T	S	N	G	P	S	K	F	C
Нумерация по химотр.	31	32	33	34	35	36	36 _a	36 _b	36 _c	37	38	39	40	41	42
Станд. нумерация (SEQ ID 6)	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Аминокислота	G	G	F	L	I	R	R	N	F	V	L	T	A	A	H
Нумерация по химотр.	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
Станд. нумерация (SEQ ID 6)	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Аминокислота	C	A	G	R	S	I	T	V	T	L	G	A	H	N	I
Нумерация по химотр.	58	59	60	61	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73
Станд. нумерация (SEQ ID 6)	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
Аминокислота	T	E	E	E	D	T	W	Q	K	L	E	V	I	K	Q
Нумерация по химотр.	74	75	77	78	79	79a	80	81	82	83	84	85	86	87	88

Станд. нумерация (SEQ ID 6)	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
Аминокислота	L	C	V	G	N	P	R	K	T	K	S	A	F	K	G
Нумерация по химо-тр.	181	182	183	184	185	185 a	185 b	186	187	188	189	190	191	192	193
Станд. нумерация (SEQ ID 6)	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
Аминокислота	D	S	G	G	P	L	L	C	A	G	V	A	Q	G	I
Нумерация по химо-тр.	194	195	196	197	198	199	200	201	202	207	208	209	210	211	212
Станд. нумерация (SEQ ID 6)	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
Аминокислота	V	S	Y	G	R	S	D	A	K	P	P	A	V	F	T
Нумерация по химо-тр.	213	214	215	216	217	218	219	220	221	224	225	226	227	228	229
Станд. нумерация (SEQ ID 6)	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
Аминокислота	R	I	S	H	Y	R	P	W	I	N	Q	I	L	Q	A
Нумерация по химо-тр.	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244
Станд. нумерация (SEQ ID 6)	226														
Аминокислота	N														
Нумерация по химо-тр.	245														

[0118] Сконструированные протеазы на основе химазы согласно настоящему раскрытию содержат по меньшей мере одну модификацию в сериновом протеазном домене химазы. Как отмечалось выше, модификации могут представлять собой любое одно или более из: делеции одного или более аминокислотных остатков, делеции одного или более доменов, замены одного или более аминокислотных остатков, вставки одного или более

аминокислотных остатков, вставки одного или более доменов и замены одного или более доменов. В таблице 7А представлены показательные модификации серинового протеазного домена химазы. В качестве примера в таблице 7А представлены два столбца: в первом столбце указаны модификации согласно нумерации по химотрипсину; во втором столбце представлена стандартная нумерация аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO: 6.

[0119] Сконструированная протеаза может быть получена путем применения любой одной или более показательных модификаций, представленных в таблице 7А.

Соответственно, сконструированная протеаза на основе химазы по настоящему изобретению может содержать любую одну или более модификаций, представленных в таблице 7А.

[0120] В некоторых вариантах осуществления модификация находится в любом одном или более положениях, соответствующих положениям C22, S36, P38, G43, R49, K87, K93, I103, L114, L116, F123, V138, F173, D175, S189, A190, F191, K192, L199, V213, G216, A220, A226, F228 согласно нумерации по химотрипсину. В качестве примера модификация C22S в химазе представляет собой модификацию в виде замены в положении, соответствующем положению 22 серинового протеазного домена химазы согласно нумерации по химотрипсину.

Таблица 7А. Показательные модификации серинового протеазного домена химазы

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
C22S	C7S
G43S	G31S
R49P	R37P
S36bN	S23N
P38A	P26A
P38Q	P26Q
P38S	P26S
K87E	K74E
K93E	K80E

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
K93M	K80M
L99G	L86G
I103V	I90V
L114P	L101P
F123L	F110L
V138A	V125A
V138I	V125I
V138L	V125L
V138M	V125M
V138S	V125S
L116P	L103P
G145D	G132D
L160V	L146V
F173A	F157A
F173G	F157G
F173H	F157H
F173L	F157L
F173R	F157R
F173Y	F157Y
S189A	S176A
S189E	S176E
S189G	S176G
S189K	S176K
S189L	S176L
S189M	S176M
S189Q	S176Q
S189R	S176R
S189T	S176T
S189V	S176V
S189Y	S176Y

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
A190D	A177D
A190E	A177E
A190H	A177H
A190I	A177I
A190L	A177L
A190M	A177M
A190P	A177P
A190S	A177S
A190T	A177T
A190V	A177V
F191A	F178A
F191D	F178D
F191E	F178E
F191G	F178G
F191H	F178H
F191I	F178I
F191L	F178L
F191Q	F178Q
F191R	F178R
F191S	F178S
F191T	F178T
F191V	F178V
F191W	F178W
F191Y	F178Y
K192A	K179A
K192I	K179I
K192L	K179L
K192M	K179M
K192R	K179R
K192S	K179S

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
L199V	L186V
V213A	V196A
V213G	V196G
Y215F	Y198F
Y215S	Y198S
Y215L	Y198L
Y215T	Y198T
G216A	G199A
G216I	G199I
G216L	G199L
G216M	G199M
G216N	G199N
G216Q	G199Q
G216S	G199S
G216T	G199T
G216V	G199V
G216Y	G199Y
R217A	R200A
R217G	R200G
R217K	R200K
R217P	R200P
S218D	S201D
S218F	S201F
S218H	S201H
S218M	S201M
A220D	A203D
A220E	A203E
A220G	A203G
A220H	A203H
A220I	A203I

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
A220K	A203K
A220L	A203L
A220M	A203M
A220N	A203N
A220Q	A203Q
A220R	A203R
A220T	A203T
A220V	A203V
A220W	A203W
A220Y	A203Y
A226D	A207D
A226E	A207E
A226F	A207F
A226G	A207G
A226I	A207I
A226L	A207L
A226M	A207M
A226N	A207N
A226R	A207R
A226S	A207S
A226T	A207T
A226V	A207V
A226Y	A207Y
F228A	F209A
L99H	L86S
Y215H	Y198H
R217T	R200T
S218V	S201V
F173I	F157I
Y215K	Y198K

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
S218I	S201I
F41I	F29I
L99W	L86W
G151L	G137L
F173K	F157K
R217S	R200S
F41R	F29R
G151T	G137T
Y215R	Y198R
R217M	R200M
F41V	F29V
L99Y	L86Y
L99F	L86F
G151R	G137R
G151V	G137V
L99R	L86R
S218L	S201L
K40L	K28L
F41A	F29A
F41G	F29G
K40M	K28L
S218R	S201R
L99Q	L86Q
G151S	G137S
G151K	G137K
F173S	F157S
F41K	F29K
G151A	G137A
F41L	F29L
K93Q	K80Q

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
G119D	G106D
H100P	H87P
L116R	L103R
Q180H	Q165H
R235S	R216S
E21G	E6G
R61H	R49H
M135T	M122T
D175N	D159N
A209V	A192V
K111E	K98E
P150S	P136S
S152G	S138G
Q166H	Q152H
D175N	D159N
A220S	A203S
L99N	L86N
G151P	G137P
F41H	F29H
S218E	S201E
V183I	V168I
F228V	F209V
V138T	V125T
A190G	A177G
F228M	F209M
D175S	D159S
D175W	D159W
D175R	D159R
S218T	S201T
D175Y	D159Y

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
V213Q	V196Q
K40A	K28A
L99M	L86M
D175H	D159H
D175T	D159T
F173M	F157M
D175T	D159T
D175A	D159A
K40V	K28V
F41T	F29T
D175K	D159K
D175Q	D159Q
F41Q	F29Q
D175W	D159W
F41H	F29H
D175S	D159S
S218N	S201N
K40Q	K28Q
K40I	K28I
D175F	D159F
L99S	L86S
G151H	G137H

[0121] В таблице 7В представлены показательные модификации (мутационные строки) согласно изобретению. Соответственно, в настоящем документе предложены сконструированные протеазы на основе химазы, содержащие одну или более модификаций (мутационных строк), представленных в таблице 7А. Такие показательные сконструированные протеазы могут быть способны расщеплять фактор В или демонстрировать другую активность по расщеплению. В качестве примеров сконструированные протеазы на основе химазы включают протеазы, содержащие

показательные комбинации модификаций:

C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R, и

C22S/P38Q/K40M/F41H/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R, согласно нумерации по химотрипсину.

Таблица 7В. Показательные сконструированные протеазы на основе химазы

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
C22S	C7S
C22S/A226R	C7S/A207R
C22S/L99H/F173L/K192R/Y215H/R217T/S218V/A226R	C7S/L86H/F157L/K179R/Y198H/R200T/S201V/A207R
C22S/L99H/F173I/K192R/Y215K/R217T/S218I/A226R	C7S/L86H/F157I/K179R/Y198K/R200T/S201I/A207R
C22S/L99H/F173L/K192R/Y215H/R217T/S218V/A226R	C7S/L86H/F157L/K179R/Y198H/R200T/S201V/A207R
C22S/F41I/L99W/G151L/F173K/R217S/A226R	C7S/F29I/L86W/G137L/F157K/R200S/A207R
C22S/F41R/L99G/G151T/F173Y/Y215R/R217M/A226R	C7S/F29R/L86G/G137T/F157Y/Y198R/R200M/A207R
C22S/F41R/L99H/G151T/F173Y/Y215K/R217M/A226R	C7S/F29R/L86H/G137T/F157Y/Y198K/R200M/A207R
C22S/F41R/L99Y/G151T/F173K/R217S/A226R	C7S/F29R/L86Y/G137T/F157K/R200S/A207R
C22S/F41V/L99F/G151R/F173K/R217S/A226R	C7S/F29V/L86F/G137R/F157K/R200S/A207R
C22S/F41V/L99H/G151R/F173L/Y215R/R217T/A226R	C7S/F29V/L86H/G137R/F157L/Y198R/R200T/A207R
F41V/L99H/G151V/F173Y/Y215K/R217G/A226R	F29V/L86H/G137V/F157Y/Y198K/R200G/A207R
C22S/F41V/L99W/G151L/F173K/R217S/A226R	C7S/F29V/L86W/G137L/F157K/R200S/A207R
C22S/K192R/A226R	C7S/K179R/A207R

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
C22S/L99R/F173L/K192R/Y215H/R217T/S218V/A226R	C7S/L86R/F157L/K179R/Y198H/R200T/S201V/A207R
C22S/L99Y/F173L/K192R/Y215H/R217T/S218V/A226R	C7S/L86Y/F157L/K179R/Y198H/R200T/S201V/A207R
C22S/L99H/F173Y/K192R/S218L/A226R	C7S/L86H/F157Y/K179R/S201L/A207R
C22S/L99R/F173Y/K192R/S218L/A226R	C7S/L86R/F157Y/K179R/S201L/A207R
C22S/L99Y/F173Y/K192R/S218L/A226R	C7S/L86Y/F157Y/K179R/S201L/A207R
C22S/K40L/F41A/K192R/A226R	C7S/K28L/F29A/K179R/A207R
C22S/K40L/F41G/K192R/A226R	C7S/K28L/F29G/K179R/A207R
C22S/K40M/F41V/K192R/A226R	C7S/K28L/F29V/K179R/A207R
C22S/K40M/F41V/G151R/K192R/A226R	C7S/K28L/F29V/G137R/K179R/A207R
C22S/K40L/F41V/G151R/K192R/A226R	C7S/K28L/F29V/G137R/K179R/A207R
C22S/L99H/F173Y/K192R/Y215K/R217S/S218V/A226R	C7S/L86H/F157Y/K179R/Y198K/R200S/S201V/A207R
C22S/L99F/F173K/K192R/R217S/S218I/A226R	C7S/L86F/F157K/K179R/R200S/S201I/A207R
C22S/L99W/F173K/K192R/R217S/S218V/A226R	C7S/L86W/F157K/K179R/R200S/S201V/A207R
C22S/L99W/F173K/R217S/S218R/A226R	C7S/L86W/F157K/R200S/S201R/A207R
C22S/L99Q/F173L/Y215K/R217T/S218L/A226R	C7S/L86Q/F157L/Y198K/R200T/S201L/A207R
C22S/F41R/L99H/G151S/F173Y/Y215K/R217M/A226R	C7S/F29R/L86H/G137S/F157Y/Y198K/R200M/A207R
C22S/F41I/L99H/G151K/F173Y/Y215K/R217G/A226R	C7S/F29I/L86H/G137K/F157Y/Y198K/R200G/A207R
C22S/F41V/L99H/G151R/F173S/Y215K/A226R	C7S/F29V/L86H/G137R/F157S/Y198K/A207R
C22S/F41R/L99H/F173Y/Y215K/R217M/A226R	C7S/F29R/L86H/F157Y/Y198K/R200M/A207R
C22S/F41K/L99H/G151A/F173Y/Y215K/R217S/A226R	C7S/F29K/L86H/G137A/F157Y/Y198K/R200S/A207R

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
C22S/F41R/L99H/G151A/F173S/Y215K/R2 17T/A226R	C7S/F29R/L86H/G137A/F157S/Y198K/R20 0T/A207R
C22S/F41L/L99H/G151T/F173Y/Y215K/A2 26R	C7S/F29L/L86H/G137T/F157Y/Y198K/A20 7R
C22S/F41R/L99H/G151T/F173Y/Y215K/A2 26R	C7S/F29R/L86H/G137T/F157Y/Y198K/A20 7R
C22S/F41G/L99H/G151T/F173Y/Y215K/A 226R	C7S/F29G/L86H/G137T/F157Y/Y198K/A20 7R
C22S/F41R/L99H/F173Y/Y215K/A226R	C7S/F29R/L86H/F157Y/Y198K/A207R
C22S/F41V/L99H/F173Y/Y215K/A226R	C7S/F29V/L86H/F157Y/Y198K/A207R
C22S/F41G/L99H/F173Y/Y215K/A226R	C7S/F29G/L86H/F157Y/Y198K/A207R
C22S/F41R/L99H/G151T/F173L/Y215K/A2 26R	C7S/F29R/L86H/G137T/F157L/Y198K/A20 7R
C22S/F41V/L99H/G151T/F173L/Y215K/A2 26R	C7S/F29V/L86H/G137T/F157L/Y198K/A20 7R
C22S/F41G/L99H/G151T/F173L/Y215K/A2 26R	C7S/F29G/L86H/G137T/F157L/Y198K/A20 7R
C22S/F41R/L99H/F173L/Y215K/A226R	C7S/F29R/L86H/F157L/Y198K/A207R
C22S/F41V/L99H/G151T/F173Y/Y215K/A 226R	C7S/F29V/L86H/G137T/F157Y/Y198K/A20 7R
C22S/F41L/L99H/F173Y/Y215K/A226R	C7S/F29L/L86H/F157Y/Y198K/A207R
C22S/F41L/L99H/G151T/F173L/Y215K/A2 26R	C7S/F29L/L86H/G137T/F157L/Y198K/A20 7R
C22S/F41L/L99H/F173L/Y215K/A226R	C7S/F29L/L86H/F157L/Y198K/A207R
C22S/F41V/L99H/F173L/Y215K/A226R	C7S/F29V/L86H/F157L/Y198K/A207R
C22S/F41G/L99H/F173L/Y215K/A226R	C7S/F29G/L86H/F157L/Y198K/A207R
C22S/L99R/K192R/S218L/A226R	C7S/L86R/K179R/S201L/A207R
C22S/L99R/F173Y/S218L/A226R	C7S/L86R/F157Y/S201L/A207R
C22S/L99R/F173Y/K192R/A226R	C7S/L86R/F157Y/K179R/A207R
C22S/K93Q/G119D/F173S/K192R/A226R	C7S/K80Q/G106D/F157S/K179R/A207R

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
C22S/P38Q/H100P/L116R/F123L/Q180H/S218I/A226R/R235S	C7S/P26Q/H87P/L103R/F110L/Q165H/S201I/A207R/R216S
E21G/C22S/R61H/M135T/F173Y/D175N/A209V/A226R	E6G/C7S/R49H/M122T/F157Y/D159N/A192V/A207R
C22S/K111E/F173L/Y215H/A226R	C7S/K98E/F157L/Y198H/A207R
C22S/F173L/Y215H/A226R	C7S/F157L/Y198H/A207R
C22S/M135T/P150S/S152G/Q166H/D175N/A190T/A226R	C7S/M122T/P136S/S138G/Q152H/D159N/A177T/A207R
C22S/P38Q/H100P/L116R/F123L/Q180H/A226R/R235S	C7S/P26Q/H87P/L103R/F110L/Q165H/A207R/R216S
C22S/V138I/L160V/S189T/A226R	C7S/V125I/L146V/S176T/A207R
C22S/V138L/A226R	C7S/V125L/A207R
C22S/V138L/A226R	C7S/V125L/A207R
C22S/L160V/S189T/A226R	C7S/L146V/S176T/A207R
C22S/S189T/A226R	C7S/S176T/A207R
C22S/S218I/A226R	C7S/S201I/A207R
C22S/F173Y/A226R	C7S/F157Y/A207R
C22S/D175N/A226R	C7S/D159N/A207R
C22S/F173Y/D175N/A226R	C7S/F157Y/D159N/A207R
C22S/F173Y/D175N/A226R	C7S/F157Y/D159N/A207R
C22S/A220S/A226R	C7S/A203S/A207R
C22S/S189T/A190S/F191S/A220L/A226R	C7S/S176T/A177S/A178S/A203L/A207R
C22S/K40L/F41R/L99N/F173Y/S218L/A226R	C7S/K28L/F29R/L86N/F157Y/S201L/A207R
C22S/K40M/F41R/L99H/G151P/F173S/S218V/A226R	C7S/K28L/F29R/L86H/G137P/F157S/S201V/A207R
C22S/K40M/F41R/L99H/G151A/F173S/S218V/A226R	C7S/K28L/F29R/L86H/G137A/F157S/S201V/A207R
C22S/K40M/F41I/L99H/G151R/F173S/S218L/A226R	C7S/K28L/F29I/L86H/G137R/F157S/S201L/A207R

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
C22S/K40M/F41R/L99N/G151S/F173Y/S218L/A226R	C7S/K28L/F29R/L86N/G137S/F157Y/S201L/A207R
C22S/K40M/F41R/L99N/G151P/F173S/S218V/A226R	C7S/K28L/F29R/L86N/G137P/F157S/S201V/A207R
C22S/K40M/F41R/L99H/G151P/F173S/S218I/A226R	C7S/K28L/F29R/L86H/G137P/F157S/S201I/A207R
C22S/K40L/F41H/L99N/F173Y/S218L/A226R	C7S/K28L/F29H/L86N/F157Y/S201L/A207R
C22S/K40M/F41V/L99N/G151R/F173S/S218V/A226R	C7S/K28L/F29V/L86N/G137R/F157S/S201V/A207R
C22S/K40M/F41I/L99N/G151R/F173S/S218V/A226R	C7S/K28L/F29I/L86N/G137R/F157S/S201V/A207R
C22S/F41I/L99H/G151R/F173S/S218L/A226R	C7S/F29I/L86H/G137R/F157S/S201L/A207R
C22S/K40L/F41L/L99N/G151H/F173Y/S218V/A226R	C7S/K28L/F29L/L86N/G137H/F157Y/S201V/A207R
C22S/K40L/F41K/L99H/G151S/F173Y/S218L/A226R	C7S/K28L/F29K/L86H/G137S/F157Y/S201L/A207R
C22S/K40L/F41K/L99H/F173Y/S218L/A226R	C7S/K28L/F29K/L86H/F157Y/S201L/A207R
C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/S218L/A226R	C7S/K28L/F29K/L86N/F157Y/S201L/A207R
C22S/K40M/F41V/L99N/G151R/F173S/S218E/A226R	C7S/K28L/F29V/L86N/G137R/F157S/S201E/A207R
C22S/A190S/A226R	C7S/A177S/A207R
C22S/S189T/A190S/A226R	C7S/S176T/A177S/A207R
C22S/K40L/F41R/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	C7S/K28L/F29R/L86N/F157Y/D159N/S201L/A207R
C22S/K40L/F41H/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	C7S/K28L/F29H/L86N/F157Y/D159N/S201L/A207R
C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	C7S/K28L/F29K/L86N/F157Y/D159N/S201L/A207R

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
C22S/P38Q/V138I/V183I/L199V/A226R/F228V	C7S/P26Q/V125I/V168I/L186V/A207R/F209V
C22S/V138T/A190S/V213A/A226R	C7S/V125T/A177S/V196A/A207R
C22S/P38Q/V138L/A190G/L199V/V213A/A226R/F228A	C7S/P26Q/V125L/A177G/L186V/V196A/A207R/F209A
C22S/P38Q/V138I/A226R/F228A	C7S/P26Q/V125I/A207R/F209A
C22S/F41K/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	C7S/F29K/L86N/F157Y/D159N/S201L/A207R
C22S/K40L/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	C7S/K28L/L86N/F157Y/D159N/S201L/A207R
C22S/K40L/F41K/F173Y/D175N/S218L/A226R	C7S/K28L/F29K/F157Y/D159N/S201L/A207R
C22S/K40L/F41K/L99N/D175N/S218L/A226R	C7S/K28L/F29K/L86N/D159N/S201L/A207R
C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/D175N/A226R	C7S/K28L/F29K/L86N/F157Y/D159N/A207R
C22S/V138A/G145D/S189T/A190S/A226R	C7S/V125A/G132D/S176T/A177S/A207R
C22S/A226R/F228A	C7S/A207R/F209A
C22S/V138A/S189T/A226R/F228M	C7S/V125A/S176T/A207R/F209M
C22S/V138L/S189T/A190G/A226R	C7S/V125L/S176T/A177G/A207R
C22S/V138S/S189T/A226R/F228M	C7S/V125S/S176T/A207R/F209M
C22S/S189T/A226R/F228M	C7S/S176T/A207R/F209M
C22S/V138A/A226R	C7S/V125A/A207R
C22S/V138A/S189T/A226R	C7S/V125A/S176T/A207R
C22S/K40M/F41R/L99N/F173Y/D175S/S218L/A226R	C7S/K28L/F29R/L86N/F157Y/D159S/S201L/A207R
C22S/K40M/F41R/L99H/F173Y/D175W/S218L/A226R	C7S/K28L/F29R/L86H/F157Y/D159W/S201L/A207R
C22S/K40M/F41K/F173Y/D175R/S218E/A226R	C7S/K28L/F29K/F157Y/D159R/S201E/A207R

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
C22S/K40M/F41K/L99N/F173Y/D175R/S218T/A226R	C7S/K28L/F29K/L86N/F157Y/D159R/S201T/A207R
C22S/K40L/F41K/L99Q/F173Y/D175N/S218V/A226R	C7S/K28L/F29K/L86Q/F157Y/D159N/S201V/A207R
C22S/K40M/F41R/L99Q/F173Y/D175R/S218V/A226R	C7S/K28L/F29R/L86Q/F157Y/D159R/S201V/A207R
C22S/K40L/F41K/L99H/F173Y/D175S/S218I/A226R	C7S/K28L/F29K/L86H/F157Y/D159S/S201I/A207R
C22S/K40L/F41R/L99G/F173Y/D175R/S218V/A226R	C7S/K28L/F29R/L86G/F157Y/D159R/S201V/A207R
C22S/K40L/F41R/L99H/F173Y/D175Y/S218I/A226R	C7S/K28L/F29R/L86H/F157Y/D159Y/S201I/A207R
C22S/K40M/F41R/L99Q/F173Y/D175R/S218I/A226R	C7S/K28L/F29R/L86Q/F157Y/D159R/S201I/A207R
C22S/P38Q/V138I/A190S/V213A/A226R	C7S/P26Q/V125I/A177S/V196A/A207R
C22S/P38Q/V213Q/A226R/F228A	C7S/P26Q/V196Q/A207R/F209A
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/F173Y/D175Y/V213Q/S218V/A226R/F228A	C7S/P26Q/K28A/F29R/L86H/F157Y/D159Y/V196Q/S201V/A207R/F209A
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/D175N/V213Q/S218I/A226R/F228A	C7S/P26Q/K28A/F29R/L86H/D159N/V196Q/S201I/A207R/F209A
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99M/F173Y/D175N/V213Q/S218V/A226R/F228A	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86M/F157Y/D159N/V196Q/S201V/A207R/F209A
C22S/P38Q/K40M/F41R/D175N/V213Q/S218V/A226R/F228A	C7S/P26Q/K28L/F29R/D159N/V196Q/S201V/A207R/F209A
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/V125I/F157Y/D159N/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175S/A190S/V213A/S218I/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86H/V125I/F157Y/D159S/A177S/V196A/S201I/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99F/V138I/F173S/D175H/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86F/V125I/F157S/D159H/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29R/L86H/V125I/F157Y/D159N/A177S/V196A/S201V/A207R

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
C22S/P38Q/K40A/F41K/L99H/V138I/D175S/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29K/L86H/V125I/D159S/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175T/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86N/V125I/F157Y/D159T/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/V125I/F157Y/D159R/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86N/V125I/F157Y/D159N/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40A/F41R/V138I/D175R/A190S/V213A/S218T/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29R/V125I/D159R/A177S/V196A/S201T/A207R
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29R/L86H/V125I/F157Y/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41H/L99N/V138I/F173Y/D175S/A190S/V213A/S218T/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29H/L86N/V125I/F157Y/D159S/A177S/V196A/S201T/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41K/L99Y/V138I/F173M/D175Y/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29K/L86Y/V125I/F157M/D159Y/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40A/F41R/V138I/F173S/D175T/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29R/V125I/F157S/D159T/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173L/D175H/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/V125I/F157L/D159H/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99N/V138I/D175N/A190S/V213A/S218T/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86N/V125I/D159N/A177S/V196A/S201T/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41H/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29H/V125I/F157Y/D159R/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Q/V138I/F173Y/D175A/A190S/V213A/S218T/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86Q/V125I/F157Y/D159A/A177S/V196A/S201T/A207R
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/D175R/A190S/V213A/S218L/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29R/L86H/V125I/D159R/A177S/V196A/S201L/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99F/V138I/F173L/D175N/A190S/V213A/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86F/V125I/F157L/D159N/A177S/V196A/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Y/V138I/F173L/D175S/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86Y/V125I/F157L/D159S/A177S/V196A/S201V/A207R

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/V125I/D159N/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Y/V138I/F173Y/D175S/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86Y/V125I/F157Y/D159S/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173M/D175N/A190S/V213A/S218L/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/V125I/F157M/D159N/A177S/V196A/S201L/A207R
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175T/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86N/V125I/F157Y/D159T/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173L/D175N/A190S/V213A/S218L/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/V125I/F157L/D159N/A177S/V196A/S201L/A207R
C22S/P38Q/K40L/F41K/L99N/V138I/F173Y/D175S/A190S/V213A/S218I/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29K/L86N/V125I/F157Y/D159S/A177S/V196A/S201I/A207R
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99Y/V138I/F173L/D175R/A190S/V213A/S218L/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29R/L86Y/V125I/F157L/D159R/A177S/V196A/S201L/A207R
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99Q/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86Q/V125I/F157Y/D159N/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Q/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86Q/V125I/F157Y/D159N/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40V/F41R/V138I/F173L/D175R/A190S/V213A/S218I/A226R	C7S/P26Q/K28V/F29R/V125I/F157L/D159R/A177S/V196A/S201I/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41T/V138I/D175R/A190S/V213A/S218I/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29T/V125I/D159R/A177S/V196A/S201I/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173L/D175K/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/V125I/F157L/D159K/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Y/V138I/F173S/D175S/A190S/V213A/S218T/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86Y/V125I/F157S/D159S/A177S/V196A/S201T/A207R
C22S/P38Q/K40A/F41T/L99Y/V138I/F173S/D175H/A190S/V213A/S218I/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29T/L86Y/V125I/F157S/D159H/A177S/V196A/S201I/A207R
C22S/P38Q/K40A/F41R/V138I/F173L/D175R/A190S/V213A/S218L/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29R/V125I/F157L/D159R/A177S/V196A/S201L/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Y/V138I/F173L/D175Q/A190S/V213A/S218T/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86Y/V125I/F157L/D159Q/A177S/V196A/S201T/A207R

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
C22S/P38Q/K40A/F41Q/V138I/F173S/D175W/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29Q/V125I/F157S/D159W/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41H/V138I/D175S/A190S/V213A/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29H/V125I/D159S/A177S/V196A/A207R
C22S/P38Q/K40V/F41R/V138I/F173L/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28V/F29R/V125I/F157L/D159N/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40V/F41R/L99H/V138I/F173M/D175N/A190S/V213A/S218T/A226R	C7S/P26Q/K28V/F29R/L86H/V125I/F157M/D159N/A177S/V196A/S201T/A207R
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173L/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/V125I/F157L/D159R/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99M/V138I/F173L/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86M/V125I/F157L/D159R/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173M/D175T/A190S/V213A/S218I/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29R/L86H/V125I/F157M/D159T/A177S/V196A/S201I/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Y/V138I/F173L/D175S/A190S/V213A/S218T/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86Y/V125I/F157L/D159S/A177S/V196A/S201T/A207R
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218I/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29R/L86H/V125I/F157Y/D159N/A177S/V196A/S201I/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99W/V138I/F173M/D175H/A190S/V213A/S218T/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86W/V125I/F157M/D159H/A177S/V196A/S201T/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41H/L99H/V138I/D175S/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29H/L86H/V125I/D159S/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40V/F41R/V138I/F173S/D175N/A190S/V213A/S218I/A226R	C7S/P26Q/K28V/F29R/V125I/F157S/D159N/A177S/V196A/S201I/A207R
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99F/V138I/F173L/D175N/A190S/V213A/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86F/V125I/F157L/D159N/A177S/V196A/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99H/V138I/D175Q/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86H/V125I/D159Q/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175H/A190S/V213A/S218T/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/V125I/F157Y/D159H/A177S/V196A/S201T/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41K/L99W/V138I/F173M/A190S/V213A/S218N/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29K/L86W/V125I/F157M/A177S/V196A/S201N/A207R

Нумерация по химотрипсину	Стандартная нумерация (SEQ ID NO: 6)
C22S/P38Q/K40Q/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28Q/F29R/V125I/F157Y/D159N/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40I/F41R/L99N/V138I/D175T/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28I/F29R/L86N/V125I/D159T/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40Q/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175S/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28Q/F29R/L86H/V125I/F157Y/D159S/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218L/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29R/L86H/V125I/F157Y/D159N/A177S/V196A/S201L/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175F/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86N/V125I/F157Y/D159F/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175W/A190S/V213A/S218T/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86N/V125I/F157Y/D159W/A177S/V196A/S201T/A207R
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99Y/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86Y/V125I/F157Y/D159N/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99S/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/L86S/V125I/F157Y/D159N/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/D175N/A190S/V213A/S218I/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29R/L86H/V125I/D159N/A177S/V196A/S201I/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173S/D175Y/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/V125I/F157S/D159Y/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173L/D175R/A190S/V213A/S218T/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/V125I/F157L/D159R/A177S/V196A/S201T/A207R
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218T/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/V125I/F157Y/D159R/A177S/V196A/S201T/A207R
C22S/P38Q/K40A/F41K/L99N/V138I/D175H/A190S/V213A/S218V/A226R	C7S/P26Q/K28A/F29K/L86N/V125I/D159H/A177S/V196A/S201V/A207R
C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173Y/D175Y/A190S/V213A/S218I/A226R	C7S/P26Q/K28L/F29R/V125I/F157Y/D159Y/A177S/V196A/S201I/A207R

[0122] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе химазы по настоящему изобретению содержит последовательность, на по меньшей мере

50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 6.

[0123] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе химазы по настоящему изобретению содержит последовательность, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 6.

[0124] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе химазы содержит протеазный домен, который содержит последовательность, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 6.

Сконструированные протеазы на основе KLK5

[0125] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы основаны на KLK5. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы основаны на KLK5 и являются специфичными для фактора В в сайте, который является мишенью для фактора D, причем сайт расщепления содержит аминокислотную последовательность QQKR/KIV (SEQ ID NO: 9).

[0126] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы на основе KLK5 основаны на KLK5, содержащей аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 23. Остатки или модификации KLK5 могут быть обозначены номерами остатков KLK5 согласно нумерации по химотрипсину.

Представленная в таблице 7C схема нумерации по химотрипсину позиций аминокислот 45–271 в KLK5 с SEQ ID NO: 28, приводится в SEQ ID NO: 23. В таблице 7C указаны аминокислотные остатки 45–271 SEQ ID NO: 23 над однобуквенным сокращенным названием аминокислот, и с соответствующей нумерацией по химотрипсину под каждым однобуквенным сокращенным названием аминокислот. Остаток, который присутствует в протеазе и отсутствует химотрипсине, представлен буквой в конце нотации. Например, остатки в химотрипсине в позиции аминокислоты 36 согласно нумерации по химотрипсину, которые вставлены в сконструированную KLK5, обозначены 36a, 36b, 36c.

[0127] В таблице 7C представлена схема нумерации по химотрипсину и соответствующая стандартная схема нумерации для домена KLK5 протеазы. В последующих таблицах и в тексте описания модификации домена KLK5 протеазы показаны согласно нумерации по химотрипсину или с помощью традиционной нумерации аминокислот. Если конкретная модификация представлена только согласно нумерации по химотрипсину, специалисту в данной области будет понятно, как обратиться к таблице 7C и выполнить необходимые преобразования для понимания модификации в стандартной нумерации аминокислот, и наоборот.

Таблица 7C. Нумерация KLK5 по химотрипсину

Станд. нумерация (SEQ ID 23)	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59
Аминокислота	I	I	N	G	S	D	C	D	M	H	T	Q	P	W	Q
Нумерация по химотр.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Станд. нумерация (SEQ ID 23)	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
Аминокислота	A	A	L	L	L	R	P	N	Q	L	Y	C	G	A	V

Нумерац ия по химотр.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Станд. нумераци я (SEQ ID 23)	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89
Аминокис лота	L	V	H	P	Q	W	L	L	T	A	A	H	C	R	K
Нумерац ия по химотр.	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Станд. нумераци я (SEQ ID 23)	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
Аминокис лота	K	V	F	R	V	R	L	G	H	Y	S	L	S	P	V
Нумерац ия по химотр.	61	62	63	64	65	66	67	69	70	71	72	73	74	74A	75
Станд. нумераци я (SEQ ID 23)	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
Аминокис лота	Y	E	S	G	Q	Q	M	F	Q	G	V	K	S	I	P
Нумерац ия по химотр.	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Станд. нумераци я (SEQ ID 23)	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
Аминокис лота	H	P	G	Y	S	H	P	G	H	S	N	D	L	M	L
Нумерац ия по химотр.	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
Станд. нумераци я (SEQ ID 23)	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149

Аминокислоты	I	K	L	N	R	R	I	R	P	T	K	D	V	R	P
Номера по химотр.	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Станд. нумерация (SEQ ID 23)	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164
Аминокислоты	I	N	V	S	S	H	C	P	S	A	G	T	K	C	L
Номера по химотр.	121	122	123	124	125	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137
Станд. нумерация (SEQ ID 23)	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179
Аминокислоты	V	S	G	W	G	T	T	K	S	P	Q	V	H	F	P
Номера по химотр.	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152
Станд. нумерация (SEQ ID 23)	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194
Аминокислоты	K	V	L	Q	C	L	N	I	S	V	L	S	Q	K	R
Номера по химотр.	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167
Станд. нумерация (SEQ ID 23)	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209
Аминокислоты	C	E	D	A	Y	P	R	Q	I	D	D	T	M	F	C
Номера по химотр.	168	169	170	171	172	173	174	74A	176	177	178	179	180	181	182
Станд. нумерация	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224

[0128] Следует понимать, что сконструированные протеазы по настоящему изобретению не ограничиваются теми, которые представлены в приведенных выше таблицах. Такие модификации могут увеличивать период полувыведения, биодоступность или другие характеристики сериновых протеаз.

Гибридные белки

[0129] Сконструированные протеазы могут быть дополнительно модифицированы: например, они могут включать слияние (добавление) другого компонента или домена. Примеры таких компонентов или доменов включают, без ограничений, средства увеличения периода полувыведения и активирующие пептиды или сигналы активации. Например, можно добавлять компонент, способный увеличивать период полувыведения или биодоступность сконструированной протеазы по настоящему изобретению. К средствам увеличения периода полувыведения могут относиться, без ограничений, Fc (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), аффитела, ПЭГ и альбумин, например сывороточный альбумин человека (HSA).

[0130] Такие дополнительные компоненты могут быть добавлены, например, методом PAsylation®. Такие добавления могут продлевать период полувыведения или биодоступность сконструированной протеазы по сравнению с сериновой протеазой, которая не содержит средств увеличения периода полувыведения. В некоторых вариантах осуществления добавление средства увеличения периода полувыведения или другого аналогичного компонента также может улучшить или изменить любое одно или более свойств сконструированной протеазы, включая, без ограничений, стабильность, биодоступность, период полувыведения из сыворотки, срок хранения, способность к транспортировке и иммуногенность.

[0131] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, могут дополнительно содержать средство увеличения периода полувыведения. В некоторых вариантах осуществления средство увеличения периода полувыведения представляет собой добавление на N-конце сконструированной протеазы. В некоторых вариантах осуществления средство увеличения периода полувыведения представляет собой добавление на C-конце сконструированной протеазы. В некоторых вариантах осуществления средство увеличения периода полувыведения добавляют напрямую в сериновую протеазу. В

некоторых вариантах осуществления средство увеличения периода полувыведения добавляют в сериновую протеазу через линкер или через более чем один линкер. В некоторых вариантах осуществления средство увеличения периода полувыведения представляет собой Fc, и представляет собой Fc-домен дикого типа человека или его вариант. В некоторых вариантах осуществления средство увеличения периода полувыведения представляет собой альбумин, например сывороточный альбумин человека или его вариант.

[0132] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, могут содержать более одного средства увеличения периода полувыведения. В некоторых вариантах осуществления каждое из средств увеличения периода полувыведения представляет собой добавление на N-конце сериновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления каждое из средств увеличения периода полувыведения представляет собой добавление на C-конце сериновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления одно средство увеличения периода полувыведения представляет собой добавление на N-конце, а другое средство увеличения периода полувыведения представляет собой добавление на C-конце сконструированной протеазы. В некоторых вариантах осуществления средство увеличения периода полувыведения представляет собой Fc, и представляет собой Fc-домен дикого типа человека или его вариант. В некоторых вариантах осуществления средство увеличения периода полувыведения представляет собой альбумин, например сывороточный альбумин человека или его вариант.

[0133] В показательных вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе химазы по настоящему изобретению слита с Fc-доменом дикого типа или его вариантом. В показательных вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе химазы по настоящему изобретению слита с сывороточным альбумином человека или его вариантом.

[0134] В показательных вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе uPA по настоящему изобретению слита с Fc-доменом дикого типа или его вариантом. В показательных вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе uPA по настоящему изобретению слита с сывороточным альбумином человека или его вариантом.

[0135] В показательных вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе MTSP-1 по настоящему изобретению слита с Fc-доменом дикого типа или его вариантом. В показательных вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе MTSP-1 по настоящему изобретению слита с сывороточным альбумином человека или его вариантом.

[0136] В показательных вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе KLK5 по настоящему изобретению слита с Fc-доменом дикого типа или его вариантом. В показательных вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе KLK5 по настоящему изобретению слита с сывороточным альбумином человека или его вариантом.

[0137] Слитые белки также могут включать активирующую последовательность, так что полученный слитый белок, содержащий сконструированную протеазу по настоящему изобретению, находится в активной форме, например в двухцепочечной форме.

Активирующие последовательности могут содержать или быть модифицированы для содержания цистеина, который может образовывать дисульфидную связь со свободным Cys, таким как C122, например, в модифицированном полипептиде u-PA, в результате чего при активации полученный активированный полипептид содержит две цепи.

Показательные активирующие последовательности включают последовательность активации энтерокиназы и последовательность активации фурина и их модифицированные формы.

Активность сконструированных протеаз

[0138] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы по настоящему изобретению расщепляют фактор В в сайте, не являющемся мишенью для фактора D, или в сайте, являющемся мишенью для фактора D, и расщепление в таком сайте приводит к уменьшению функциональности фактора В или фрагмента фактора В. В некоторых вариантах осуществления функциональность фактора В или фрагмента фактора В представляет собой взаимодействие по меньшей мере с одним компонентом комплемента. В некоторых вариантах осуществления функциональность фактора В или фрагмента фактора В представляет собой взаимодействие с гидролизованным растворимым С3. В некоторых вариантах осуществления функциональность фактора В или фрагмента фактора В представляет собой взаимодействие с С3b. В некоторых

вариантах осуществления С3b представляет собой связанный с мембраной С3b. В некоторых вариантах осуществления расщепление в сайте, отличном от сайта фактора D, происходит, когда фактор В не связан с С3b. В некоторых вариантах осуществления расщепление в сайте фактора D происходит, когда фактор В не связан с С3b. В некоторых вариантах осуществления расщепление в сайте, отличном от сайта фактора D, происходит, когда фактор В связан с С3b (т. е. находится в комплексе с С3b).

[0139] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, могут расщеплять другие пептидные субстраты, которые не являются фактором В, и при этом также способны расщеплять фактор В. В некоторых вариантах осуществления активность расщепления пептидного субстрата, не являющегося фактором В, примерно равна или меньше активности расщепления сайта фактора В.

[0140] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют K_{cat}/K_m примерно 100, примерно 200, примерно 300, примерно 400, примерно 500, примерно 600, примерно 700, примерно 800, примерно 900, примерно 1000, примерно 1000, примерно 1100, примерно 1200, примерно 1300, примерно 1400, примерно 1500, примерно 1600, примерно 1700, примерно 1800 или примерно $1900 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ для расщепления фактора В. В некоторых вариантах осуществления значение K_{cat}/K_m доходит до или превышает примерно $10e^8$. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют K_{cat}/K_m от примерно 10^3 до примерно $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ для расщепления фактора В.

[0141] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют EC_{50} для расщепления фактора В от примерно 1 нМ до примерно 20 нМ. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют EC_{50} для фактора В менее чем примерно 20 нМ. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют EC_{50} для расщепления фактора В менее чем примерно 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют EC_{50} для расщепления фактора В от примерно 5 нМ до примерно 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют EC_{50} для расщепления фактора В примерно 20, примерно 25 или примерно 60 нМ.

В некоторых вариантах осуществления ЕС₅₀ для расщепления фактора В составляет примерно 20 нМ. В некоторых вариантах осуществления ЕС₅₀ для расщепления фактора В составляет примерно 50 нМ. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют ЕС₅₀ для расщепления фактора В от примерно 1000 нМ до примерно 4500 нМ. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют ЕС₅₀ для расщепления фактора В примерно 1000 нМ или примерно 2000 нМ, или примерно 3000 нМ, или примерно 4000 нМ, или примерно 5000 нМ.

[0142] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют каталитическую продолжительность жизни в плазме крови человека более чем примерно 72 часа. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют каталитическую продолжительность жизни в плазме крови человека примерно 120 часов или более. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют каталитическую продолжительность жизни в плазме крови человека примерно 120 часов или более и подходят для применения по хроническим показаниям. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют каталитическую продолжительность жизни в плазме крови человека примерно 24 часов. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют каталитическую продолжительность жизни в плазме крови человека примерно 24 часов или более и подходят для применения по острым показаниям.

[0143] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, обладают каталитической активностью в течение примерно 1 дня, примерно 2 дней, примерно 3 дней, примерно 4 дней, примерно 5 дней, примерно 6 дней, примерно 7 дней, примерно 8 дней, примерно 9 дней или примерно 10 дней. В некоторых вариантах осуществления каталитическая активность составляет от примерно 10% до примерно 85% от первоначально измеренной активности через примерно 7 дней.

[0144] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют увеличенный период полувыведения по

сравнению с MTSP-1 или протеазным доменом MTSP-1, которые не являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют повышенную биодоступность по сравнению с MTSP-1 или протеазным доменом MTSP-1, которые не являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют увеличенный период полувыведения по сравнению с uPA или протеазным доменом uPA, который не является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют увеличенную биодоступность по сравнению с uPA или протеазным доменом uPA, которые не являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют увеличенный период полувыведения по сравнению с химазой или протеазным доменом химазы, которые не являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют повышенную биодоступность по сравнению с химазой или протеазным доменом химазы, которые не являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют увеличенный период полувыведения по сравнению с KLK5 или протеазным доменом KLK5, которые не являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, имеют повышенную биодоступность по сравнению с KLK5 или протеазным доменом KLK5, которые не являются модифицированными.

[0145] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, являются неиммуногенными.

[0146] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, находятся в форме зимогена. Используемый в настоящем документе термин «форма зимогена» относится к полноразмерной протеазе перед расщеплением до зрелой формы. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, находятся в активной форме, также называемой зрелой формой. В некоторых вариантах осуществления изобретения форму зимогена можно активировать до зрелой формы *in vivo*

(in situ) при введении. В некоторых вариантах осуществления изобретения форму зимогена активируют ex vivo (in vitro), например, до введения сконструированной протеазы.

[0147] В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза находится в активированной форме. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза активируется ферментом, например энтерокиназой. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза на основе химазы по настоящему изобретению активируется энтерокиназой. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза активируется во время рекомбинантной продукции в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления активация фермента во время продукции в клетке-хозяине осуществляется посредством сверхэкспрессии фермента, например энтерокиназы. В некоторых вариантах осуществления сконструированную протеазу активируют после продукции и секреции клеткой-хозяином необязательно в среде.

Способы применения сконструированных протеаз

[0148] Сконструированные протеазы по настоящему изобретению можно использовать для модуляции системы комплемента.

[0149] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы по настоящему изобретению способны модулировать классический путь комплемента. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы по настоящему изобретению способны модулировать альтернативный путь комплемента. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы по настоящему изобретению способны модулировать лектиновый путь комплемента. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы по настоящему изобретению способны снижать усиление функции системы комплемента.

[0150] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы по настоящему изобретению способны снижать функциональность фактора В или фрагмента фактора В. Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы по настоящему изобретению способны снижать образование фрагментов фактора В — Va и/или Vb или создавать фрагменты Va и/или Vb фактора В, которые являются функционально неактивными.

[0151] В настоящем документе предложен способ инактивации фактора В, включающий приведение фактора В в контакт с любой из сконструированных протеаз, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления применение такого способа позволяет ингибировать активацию комплемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибируется классический путь комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибируется альтернативный путь комплемента. В некоторых вариантах осуществления ингибируется лектиновый путь комплемента.

[0152] В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ *in vivo*.

[0153] Сконструированные протеазы по настоящему изобретению можно применять в качестве терапевтических средств у субъекта. Соответственно, в настоящем документе предложен способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту любой из сконструированных протеаз по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние связано с нарушением регуляции комплемента соответственно, в некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние включает нарушение регуляции комплемента. В некоторых вариантах осуществления лечение представляет собой заместительную терапию. В некоторых вариантах осуществления лечение блокирует активацию комплемента. В некоторых вариантах осуществления лечение модулирует аутоиммунную реакцию. В некоторых вариантах осуществления лечение предназначено для повреждения эндотелиальных клеток или почечных клеток.

[0154] В некоторых показательных вариантах осуществления заболевание или состояние выбрано из волчаночного нефрита, С3-гломерулопатии (С3-ГП), первичной IgA-нефропатии, ишемически-реперфузионного (I/R) поражения трансплантата почки, ассоциированного с антителами к цитоплазме нейтрофилов (АНЦА) васкулита (ААВ), сепсиса, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), заболевания, вызванного коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), атипичного гемолитико-уремического синдрома (аГУС), мембранозной нефропатии (МН) и пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ).

[0155] В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, могут применяться для лечения воспалительных

заболеваний или состояний. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, способны снижать уровень воспалительных цитокинов. В некоторых показательных вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, эффективны в снижении уровня воспалительных цитокинов IL-2 и IL-6 и хемокина CXCL9, и полезны для лечения таких заболеваний, как ARDS.

[0156] В некоторых вариантах осуществления сконструированную протеазу вводят субъекту подкожно. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза активируется *in situ* в месте нахождения компонента комплемента с нарушенной регуляцией или в месте нарушения регуляции физиологических процессов. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза представлена в жидком стабильном составе. Введение сконструированных протеаз *in vivo* можно осуществлять внутривенно, внутримышечно, подкожно, местно, перорально, трансдермально, внутривентриально, внутриорбитально, интратекально, внутриартериально, интравентрикулярно, интраназально, трансмукозально, путем имплантации или путем ингаляции. В некоторых вариантах осуществления сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, вводят с помощью механического устройства.

Фармацевтические композиции

[0157] В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие любую из сконструированных протеаз, описанных в настоящем документе, и необязательно фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является стерильной. Фармацевтические композиции могут быть составлены для обеспечения совместимости с предполагаемыми путями введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению подходят для введения субъекту-человеку или другому примату, не являющегося человеком.

Наборы и промышленные изделия

[0158] В настоящем изобретении также предложен набор или изделие, содержащие любую из сконструированных протеаз, описанных в настоящем документе, или любую фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе. В некоторых

вариантах осуществления наборы могут дополнительно включать в себя инструктивные материалы по осуществлению любого из способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления наборы могут дополнительно включать стерильные контейнеры или флаконы для хранения слитых конструкторов и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления наборы могут дополнительно включать стерильные устройства доставки для введения слитых конструкторов и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изделие промышленного производства содержит любую фармацевтическую композицию по настоящему изобретению.

Получение сконструированных протеаз

[0159] В настоящем документе предложены способы и композиции для получения сконструированных протеаз. Соответственно, в настоящем документе предложены нуклеиновые кислоты и векторы, кодирующие любую из сконструированных протеаз по настоящему изобретению. Также предложены клетки, содержащие одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированную протеазу по настоящему изобретению.

[0160] Сконструированные протеазы, предложенные в настоящем документе, могут быть клонированы или выделены с использованием любых доступных способов, известных в данной области, для клонирования и выделения молекул нуклеиновых кислот. Такие способы включают ПЦР-амплификацию нуклеиновых кислот и скрининг библиотек, включая гибридизационный скрининг нуклеиновых кислот, скрининг на основе антител и скрининг на основе активности.

[0161] В настоящем документе предложены способы получения сконструированной протеазы по настоящему изобретению с использованием системы экспрессии, например, сконструированную протеазу по настоящему изобретению можно экспрессировать в клетках бактерий (например, *E. coli*), дрожжей, насекомых или млекопитающих (например, клетках СНО, клетках НЕК). В конкретных вариантах осуществления трансформация клеток-хозяев рекомбинантными молекулами ДНК, которые включают выделенный ген белка сконструированной протеазы, кДНК или синтезированную последовательность ДНК, позволяют получать множество копий гена. Таким образом, ген можно получить в больших количествах из растущих трансформантов, выделить

рекомбинантные молекулы ДНК из трансформантов и, при необходимости, извлечь вставленный гена из выделенной рекомбинантной ДНК. В некоторых вариантах осуществления сконструированная протеаза является активной при продукции. В некоторых вариантах осуществления сконструированную протеазу необходимо активировать при продукции. В таких вариантах осуществления сконструированную протеазу конструируют в активированном состоянии; способ включает получение сконструированной протеазы в форме зимогена в бактериальной, дрожжевой или млекопитающей системе-хозяине, и последующую активацию.

Введение сконструированных протеаз

[0162] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы введения сконструированной протеазы по настоящему изобретению путем доставки векторов/нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированную протеазу. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение рекомбинантных векторов. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены сконструированные протеазы для применения в генной терапии с использованием невирусных векторов. В других вариантах осуществления в настоящем документе предложены сконструированные протеазы для применения в генной терапии с использованием вирусных векторов. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы для экспрессии сконструированной протеазы, например, путем интеграции в геномное местоположение кодирующей сконструированную протеазу нуклеиновой кислоты, функционально связанной с регуляторными последовательностями, или таким образом, чтобы она вступала в функциональную связь с регуляторными последовательностями в геномном местоположении. В некоторых вариантах осуществления такие клетки затем вводят локально или системно субъекту, например субъекту, нуждающемуся в лечении.

[0163] Для выделения молекул нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированную протеазу, можно использовать способы амплификации нуклеиновых кислот, включая, например, методы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Материал, содержащий нуклеиновую кислоту, можно использовать в качестве исходного материала, из которого можно выделить молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированную протеазу. В способах амплификации могут быть использованы, например, препараты ДНК и мРНК, клеточные экстракты, тканевые экстракты (например, печени), образцы текучей

среды (например, кровь, сыворотка, слюна), образцы от здоровых и/или больных субъектов. В качестве источника исходного материала также могут использоваться библиотеки нуклеиновых кислот. Можно разработать праймеры для амплификации и модификации молекулы, кодирующей сконструированную протеазу. Например, можно разработать праймеры на основе экспрессированных последовательностей, из которых генерируют сконструированную протеазу.

[0164] К молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированную протеазу, можно присоединить дополнительные нуклеотидные последовательности, включая линкерные последовательности, содержащие сайты рестрикционной эндонуклеазы, с целью клонирования синтетического гена в вектор, например вектор экспрессии белка или вектор, предназначенный для амплификации базовых ДНК последовательностей белка. Кроме того, дополнительные нуклеотидные последовательности, определяющие функциональные ДНК-элементы, можно функционально связать с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированную протеазу. Примеры таких последовательностей включают, без ограничений, промоторные последовательности, предназначенные для облегчения внутриклеточной экспрессии белка, и последовательности секреции, предназначенные для облегчения секреции белка. Дополнительные нуклеотидные последовательности, такие как последовательности, определяющие связывающиеся с белками области, также можно присоединить к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированные протеазы. Такие области включают, без ограничений, последовательности для облегчения захвата сконструированной протеазы в конкретные клетки-мишени или иным образом усиливающие фармакокинетику синтетического гена.

Нумерованный список вариантов осуществления

[0165] В описании также предложены следующие не имеющие ограничительного характера нумерованные варианты осуществления.

Набор I

[0166] Вариант осуществления I-1. Сконструированная протеаза из семейства сериновых протеаз S1A, причем сконструированная протеаза является специфичной для расщепления фактора В и способна расщеплять его.

[0167] Вариант осуществления I-2. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-1, причем расщепление фактора В сконструированной протеазой образует один или более функционально неактивных фрагментов.

[0168] Вариант осуществления I-3. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления I-2, причем один или более функционально неактивных фрагментов способны уменьшать активацию комплемента.

[0169] Вариант осуществления I-4. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–3, причем расщепление фактора В приводит к образованию фрагмента фактора В, который имеет сниженную функциональность, или приводит к уменьшению функциональности фактора В.

[0170] Вариант осуществления I-5. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–4, причем фактор В представляет собой фактор В грызуна.

[0171] Вариант осуществления I-6. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–4, причем фактор В представляет собой фактор В приматов, не являющихся человеком.

[0172] Вариант осуществления I-7. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-6, причем примат, не являющийся человеком, представляет собой яванского макака.

[0173] Вариант осуществления I-8. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–4, причем фактор В представляет собой фактор В человека.

[0174] Вариант осуществления I-9. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-8, причем фактор В содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

[0175] Вариант осуществления I-10. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–9, причем расщепление фактора В происходит в сайте, не являющемся мишенью для фактора D.

[0176] Вариант осуществления I-11. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-10, причем расщепление в этом сайте генерирует по меньшей мере два фрагмента, которые не являются Va и Vb.

[0177] Вариант осуществления I-12. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–11, причем расщепление в данном сайте приводит к снижению образования продуктов расщепления фактора В, Va и Vb, по сравнению с расщеплением фактором D.

[0178] Вариант осуществления I-13. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–9, причем расщепление фактора В происходит в сайте, являющемся мишенью для фактора D.

[0179] Вариант осуществления I-14. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–13, где сайт, являющийся мишенью для фактора D, содержит последовательность QQKR/KIV (SEQ ID NO: 9).

[0180] Вариант осуществления I-15. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-10, причем сайт расщепления фактора В содержит последовательность, выбранную из: WEHR/KGT (SEQ ID NO: 10), KNQKR/QKQ (SEQ ID NO: 11), DVFY/QMI (SEQ ID NO: 12), EGVD/AE (SEQ ID NO: 13), DHKL/KSG (SEQ ID NO: 14), TPW/SLA (SEQ ID NO: 15), KVSEAD (SEQ ID NO: 20), IRPSKG (SEQ ID NO: 4), GGEKRD (SEQ ID NO: 5), GKKEAG (SEQ ID NO: 3) и DHKL/KSG (SEQ ID NO: 21).

[0181] Вариант осуществления I-16. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–15, причем сконструированная протеаза основана на химотрипсиноподобной сериновой протеазе, выбранной из группы, состоящей из сериновой протеазы 1 мембранного типа (MTSP-1), активатора плазминогена урокиназного типа (uPA), химазы и родственной калликреину пептидазы 5 (KLK5).

[0182] Вариант осуществления I-17. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-16, причем конструирование сконструированной протеазы включает

одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из замены, добавления и делеции аминокислотного остатка, а также замены, добавления и делеции домена химотрипсиноподобной сериновой протеазы.

[0183] Вариант осуществления I-18. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 16–17, причем сконструированная протеаза основана на MTSP-1 или uPA, а сайт расщепления содержит последовательность, выбранную из: WEHR/KGT (SEQ ID NO: 10) и KNQKR/QKQ (SEQ ID NO: 11).

[0184] Вариант осуществления I-19. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–18, причем сконструированная протеаза основана на MTSP-1.

[0185] Вариант осуществления I-20. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–18, причем сконструированная протеаза не основана на MTSP-1.

[0186] Вариант осуществления I-21. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-19, содержащая одну или более модификаций относительно MTSP-1, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, причем номера остатков даются согласно нумерации по химотрипсину.

[0187] Вариант осуществления I-22. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–18, причем сконструированная протеаза основана на uPA.

[0188] Вариант осуществления I-23. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–18, причем сконструированная протеаза не основана на uPA.

[0189] Вариант осуществления I-24. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-22, содержащая одну или более модификаций относительно uPA, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, причем номера остатков даются согласно нумерации по химотрипсину.

[0190] Вариант осуществления I-25. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–17, причем сконструированная протеаза основана на химазе.

[0191] Вариант осуществления I-26. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-25, причем сконструированная протеаза основана на химазе, а сайт

расщепления содержит последовательность, выбранную из DVFY/QMI (SEQ ID NO: 12), EGVD/AE (SEQ ID NO: 13), DHKL/KSG (SEQ ID NO: 14) и TPW/SLA (SEQ ID NO: 15).

[0192] Вариант осуществления I-27. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления I-1–17, причем сконструированная протеаза основана на KLK5.

[0193] Вариант осуществления I-28. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-25, содержащая одну или более модификаций относительно химазы, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, причем номера остатков даются согласно нумерации по химотрипсину.

[0194] Вариант осуществления I-29. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-19, причем одна или более модификаций находятся в одном или более положениях, соответствующих одному или более положениям, выбранным из D23, I41, L70, A77, F94, D96, F97, T98, F99, K110, C122, D125, Y146, Q175, V183, Q192, A204, D217 и K224 в MTSP-1, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 7, причем номера остатков даются согласно нумерации по химотрипсину.

[0195] Вариант осуществления I-30. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-22, причем одна или более модификаций находятся в одном или более положениях, соответствующих одному или более положениям, выбранным из G18, R36, S37, V38, Y40, D60, A96, L97, A98, H99, C122, Y151, V159, A184, Q192, R217, K224 в uPA, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, причем номера остатков даются согласно нумерации по химотрипсину.

[0196] Вариант осуществления I-31. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-25, причем одна или более модификаций являются одним или более положениями, соответствующими одному или более положениям, выбранным из C22, S36, P38, G43, R49, K87, K93, I103, L114, L116, F123, V138, F173, D175, S189, A190, F191, K192, L199, V213, G216, A220, A226, F228 в химазе, содержащей последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6, причем номера остатков даются согласно нумерации по химотрипсину.

[0197] Вариант осуществления I-32. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 4–31, причем функция фактора В или фрагмента фактора В представляет собой взаимодействие по меньшей мере с одним компонентом комплемента.

[0198] Вариант осуществления I-33. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 4–31, причем функция фактора В или фрагмента фактора В представляет собой взаимодействие с гидролизованным растворимым С3.

[0199] Вариант осуществления I-34. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 4–33, причем функция фактора В или фрагмента фактора В представляет собой взаимодействие с С3b.

[0200] Вариант осуществления I-35. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 4–34, причем функция фактора В или фрагмента фактора В представляет собой взаимодействие со связанным с мембраной С3b.

[0201] Вариант осуществления I-36. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–35, причем расщепление происходит, когда фактор В не связан с С3b.

[0202] Вариант осуществления I-37. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–36, причем активность расщепления пептидного субстрата, не являющегося фактором В, примерно равна или меньше активности расщепления сайта фактора В.

[0203] Вариант осуществления I-38. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–36, причем сконструированная протеаза имеет отношение k_{cat}/K_m примерно 100, примерно 200, примерно 300, примерно 400, примерно 500, примерно 600, примерно 700, примерно 800, примерно 900, примерно 1000, примерно 1000, примерно 1100, примерно 1200, примерно 1300, примерно 1400, примерно 1500, примерно 1600, примерно 1,700, примерно 1800 или примерно 1900 $M^{-1} s^{-1}$ для расщепления фактора В.

[0204] Вариант осуществления I-39. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–38, причем сконструированная протеаза имеет отношение k_{cat}/K_m от примерно 103 до примерно 109 $M^{-1} s^{-1}$ для расщепления фактора В.

[0205] Вариант осуществления I-40. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–39, причем сконструированная протеаза имеет EC_{50} для фактора В менее чем примерно 20 нМ.

[0206] Вариант осуществления I-41. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–40, причем сконструированная протеаза имеет EC50 для фактора В менее чем примерно 1 нМ.

[0207] Вариант осуществления I-42. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–39, причем сконструированная протеаза имеет EC50 для фактора В примерно 20, примерно 25 или примерно 60 нМ.

[0208] Вариант осуществления I-43. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–39, причем сконструированная протеаза имеет EC50 для расщепления фактора В от примерно 1000 до примерно 4500 нМ.

[0209] Вариант осуществления I-44. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–43, причем сконструированная протеаза имеет период полувыведения из плазмы крови человека более чем примерно 72 часа.

[0210] Вариант осуществления I-45. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–44, причем сконструированная протеаза имеет период полувыведения из плазмы крови человека более чем примерно 120 часов.

[0211] Вариант осуществления I-46. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления 1–45, причем сконструированная протеаза имеет период полувыведения из плазмы крови человека примерно 7 дней.

[0212] Вариант осуществления I-47. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-46, причем каталитическая активность составляет от примерно 10% до примерно 50% или от примерно 90% до примерно 100%.

[0213] Вариант осуществления I-48. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-29, причем сконструированная протеаза имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с MTSP-1, которая не является модифицированной.

[0214] Вариант осуществления I-49. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления I-29 и I-48, причем сконструированная протеаза имеет повышенную биодоступность по сравнению с MTSP-1, которая не является модифицированной.

[0215] Вариант осуществления I-50. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-30, причем сконструированная протеаза имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с uPA, которая не является модифицированной.

[0216] Вариант осуществления I-51. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления I-30 и I-50, причем сконструированная протеаза имеет повышенную биодоступность по сравнению с uPA, которая не является модифицированной.

[0217] Вариант осуществления I-52. Сконструированная протеаза по варианту осуществления I-31, причем сконструированная протеаза имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с химазой, которая не является модифицированной.

[0218] Вариант осуществления I-53. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления I-31 и I-52, причем сконструированная протеаза имеет повышенную биодоступность по сравнению с химазой, которая не является модифицированной.

[0219] Вариант осуществления I-54. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с I-1 по I-53, причем сконструированная протеаза является неиммуногенной.

[0220] Вариант осуществления I-55. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления набора I 1–54, причем сконструированная протеаза имеет форму зимогена.

[0221] Вариант осуществления I-56. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления набора I 1–54, причем сконструированная протеаза находится в активной форме.

[0222] Вариант осуществления I-57. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления набора I 1–56, дополнительно содержащая средство увеличения периода полувыведения.

[0223] Вариант осуществления I-58. Способ инактивации фактора В, включающий приведение фактора В в контакт с любой из сконструированных протеаз вариантов осуществления с I-1 по I-57.

- [0224] Вариант осуществления I-59. Способ по варианту осуществления I-58, в котором ингибируется активация комплемента.
- [0225] Вариант осуществления I-60. Способ по варианту осуществления I-59, в котором ингибируется классический путь комплемента.
- [0226] Вариант осуществления I-61. Способ по любому из вариантов осуществления 59–60, в котором ингибируется альтернативный путь комплемента.
- [0227] Вариант осуществления I-62. Способ по любому из вариантов осуществления 59–61, в котором ингибируется лектиновый путь комплемента.
- [0228] Вариант осуществления I-63. Способ по любому из вариантов осуществления набора I 58–62, причем способ представляет собой способ *in vitro*.
- [0229] Вариант осуществления I-64. Способ по любому из вариантов осуществления набора I 58–62, причем способ представляет собой способ *in vivo*.
- [0230] Вариант осуществления I-65. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту любой из сконструированных протеаз вариантов осуществления 1–57.
- [0231] Вариант осуществления I-66. Способ по варианту осуществления I-65, в котором заболевание или состояние связано с нарушением регуляции комплемента.
- [0232] Вариант осуществления I-67. Способ по любому из вариантов осуществления набора I 65–66, причем заболевание или состояние представляет собой воспалительное заболевание или состояние.
- [0233] Вариант осуществления I-68. Способ по любому из вариантов осуществления 65–67, причем лечение представляет собой заместительную терапию.
- [0234] Вариант осуществления I-69. Способ по любому из вариантов осуществления набора I 65–68, причем лечение блокирует активацию комплемента.
- [0235] Вариант осуществления I-70. Способ по любому из вариантов осуществления набора I 65–69, причем лечение модулирует аутоиммунную реакцию.

[0236] Вариант осуществления I-71. Способ по любому из вариантов осуществления набора I 65–70, причем заболевание или состояние представляет собой врожденную недостаточность комплемента.

[0237] Вариант осуществления I-72. Способ по любому из вариантов осуществления набора I 65–71, причем лечение предназначено для повреждения эндотелиальных или почечных клеток.

[0238] Вариант осуществления I-73. Способ по любому из вариантов осуществления набора I 65–72, причем заболевание или состояние выбрано из волчаночного нефрита, С3-гломерулопатии (С3-ГП), первичной IgA-нефропатии, ишемически-реперфузионного (I/R) поражения трансплантата почки, ассоциированного с антителами к цитоплазме нейтрофилов (АНЦА) васкулита (ААВ), сепсиса, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), заболевания, вызванного коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), атипичного гемолитико-уремического синдрома (аГУС), мембранозной нефропатии (МН) и пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ).

[0239] Вариант осуществления I-74. Способ по любому из вариантов осуществления набора I 65–73, причем заболевание или состояние представляет собой дефицит белка контроля.

[0240] Вариант осуществления I-75. Способ по любому из вариантов осуществления набора I 65–73, причем заболевание или состояние представляет собой вторичное расстройство комплемента.

[0241] Вариант осуществления I-76. Способ по любому из вариантов осуществления набора I 65–73, причем заболевание или состояние представляет собой связанное с иммунитетом заболевание или состояние.

[0242] Вариант осуществления I-77. Способ по любому из вариантов осуществления набора I 65–76, причем сконструированную протеазу вводят субъекту подкожно.

[0243] Вариант осуществления I-78. Способ по варианту осуществления I-77, в котором сконструированная протеаза активируется *in situ* в месте нахождения компонента комплемента с нарушенной регуляцией.

[0244] Вариант осуществления I-79. Способ по из по любому из вариантов осуществления группы I 65–78, причем сконструированная протеаза представлена в жидком стабильном составе.

[0245] Вариант осуществления I-80. Фармацевтическая композиция, содержащая любую из сконструированных протеаз по вариантам осуществления из набора I 1–57 и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

[0246] Вариант осуществления I-81. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления I-80, причем сконструированная протеаза представлена в жидком стабильном составе.

[0247] Вариант осуществления I-82. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления из набора I 80–81, причем композиция приготовлена для подкожного введения.

Набор II

[0248] Вариант осуществления II-1. Сконструированная протеаза, содержащая модифицированный протеазный домен химазы, модифицированный протеазный домен сериновой протеазы 1 мембранного типа (MTSP-1), модифицированный протеазный домен активатора пламиногена урокиназного типа (uPA) или модифицированный протеазный домен родственной калликреину пептидазы 5 (KLK5), причем сконструированная протеаза способна расщеплять фактор В.

[0249] Вариант осуществления II-2. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-1, причем расщепление фактора В сконструированной протеазой образует один или более функционально неактивных фрагментов.

[0250] Вариант осуществления II-3. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-2, причем один или более функционально неактивных фрагментов способны уменьшать активацию комплемента.

[0251] Вариант осуществления II-4. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-3, причем расщепление фактора В приводит к образованию фрагмента фактора В, который имеет сниженную функциональность.

[0252] Вариант осуществления II-5. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-4, причем фактор В представляет собой фактор В приматов, не являющихся человеком.

[0253] Вариант осуществления II-6. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-5, причем примат, не являющийся человеком, представляет собой яванского макака.

[0254] Вариант осуществления II-7. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-4, причем фактор В представляет собой фактор В человека.

[0255] Вариант осуществления II-8. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-7, причем фактор В содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

[0256] Вариант осуществления II-9. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-8, причем расщепление фактора В происходит в сайте, не являющемся мишенью для фактора D.

[0257] Вариант осуществления II-10. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-9, причем расщепление в сайте, не являющемся мишенью фактора D, генерирует по меньшей мере два фрагмента, которые не являются Va и Vb.

[0258] Вариант осуществления II-11. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-10, причем расщепление фактора В приводит к снижению образования продуктов расщепления фактора В, Va и Vb, по сравнению с расщеплением фактором D.

[0259] Вариант осуществления II-12. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-8, причем расщепление фактора В происходит в сайте, являющемся мишенью для фактора D.

[0260] Вариант осуществления II-13. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-12, причем сайт расщепления фактора В, являющийся мишенью для фактора D, содержит QQKR/KIV (SEQ ID NO: 9).

[0261] Вариант осуществления II-14. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-9, причем сайт расщепления фактора В содержит последовательность, выбранную из: WEHR/KGT (SEQ ID NO: 10), KNQKR/QKQ (SEQ ID NO: 11), DVFY/QMI (SEQ ID NO: 12), EGVD/AE (SEQ ID NO: 13), DHKL/KSG (SEQ ID NO: 14), TPW/SLA (SEQ ID NO: 15), KVSEAD (SEQ ID NO: 20), IRPSKG (SEQ ID NO: 4), GGEKRD (SEQ ID NO: 5), GKKEAG (SEQ ID NO: 3) и DHKL/KSG (SEQ ID NO: 21).

[0262] Вариант осуществления II-15. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-9, причем сайт расщепления фактора В содержит последовательность, выбранную из WEHR/KGT (SEQ ID NO: 10) и KNQKR/QKQ (SEQ ID NO: 11), и при этом сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен MTSP-1 или модифицированный протеазный домен uPA.

[0263] Вариант осуществления II-16. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-15, причем сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен MTSP-1.

[0264] Вариант осуществления II-17. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-15, причем сконструированная протеаза не содержит модифицированный протеазный домен MTSP-1.

[0265] Вариант осуществления II-18. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-16, содержащая одну или более модификаций относительно протеазного домена MTSP-1, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

[0266] Вариант осуществления II-19. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-18, причем модификация представляет собой одно или более из замены, добавления и делеции одного или более аминокислотных остатков.

[0267] Вариант осуществления II-20. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-16, причем одна или более модификаций находятся в одном или более положениях, соответствующих одному или более положениям, выбранным из D622, I640, L678, A686, F703, D705, F706, T707, F708, K719, C731, D734, Y755, Q783, V791, Q802, A814, D828 и K835 в протеазном домене MTSP-1, содержащем последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 18.

- [0268]** Вариант осуществления II-21. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-16, причем одна или более модификаций выбраны из представленных в таблице 5А.
- [0269]** Вариант осуществления II-22. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-16, причем одна или более модификаций выбраны из показательных мутационных строк, представленных в таблице 5В.
- [0270]** Вариант осуществления II-23. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-15, причем сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен uPA.
- [0271]** Вариант осуществления II-24. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-15, причем сконструированная протеаза не содержит модифицированный протеазный домен uPA.
- [0272]** Вариант осуществления II-25. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-23, содержащая одну или более модификаций относительно протеазного домена uPA, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.
- [0273]** Вариант осуществления II-26. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-25, причем модификация представляет собой одно или более из замены, добавления и делеции одного или более аминокислотных остатков.
- [0274]** Вариант осуществления II-27. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-23, причем одна или более модификаций находятся в одном или более положениях, соответствующих одному или более положениям, выбранным из S37, D60, L97, G161, R179, H180, V185, Y187, I207, A247, D248, A251, H252, C279, Y308, V316, A343, Q353, R378, K385 в протеазном домене uPA, содержащем последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8.
- [0275]** Вариант осуществления II-28. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-23, причем одна или более модификаций выбраны из представленных в таблице 3А.

[0276] Вариант осуществления II-29. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-23, причем одна или более модификаций выбраны из показательных мутационных строк, представленных в таблице 3В.

[0277] Вариант осуществления II-30. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-19, причем сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен химазы.

[0278] Вариант осуществления II-31. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-19, причем сконструированная протеаза не содержит модифицированный протеазный домен химазы.

[0279] Вариант осуществления II-32. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-30, причем сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен химазы, а сайт расщепления содержит последовательность, выбранную из DVFY/QMI (SEQ ID NO: 12), EGVD/AE (SEQ ID NO: 13), DHKL/KSG (SEQ ID NO: 14) и TPW/SLA (SEQ ID NO: 15).

[0280] Вариант осуществления II-33. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-30, содержащая одну или более модификаций относительно протеазного домена химазы, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

[0281] Вариант осуществления II-34. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-33, причем модификация представляет собой одно или более из замены, добавления и делеции одного или более аминокислотных остатков.

[0282] Вариант осуществления II-35. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-30, причем одна или более модификаций являются одним или более положениями, соответствующими одному или более положениям, выбранным из S36 C7, V21, P26, G31, R37, K74, K80, I90, L101, L103, F110, V125, F157, D159, S176, A177, F178, K179, L186, V196, G199, A203, A207, F209 в протеазном домене химазы, содержащем последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6.

[0283] Вариант осуществления П-36. Сконструированная протеаза по варианту осуществления П-30, причем одна или более модификаций выбраны из представленных в таблице 7А.

[0284] Вариант осуществления П-37. Сконструированная протеаза по варианту осуществления П-30, причем одна или более модификаций выбраны из показательных мутационных строк, представленных в таблице 7В.

[0285] Вариант осуществления П-38. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с П-1 по П-19, причем сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен KLK5, необязательно содержащий одну или более аминокислотных модификаций SEQ ID NO: 23.

[0286] Вариант осуществления П-39. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с П-1 по П-19, причем сконструированная протеаза не содержит модифицированный протеазный домен KLK5.

[0287] Вариант осуществления П-40. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с П-1 по П-39, причем сконструированная протеаза имеет отношение k_{cat}/K_m примерно 100, примерно 200, примерно 300, примерно 400, примерно 500, примерно 600, примерно 700, примерно 800, примерно 900, примерно 1000, примерно 1000, примерно 1100, примерно 1200, примерно 1300, примерно 1400, примерно 1500, примерно 1600, примерно 1,700, примерно 1800 или примерно 1900 $M^{-1} s^{-1}$ для расщепления фактора В.

[0288] Вариант осуществления П-41. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с П-1 по П-40, причем сконструированная протеаза имеет отношение k_{cat}/K_m от примерно 10^3 до примерно $10^9 M^{-1} s^{-1}$ для расщепления фактора В.

[0289] Вариант осуществления П-42. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с П-1 по П-41, причем сконструированная протеаза имеет EC_{50} для фактора В менее чем примерно 20 нМ.

[0290] Вариант осуществления П-43. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с П-1 по П-42, причем сконструированная протеаза имеет EC_{50} для фактора В менее чем примерно 1 нМ.

[0291] Вариант осуществления II-44. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-41, причем сконструированная протеаза имеет EC_{50} для фактора В примерно 20, примерно 25 или примерно 60 нМ.

[0292] Вариант осуществления II-45. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-41, причем сконструированная протеаза имеет EC_{50} для расщепления фактора В от примерно 1000 до примерно 4500 нМ.

[0293] Вариант осуществления II-46. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-45, причем сконструированная протеаза имеет период полувыведения из плазмы крови человека более чем примерно 72 часа.

[0294] Вариант осуществления II-47. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-46, причем сконструированная протеаза имеет период полувыведения из плазмы крови человека более чем примерно 120 часов.

[0295] Вариант осуществления II-48. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-47, причем сконструированная протеаза имеет период полувыведения из плазмы крови человека примерно 7 дней.

[0296] Вариант осуществления II-49. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-48, причем каталитическая активность составляет от примерно 10% до примерно 50% или от примерно 90% до примерно 100%.

[0297] Вариант осуществления II-50. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-16, причем сконструированная протеаза имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с протеазой, содержащей протеазный домен MTSP-1, который не является модифицированным.

[0298] Вариант осуществления II-51. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-16, причем сконструированная протеаза имеет повышенную биодоступность по сравнению с протеазой, содержащей протеазный домен MTSP-1, который не является модифицированным.

[0299] Вариант осуществления II-52. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-23, причем сконструированная протеаза имеет увеличенный период

полувыведения по сравнению с протеазой, содержащей протеазный домен uPA, который не является модифицированным.

[0300] Вариант осуществления П-53. Сконструированная протеаза по варианту осуществления П-23, причем сконструированная протеаза имеет повышенную биодоступность по сравнению с протеазой, содержащей протеазный домен uPA, который не является модифицированным.

[0301] Вариант осуществления П-54. Сконструированная протеаза по варианту осуществления П-30, причем сконструированная протеаза имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с протеазой, содержащей протеазный домен химазы, который не является модифицированным.

[0302] Вариант осуществления П-55. Сконструированная протеаза по варианту осуществления П-30, причем сконструированная протеаза имеет повышенную биодоступность по сравнению с протеазой, содержащей протеазный домен химазы, который не является модифицированным.

[0303] Вариант осуществления П-56. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с П-1 по П-55, причем сконструированная протеаза является неиммуногенной.

[0304] Вариант осуществления П-57. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с П-1 по П-56, причем сконструированная протеаза имеет форму зимогена.

[0305] Вариант осуществления П-58. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с П-1 по П-56, причем сконструированная протеаза находится в активной форме.

[0306] Вариант осуществления П-59. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с П-1 по П-58, причем сконструированная протеаза слита с компонентом, который увеличивает период полувыведения сконструированной протеазы.

[0307] Вариант осуществления П-60. Сконструированная протеаза по варианту осуществления П-59, причем компонент представляет собой Fc-домен.

[0308] Вариант осуществления II-61. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-59, причем компонент представляет собой сывороточный альбумин человека.

[0309] Вариант осуществления II-62. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-15, которая содержит модифицированный протеазный домен химазы с последовательностью, которая на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 6.

[0310] Вариант осуществления II-63. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-62, причем модифицированный протеазный домен химазы с SEQ ID NO: 6 содержит одну из мутационных строк из таблицы 7B.

[0311] Вариант осуществления II-64. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-15, которая содержит модифицированный протеазный домен сериновой протеазы 1 мембранного типа (MTSP-1) с последовательностью, которая на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 7.

[0312] Вариант осуществления II-65. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-64, причем модифицированный протеазный домен MTSP-1 с SEQ ID NO: 7 содержит одну из мутационных строк из таблицы 5B.

[0313] Вариант осуществления II-66. Сконструированная протеаза по любому из вариантов осуществления с II-1 по II-15, которая содержит модифицированный

протеазный домен активатора плазминогена урокиназного типа (uPA) с последовательностью, которая на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 22.

[0314] Вариант осуществления II-67. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-66, причем модифицированный протеазный домен uPA из SEQ ID NO: 22 содержит одну из мутационных строк из таблицы 3B.

[0315] Вариант осуществления II-68. Сконструированная протеаза по варианту осуществления II-1, которая содержит модифицированный протеазный домен родственной калликреину пептидазы 5 (KLK5) с последовательностью, которая на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 23.

[0316] Вариант осуществления II-69. Способ инактивации фактора В, включающий приведение фактора В в контакт с любой из сконструированных протеаз вариантов осуществления с II-1 по II-68.

[0317] Вариант осуществления II-70. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту любой из сконструированных протеаз вариантов осуществления с II-1 по II-68.

[0318] Вариант осуществления II-71. Способ по варианту осуществления II-70, в котором заболевание или состояние связано с нарушением регуляции комплемента.

- [0319]** Вариант осуществления II-72. Способ по любому из вариантов осуществления с II-70 по II-71, причем заболевание или состояние представляет собой воспалительное заболевание или состояние.
- [0320]** Вариант осуществления II-73. Способ по любому из вариантов осуществления с II-70 по II-72, причем лечение представляет собой заместительную терапию.
- [0321]** Вариант осуществления II-74. Способ по любому из вариантов осуществления с II-70 по II-73, причем лечение блокирует активацию комплемента.
- [0322]** Вариант осуществления II-75. Способ по любому из вариантов осуществления с II-70 по II-74, причем лечение модулирует аутоиммунную реакцию.
- [0323]** Вариант осуществления II-76. Способ по любому из вариантов осуществления с II-70 по II-75, причем заболевание или состояние представляет собой врожденную недостаточность комплемента.
- [0324]** Вариант осуществления II-77. Способ по любому из вариантов осуществления с II-70 по II-76, причем лечение предназначено для повреждения эндотелиальных или почечных клеток.
- [0325]** Вариант осуществления II-78. Способ по любому из вариантов осуществления с II-70 по II-77, причем заболевание или состояние выбрано из волчаночного нефрита, С3-гломерулопатии (С3-ГП), первичной IgA-нефропатии, ишемически-реперфузионного (I/R) поражения трансплантата почки, ассоциированного с антителами к цитоплазме нейтрофилов (АНЦА) васкулита (ААВ), сепсиса, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), заболевания, вызванного коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), атипичного гемолитико-уремического синдрома (аГУС), мембранозной нефропатии (МН) и пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ).
- [0326]** Вариант осуществления II-79. Способ по любому из вариантов осуществления с II-70 по II-78, причем заболевание или состояние представляет собой дефицит белка контроля.

[0327] Вариант осуществления II-80. Способ по любому из вариантов осуществления с II-70 по II-78, причем заболевание или состояние представляет собой вторичное расстройство комплемента.

[0328] Вариант осуществления II-81. Способ по любому из вариантов осуществления с II-70 по II-78, причем заболевание или состояние представляет собой связанное с иммунитетом заболевание или состояние.

[0329] Вариант осуществления II-82. Способ по любому из вариантов осуществления с II-70 по II-81, причем сконструированную протеазу вводят субъекту подкожно.

[0330] Вариант осуществления II-83. Способ по варианту осуществления II-82, причем сконструированная протеаза активируется *in situ* в месте нахождения компонента комплемента с нарушенной регуляцией.

[0331] Вариант осуществления II-84. Способ по из по любому из вариантов осуществления с II-70 по II-83, причем сконструированная протеаза представлена в жидком стабильном составе.

[0332] Вариант осуществления II-85. Фармацевтическая композиция, содержащая любую из сконструированных протеаз по вариантам осуществления с II-1 по II-68 и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

[0333] Вариант осуществления II-86. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления II-85, причем сконструированная протеаза представлена в жидком стабильном составе.

[0334] Вариант осуществления II-87. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления с II-85 по II-86, причем композиция приготовлена для подкожного введения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Экспрессия и очистка химотрипсиноподобных сериновых протеаз и их первоначальная характеристика

Экспрессия и очистка протеаз на основе MTSP-1 и uPA

[0335] Была проведена экспрессия и очистка в малом масштабе сконструированных протеаз на основе MTSP-1 и uPA. Если коротко, каждую из MTSP-1 и uPA экспрессировали в виде зимогена в бактерии-хозяине *E. coli*, штамм BL21-Gold (DE3), выделяли из телец включения, денатурировали, заново сворачивали путем быстрого разбавления, диализовали и затем активировали на колонке с иммобилизованным трипсином. Затем активный белок очищали на анионообменной колонке. Аналогичным образом также проводили повторное сворачивание и очистку MTSP-1 в большом масштабе. MTSP-1 и uPA солубилизировали, повторно сворачивали, очищали на анионообменной колонке. Затем из MTSP-1 и uPA удаляли эндотоксин.

Экспрессия и очистка протеаз на основе химазы

[0336] Проводили экспрессию и очистку химазы в малом масштабе. Если коротко, химазу экспрессировали в виде зимогена в тельцах включения в бактериальных клетках-хозяевах *E. coli* штамм BL21 Gold (DE3). Нерастворимую химазу выделяли из телец включения, денатурировали в присутствии восстанавливающего агента, повторно сворачивали путем быстрого разбавления и диализовали. Форму зимогена белка очищали с использованием 4 мл гранул Fast Flow SP, упакованных в колонки BioRAD под действием силы тяжести и активировали путем инкубации в течение ночи с энтерокиназой. Затем нативную химазу очищали от зимогена с использованием катионообменной хроматографии с использованием метода ступенчатого элюирования.

Расщепление фактора В с помощью сконструированных протеаз на основе химазы

[0337] Расщепление фактора В сконструированными протеазами на основе химазы тестировали и проверяли с помощью окрашенного кумасси геля. Если коротко, реакционную смесь для расщепления получали из 2,0 мкМ фактора В человека (Complement Technologies) в 20 мкл буфера (50 mM Tris pH 7,4/50 mM NaCl/0,01% Tween 20). Различные концентрации сконструированных протеаз на основе химазы

добавляли к фактору В (3000 нМ в максимуме, с разведением 1 : 2, 10 стадий, включая 0,0 нМ) и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. После расщепления 15 мкл реакционной смеси переносили в 96-луночный планшет с 1,5 мкл 0,2 н. НСL для остановки химазного расщепления. После гашения готовили реакционные смеси для ДСН-ПААГ-электрофореза. 20 мкл реакционных смесей наносили в лунку с 4–12% гелем Bis-Tris Criterion. Проводили денситометрический анализ расщепления фактора В и рассчитывали ЕС₅₀. На ФИГ. 1D показан окрашенный кумасси гель, демонстрирующий примеры расщепления фактора В с помощью протестированных сконструированных протеаз на основе химазы. В таблице 8А перечислены сконструированные протеазы на основе химазы, протестированные на ФИГ. 1D. Все ссылки на сконструированные протеазы в таблице представлены в химотрипсиновой нумерации. Расшифровку нумерации по химотрипсину для модифицированного протеазного домена химазы см. в таблице 6. Использовали две партии каждого набора сконструированных протеаз, и каждая партия показала способность сконструированных протеаз к расщеплению фактора В. Партия 1 каждого набора показала заметное количество зимогена, которое является нетитруемым, но возможно активируется или оказывает какую-то активность в отношении фактора В. Эти результаты также показывают, что сконструированная протеаза является высокоэффективной для расщепления фактора В. Протестированные сконструированные протеазы представлены ниже в таблице 8А.

[0338] На ФИГ. 1Е представлен график, на котором показаны примеры расщепления фактора В с помощью двух сконструированных протеаз на основе химазы, имеющих низкое значение ЕС₅₀, вычисленное по измерениям методом твердофазного ИФА. Все использованные в данном примере ссылки на сконструированные протеазы даны в химотрипсиновой нумерации. Расшифровку нумерации по химотрипсину для модифицированного протеазного домена химазы см. в таблице 6. Если коротко, реакционную смесь для расщепления получали из 2,0 мкМ фактора В человека (Complement Technologies) в 20 мкл буфера (50 мМ Tris pH 7,4/50 мМ NaCl/0,01% Tween 20). Использовали различные концентрации двух сконструированных протеаз на основе химазы: C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R и C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R. Каждая из них была обеспечена в концентрации 3000 нМ и разбавлялась 1 : 2 с получением концентраций 1500, 750, 375, 188, 94, 47, 23, 12, 6 и 3 нМ, а также использовали контроль с концентрацией 0,0 нМ. Каждую концентрацию добавляли к 2 мкМ фактора В и

инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. После расщепления 15 мкл реакционной смеси переносили в 96-луночный планшет с 1,5 мкл 0,2 н. HCL. После гашения реакционные смеси готовили для анализа на фактор В методом ИФА.

[0339] Строили стандартную кривую фактора В, используя концентрации 800, 533,3, 355,5, 237,0, 158,0, 105,3, 70,2, 46,8, 31,2, 20,8, 0,0 пМ в 1% BSA-PBST. 384-луночный планшет покрывали моноклональным антителом к фрагменту фактора Va человека (Quidel) в концентрации 2 мкг/мл в карбонатном буфере (25 мкл/лунка). После блокирования в течение 1 часа при комнатной температуре 1% BSA-PBST (100 мкл/лунка), гидролизаты (химаза + FB) разбавляли до 800 пМ, а стандарты разбавляли 1 : 1,5 от 800 пМ в блокирующем буфере (25 мкл/лунка). Планшет встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре.

[0340] Затем добавляли биотинилированное моноклональное антитело против фрагмента Vb фактора В человека (Quidel) в концентрации 0,125 мкг/мл для обнаружения связавшегося FB. Затем комплекс стрептавидин-HRP разбавляли 1 : 200 в блокирующем буфере (25 мкл/лунка) и планшет встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшет проявляли с помощью реагента ELISABright (50 мкл/лунка) в течение 1 минуты при комнатной температуре и считывали в сканере для планшетов EnVision. В таблице 8В ниже представлены значения EC₅₀, рассчитанные для двух сконструированных протеаз. На ФИГ. 1Е показано, что для 50% ингибирования фактора В требовалось 30–42 нМ тестируемых протеаз на основе химазы.

Таблица 8А. Сконструированные протеазы на основе химазы, протестированные на ФИГ. 1D

Обозначения на ФИГ. 1D	Мутация сконструированной протеазы
1	C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R
2	C22S/P38Q/K40M/F41R/L99M/F173Y/D175N/V213Q/S218V/A226R/F228A
3	C22S/P38Q/K40M/F41R/D175N/V213Q/S218V/A226R/F228A
4	C22S/P38Q/K40L/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175S/A190S/V213A/S218I/A226R

Таблица 8В. EC₅₀ для расщепления фактора В с помощью сконструированных протеаз на основе химазы

	C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R
EC ₅₀	42,47	30,22

Пример 2. Характеризация белка и титрование активного сайта сконструированных протеаз на основе химазы

[0341] Выбранные сконструированные протеазы на основе химазы проверяли, измеряя активности этих протеаз с использованием способа титрования активного сайта на основе реакции с ингибирующей серпиновой «приманкой», с последующим анализом ВЭЖХ для количественного определения активной фракции. Все использованные в данном примере, включая таблицу 9, ссылки на сконструированные протеазы даны в химотрипсиновой нумерации. Расшифровку нумерации по химотрипсину для модифицированного протеазного домена химазы см. в таблице 6. При анализе с помощью ВЭЖХ обнаруживают сдвиг в измеренном пике при наличии серпиновой «приманки», что указывает на то, что протеаза связывается с приманкой и, следовательно, является активной. Если коротко, рабочую концентрацию 24 мкМ серпиновой приманки готовили из маточного раствора, с 50 мкМ низкомолекулярного гепарина для приманок на основе антитромбина (АТ). Растворы протеазы готовили, используя 30 мкл рабочего раствора 5 мкМ. Реакционные смеси инкубировали в течение 2 часов при 37 °С и каждую реакцию смесь (только протеазу или протеазу с приманкой) анализировали с помощью ВЭЖХ с использованием стандартных протоколов. Сначала запускали все образцы с одной протеазой, а затем — образцы с протеазой и серпиновой приманкой. Сводное описание результатов для протестированных протеаз приведено в таблице 9 ниже. Значение k_{cat}/K_m измеряли с использованием EGVD/AE-QF (SEQ ID NO: 52) и измеряли константу скорости второго порядка K^*_{app} с использованием EGVD/AE-ACT (SEQ ID NO: 53). Эти результаты оценивали активность протеазы после очистки, и

большинство полученных проверенных сконструированных протеаз на основе химазы продемонстрировало активность в диапазоне 60%–120%.

Таблица 9. Сводная информация о титровании активного сайта сконструированных протеаз на основе химазы

Мутационная строка	k_{cat}/K_m EGVD/AE- QF (SEQ ID NO: 52)	k*_{app} EGVD/AE- ACT (SEQ ID N O: 53)
C22S		30,2
C22S/A226R	347	77
C22S/L99H/F173L/K192R/Y215H/R217T/S218V/A226R	86	341
C22S/L99H/F173I/K192R/Y215K/R217T/S218I/A226R	202	1041
C22S/L99H/F173L/K192R/Y215H/R217T/S218V/A226R	374	2412
C22S/F41I/L99W/G151L/F173K/R217S/A226R	380	1732
C22S/F41R/L99G/G151T/F173Y/Y215R/R217M/A226R	385	773
C22S/F41R/L99H/G151T/F173Y/Y215K/R217M/A226R	197	1495
C22S/F41R/L99Y/G151T/F173K/R217S/A226R	68	684
C22S/F41V/L99F/G151R/F173K/R217S/A226R	102	652
C22S/F41V/L99H/G151R/F173L/Y215R/R217T/A226R	363	1131
F41V/L99H/G151V/F173Y/Y215K/R217G/A226R	457	649
C22S/F41V/L99W/G151L/F173K/R217S/A226R	413	1359
C22S/K192R/A226R	243	147
C22S/L99R/F173L/K192R/Y215H/R217T/S218V/A226R	229	
C22S/L99Y/F173L/K192R/Y215H/R217T/S218V/A226R	224	
C22S/L99H/F173Y/K192R/S218L/A226R	449	
C22S/L99Y/F173Y/K192R/S218L/A226R	231	
C22S/K40L/F41A/K192R/A226R	60	
C22S/K40M/F41V/K192R/A226R	32	
C22S/K40M/F41V/G151R/K192R/A226R	31	
C22S/L99H/F173Y/K192R/Y215K/R217S/S218V/A226R	262	
C22S/L99F/F173K/K192R/R217S/S218I/A226R	86	
C22S/L99W/F173K/K192R/R217S/S218V/A226R	128	

Мутационная строка	kcat/Km EGVD/AE- QF (SEQ ID NO: 52)	k*_{app} EGVD/AE- ACT (SEQ ID N O: 53)
C22S/L99W/F173K/R217S/S218R/A226R	810	
C22S/L99Q/F173L/Y215K/R217T/S218L/A226R	55	
C22S/F41R/L99H/G151S/F173Y/Y215K/R217M/A226R	71	
C22S/F41I/L99H/G151K/F173Y/Y215K/R217G/A226R	89	
C22S/F41V/L99H/G151R/F173S/Y215K/A226R	53	
C22S/F41R/L99H/F173Y/Y215K/R217M/A226R	30	
C22S/F41K/L99H/G151A/F173Y/Y215K/R217S/A226R	355	
C22S/F41R/L99H/G151A/F173S/Y215K/R217T/A226R	52	
C22S/F173Y/D175N/A226R	2687	
C22S/K40L/F41R/L99N/F173Y/S218L/A226R	197	
C22S/K40L/F41H/L99N/F173Y/S218L/A226R	190	
C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/S218L/A226R	194	
C22S/K40L/F41R/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	793	
C22S/K40L/F41H/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	638	
C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	721	
C22S/K40M/F41R/L99Q/F173Y/D175R/S218V/A226R	157	
C22S/K40M/F41R/L99Q/F173Y/D175R/S218I/A226R	241	
C22S/P38Q/V138I/A190S/V213A/A226R	241	
C22S/P38Q/V213Q/A226R/F228A	1030	
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/D175N/V213Q/S218I/A226R /F228A	180	
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99M/F173Y/D175N/V213Q/S218 V/A226R/F228A	181	
C22S/P38Q/K40M/F41R/D175N/V213Q/S218V/A226R/F22 8A	198	
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213 A/S218V/A226R	1389	
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175S/A190S/ V213A/S218I/A226R	832	

Мутационная строка	kcat/Km EGVD/AE- QF (SEQ ID NO: 52)	k* _{app} EGVD/AE- ACT (SEQ ID N O: 53)
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99F/V138I/F173S/D175H/A190S/ V213A/S218V/A226R	95	
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175N/A190S/ V213A/S218V/A226R	863	
C22S/P38Q/K40A/F41K/L99H/V138I/D175S/A190S/V213A /S218V/A226R	608	
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175T/A190S /V213A/S218V/A226R	398	
C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213 A/S218V/A226R	1797	
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175N/A190S/ V213A/S218V/A226R	420	

Пример 3. Исследования стабильности сериновых протеаз с использованием расщепления фактора В и селекция сериновых протеаз

[0342] Оценивали расщепление фактора В различными сконструированными протеазами. Были протестированы сконструированные протеазы на основе химазы, MTSP-1 и uPA. Все использованные в данном примере, включая таблицы 10А, 10В, 11А и 11В, ссылки на сконструированные протеазы даны в химотрипсиновой нумерации. Расшифровка нумерации по химотрипсину для модифицированных протеазных доменов сконструированных протеаз представлена в таблицах 2, 4 и 6 для uPA, MTSP-1 и химазы соответственно. Эти эксперименты также проводились для оценки стабильности не встречающихся в природе химаз в различных средах, включая стекловидное тело яванского макака, плазму крови человека и фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Если коротко, фактор В разбавляли в буфере для анализа и инкубировали при 37 °С с встречающимся в природе (дикого типа) и не встречающимся в природе (сконструированными) протеазами в жидкости стекловидного тела, плазме или PBS, и реакционные смеси гасили HCl в различные моменты времени. Временные точки, протестированные в случае химазы, включают T = 0, где использовали 6 часов

предварительной инкубации, $T = 2$ часа, где использовали 4 часа предварительной инкубации, $T = 4$ часа, где использовали 2 часа предварительной инкубации, и $T = 6$ часов, где использовали 0 часов предварительной инкубации. Анализ образца проводили с помощью твердофазного ИФА или альфа-скрининга на расщепление человеческого С3 с использованием стандартных протоколов.

[0343] Сводные данные результатов представлены ниже в таблицах 10А–10В, в которых показаны различные протестированные протеазы, используемая концентрация протеазы в нМ и EC_{50} расщепления фактора В человека. В таблице 10 показано расщепление человеческого фактора В различными не встречающимися в природе сконструированными протеазами на основе химазы, протестированными в 80% плазме крови человека, в сравнении с химазой, содержащей мутационную строку С122S. Пустые ячейки указывают на то, что испытание для конкретной мутационной строки протеазы не проводили. Эти результаты по существу показывают, что выбранные сконструированные протеазы на основе химазы, такие как C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R и C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R, демонстрируют высокую активность расщепления фактора В.

[0344] Таблица 10В показывает расщепление фактора В человека различными сконструированными протеазами на основе химазы, MTSP-1 или uPA, тестируемыми в плазме крови мыши или человека. Для анализа расщепления фактора В методом твердофазного ИФА, если коротко, применяли антитело к Va, а Vb обнаруживали с помощью антитела к Vb. Применяли динамический диапазон 25–1600 пМ. Также рассчитывали период полувыведения из 50% плазмы крови человека для различных сконструированных протеаз на основе химазы.

[0345] Эти результаты показали, что протеазы, сконструированные из каркаса на основе uPA, не демонстрировали эффективного расщепления фактора В, а протеазы, сконструированные из каркаса на основе MTSP-1, демонстрировали расщепление фактора В, но только у двух кандидатов со значениями ниже 50 нМ. Протеазы, сконструированные из каркаса на основе химазы, показали наиболее эффективное расщепление фактора В со значениями EC_{50} ниже 50 нМ.

Таблица 10А. Значения EC₅₀ для расщепления фактора В у сконструированных протеаз на основе химазы

Мутационная строка	Расщепление FB, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 80% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% A ₂ M-депл. плазма, EC ₅₀ (нМ)	t _{1/2} в 50% плазме крови человека (мин) (EGVD'АЕ) (SEQ ID NO: 13)
C22S	265	10 200	7885	1519	
C22S/A226R	5205	нет			
C22S/L99H/F173L/K192R/Y215H/R217T/S218V/A226R	7770				
C22S/L99H/F173I/K192R/Y215K/R217T/S218I/A226R	5618				
C22S/L99H/F173L/K192R/Y215H/R217T/S218V/A226R	2738				
C22S/F41I/L99W/G151L/F173K/R217S/A226R	1741				
C22S/F41R/L99G/G151T/F173Y/Y215R/R217M/A226R	4329				
C22S/F41R/L99H/G151T/F173Y/Y215K/R217M/A226R	1690				
C22S/F41R/L99Y/G151T/F173K/R217S/A226R	3447				
C22S/F41V/L99F/G151R/F173K/R217S/A226R	3646				
C22S/F41V/L99H/G151R/F173L/Y215R/R217T/A226R	8060				
F41V/L99H/G151V/F173Y/Y215K/R217G/A226R	7770				
C22S/F41V/L99W/G151L/F173K/R217S/A226R	1944				
C22S/K192R/A226R	6367				17,3
C22S/L99R/F173L/K192R/Y215H/R217T/S218V/A226R	7770	7590*	4380	2290	20,9
C22S/L99Y/F173L/K192R/Y215H/R217T/S218V/A226R	4880–6304		12 406	4575	10,1
C22S/L99H/F173Y/K192R/S218L/A226R	1147				
C22S/L99R/F173Y/K192R/S218L/A226R	555				
C22S/L99Y/F173Y/K192R/S218L/A226R	1020				

Мутационная строка	Расщепление FB, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 80% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% A ₂ M-депл. плазма, EC ₅₀ (нМ)	t _{1/2} в 50% плазме крови человека (мин) (EGVD'A E) (SEQ ID NO: 13)
C22S/K40L/F41A/K192R/A226R	7390				
C22S/K40L/F41G/K192R/A226R	1020–8540				
C22S/K40M/F41V/K192R/A226R	7770				
C22S/K40M/F41V/G151R/K192R/A226R	7770				
C22S/K40L/F41V/G151R/K192R/A226R	7500				
C22S/L99H/F173Y/K192R/Y215K/R217S/S218V/A226R	3456				
C22S/L99F/F173K/K192R/R217S/S218I/A226R	4001				
C22S/L99W/F173K/K192R/R217S/S218V/A226R	2492				
C22S/L99W/F173K/R217S/S218R/A226R	2663				
C22S/L99Q/F173L/Y215K/R217T/S218L/A226R	(слабое)				
C22S/F41R/L99H/G151S/F173Y/Y215K/R217M/A226R	3387–2730				
C22S/F41I/L99H/G151K/F173Y/Y215K/R217G/A226R	7770				
C22S/F41V/L99H/G151R/F173S/Y215K/A226R	4781				
C22S/F41R/L99H/F173Y/Y215K/R217M/A226R	6518–5390				
C22S/F41K/L99H/G151A/F173Y/Y215K/R217S/A226R	1313	18 600	5692	5752	
C22S/F41R/L99H/G151A/F173S/Y215K/R217T/A226R	2250		3402	2879	
C22S/F41L/L99H/G151T/F173Y/Y215K/A226R	3230				
C22S/F41R/L99H/G151T/F173Y/Y215K/A226R	3220				
C22S/F41G/L99H/G151T/F173Y/Y215K/A226R	6600				
C22S/F41R/L99H/F173Y/Y215K/A226R	4800				

Мутационная строка	Расщепление FB, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 80% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% A ₂ M-депл. плазма, EC ₅₀ (нМ)	t _{1/2} в 50% плазме крови человека (мин) (EGVD'АЕ) (SEQ ID NO: 13)
C22S/F41V/L99H/F173Y/Y215K/A226R	6060				
C22S/F41G/L99H/F173Y/Y215K/A226R	6650				
C22S/F41R/L99H/G151T/F173L/Y215K/A226R	4800				
C22S/F41V/L99H/G151T/F173L/Y215K/A226R	5420				
C22S/F41G/L99H/G151T/F173L/Y215K/A226R	11 500				
C22S/F41R/L99H/F173L/Y215K/A226R	6640				
C22S/F41V/L99H/G151T/F173Y/Y215K/A226R	5330				
C22S/F41L/L99H/F173Y/Y215K/A226R	3450				
C22S/F41L/L99H/G151T/F173L/Y215K/A226R	4170				
C22S/F41L/L99H/F173L/Y215K/A226R	7890				
C22S/F41V/L99H/F173L/Y215K/A226R	8730				
C22S/F41G/L99H/F173L/Y215K/A226R	10 200				
C22S/L99R/K192R/S218L/A226R	7510				
C22S/L99R/F173Y/S218L/A226R	546				11,1
C22S/L99R/F173Y/K192R/A226R	3278				
C22S/K93Q/G119D/F173S/K192R/A226R	7770				
C22S/P38Q/H100P/L116R/F123L/Q180H/S218I/A226R/R235S	868–1120				29
E21G/C22S/R61H/M135T/F173Y/D175N/A209V/A226R	1275–1050				23
C22S/K111E/F173L/Y215H/A226R	9008				
C22S/F173L/Y215H/A226R	5991				

Мутационная строка	Расщепление FB, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 80% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% A ₂ M-депл. плазма, EC ₅₀ (нМ)	t _{1/2} в 50% плазме крови человека (мин) (EGVD'АЕ) (SEQ ID NO: 13)
C22S/M135T/P150S/S152G/Q166H/D175N/A190T/A226R	3163				
E21G/C22S/R61H/M135T/F173Y/D175N/A209V/A226R	1260				
C22S/P38Q/H100P/L116R/F123L/Q180H/A226R/R235S	3737				
C22S/V138I/L160V/S189T/A226R	7132				
C22S/V138L/A226R	3483				
C22S/V138L/A226R	3483				
C22S/L160V/S189T/A226R	6636				
C22S/S189T/A226R	7984				
C22S/S218I/A226R	830				7,8
C22S/F173Y/A226R	650	21 000			5,9
C22S/D175N/A226R	564	7770			6,2
C22S/F173Y/D175N/A226R	151–182–177	11 200	5999–5616	1647	7,3, 9,0
C22S/A220S/A226R	5563				
C22S/S189T/A190S/F191S/A220L/A226R	8141				
C22S/K40L/F41R/L99N/F173Y/S218L/A226R	379	15 568			22,7
C22S/K40M/F41R/L99H/G151P/F173S/S218V/A226R	1503–1910				
C22S/K40M/F41R/L99H/G151A/F173S/S218V/A226R	3221–4710				
C22S/K40M/F41I/L99H/G151R/F173S/S218L/A226R	8202				
C22S/K40M/F41R/L99N/G151S/F173Y/S218L/A226R	320–445	11 193			10,9
C22S/K40M/F41R/L99N/G151P/F173S/S218V/A226R	2575–3010				
C22S/K40M/F41R/L99H/G151P/F173S/S218I/A226R	1864–2100				
C22S/K40L/F41H/L99N/F173Y/S218L/A226R	284–530	13 903			28,9
C22S/K40M/F41V/L99N/G151R/F173S/S218V/A226R					

Мутационная строка	Расщепление FB, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 80% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% A ₂ M-депл. плазма, EC ₅₀ (нМ)	t _{1/2} в 50% плазме крови человека (мин) (EGVD'АЕ) (SEQ ID NO: 13)
C22S/K40L/F41L/L99N/G151H/F173Y/S218V/A226R	304–746	17 076			20,4
C22S/K40L/F41K/L99H/G151S/F173Y/S218L/A226R	276–369	17 234			20,1
C22S/K40L/F41K/L99H/F173Y/S218L/A226R	228–394	14 813			13,9
C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/S218L/A226R	405–373	13 979			28,9
C22S/K40M/F41V/L99N/G151R/F173S/S218E/A226R	11 824				
C22S/A190S/A226R	407				4,2
C22S/S189T/A190S/A226R	605	нет			
C22S/K40L/F41R/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	119	4092; 3756			23,7
C22S/K40L/F41H/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	139	5066			24,9
C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	61–129	5697			27
C22S/P38Q/V138I/V183I/L199V/A226R/F228V	нет				
C22S/V138T/A190S/V213A/A226R	6708				
C22S/P38Q/V138L/A190G/L199V/V213A/A226R/F228A	нет				
C22S/P38Q/V138I/A226R/F228A	12 395				
C22S/F41K/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	77				30
C22S/K40L/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	113				11,4
C22S/K40L/F41K/F173Y/D175N/S218L/A226R	77				10,3
C22S/K40L/F41K/L99N/D175N/S218L/A226R	295				13,8
C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/D175N/A226R	151				15,1
C22S/V138A/G145D/S189T/A190S/A226R	3813				
C22S/A226R/F228A	5072				

Мутационная строка	Расщепление FB, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 80% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% A ₂ M-депл. плазма, EC ₅₀ (нМ)	t _{1/2} в 50% плазме крови человека (мин) (EGVD'АЕ) (SEQ ID NO: 13)
C22S/V138A/S189T/A226R/F228M	1772				
C22S/V138L/S189T/A190G/A226R	4160				
C22S/V138S/S189T/A226R/F228M	2985				
C22S/S189T/A226R/F228M	1553				
C22S/V138A/A226R	2942				
C22S/V138A/S189T/A226R	4420				
C22S/K40M/F41R/L99N/F173Y/D175S/S218L/A226R	230	5137			29,6
C22S/K40M/F41R/L99H/F173Y/D175W/S218L/A226R	181	7213			11,2
C22S/K40M/F41K/F173Y/D175R/S218E/A226R	203	4130			38,8
C22S/K40M/F41K/L99N/F173Y/D175R/S218T/A226R	216	4128			16,9
C22S/K40L/F41K/L99Q/F173Y/D175N/S218V/A226R	110	5672			15,6
C22S/K40M/F41R/L99Q/F173Y/D175R/S218V/A226R	235	4069			73,7
C22S/K40L/F41K/L99H/F173Y/D175S/S218I/A226R	101	4621			11,5
C22S/K40L/F41R/L99G/F173Y/D175R/S218V/A226R	333	8625			24,9
C22S/K40L/F41R/L99H/F173Y/D175Y/S218I/A226R	84	5561			10,4
C22S/K40M/F41R/L99Q/F173Y/D175R/S218I/A226R	213	4481			65,3
C22S/P38Q/V138I/A190S/V213A/A226R	1348,4				
C22S/P38Q/V213Q/A226R/F228A	6210,6				
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/F173Y/D175Y/V213Q/S218V/A226R/F228A	768,8				
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/D175N/V213Q/S218I/A226R/F228A	552,9				

Мутационная строка	Расщепление FB, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 80% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% A ₂ M-депл. плазма, EC ₅₀ (нМ)	t _{1/2} в 50% плазме крови человека (мин) (EGVD'A E) (SEQ ID NO: 13)
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99M/F173Y/D175N/V213Q/S218V/A226R/F228A	787,5				
C22S/P38Q/K40M/F41R/D175N/V213Q/S218V/A226R/F228A	931,5				
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	36,3				
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175S/A190S/V213A/S218I/A226R	60,3				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99F/V138I/F173S/D175H/A190S/V213A/S218V/A226R	625–796,6				
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	71,8				
C22S/P38Q/K40A/F41K/L99H/V138I/D175S/A190S/V213A/S218V/A226R	142,3				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175T/A190S/V213A/S218V/A226R	92,1				
C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R	28,1				
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	65,3				
C22S/P38Q/K40A/F41R/V138I/D175R/A190S/V213A/S218T/A226R	261,7				
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/A190S/V213A/S218V/A226R	405,5				
C22S/P38Q/K40M/F41H/L99N/V138I/F173Y/D175S/A190S/V213A/S218T/A226R	561				

Мутационная строка	Расщепление FB, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 80% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% A ₂ M-депл. плазма, EC ₅₀ (нМ)	t _{1/2} в 50% плазме крови человека (мин) (EGVD'A E) (SEQ ID NO: 13)
C22S/P38Q/K40M/F41K/L99Y/V138I/F173M/D175Y/A190S/V213A/S218V/A226R	448,1				
C22S/P38Q/K40A/F41R/V138I/F173S/D175T/A190S/V213A/S218V/A226R	1720,7				
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173L/D175H/A190S/V213A/S218V/A226R	314,2				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99N/V138I/D175N/A190S/V213A/S218T/A226R	448,9				
C22S/P38Q/K40M/F41H/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R	47,6				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Q/V138I/F173Y/D175A/A190S/V213A/S218T/A226R	723,6				
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/D175R/A190S/V213A/S218L/A226R	190,7				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99F/V138I/F173L/D175N/A190S/V213A/A226R	870,1				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Y/V138I/F173L/D175S/A190S/V213A/S218V/A226R	814,2				
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	114,5				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Y/V138I/F173Y/D175S/A190S/V213A/S218V/A226R	102,7				
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173M/D175N/A190S/V213A/S218L/A226R	456,4				
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175T/A190S/V213A/S218V/A226R	57,6				

Мутационная строка	Расщепление FB, EC₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 80% плазма, EC₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% плазма, EC₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% A₂M-депл. плазма, EC₅₀ (нМ)	t_{1/2} в 50% плазме крови человека (мин) (EGVD'А Е) (SEQ ID NO: 13)
C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173L/D175N/A190S/V213A/S218L/A226R	481,7				
C22S/P38Q/K40L/F41K/L99N/V138I/F173Y/D175S/A190S/V213A/S218I/A226R	143,5				
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99Y/V138I/F173L/D175R/A190S/V213A/S218L/A226R	510,7				
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99Q/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	102,5				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Q/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	157,3				
C22S/P38Q/K40V/F41R/V138I/F173L/D175R/A190S/V213A/S218I/A226R	169				
C22S/P38Q/K40M/F41T/V138I/D175R/A190S/V213A/S218I/A226R	218,4				
C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173L/D175K/A190S/V213A/S218V/A226R	349,5				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Y/V138I/F173S/D175S/A190S/V213A/S218T/A226R	10 564,6				
C22S/P38Q/K40A/F41T/L99Y/V138I/F173S/D175H/A190S/V213A/S218I/A226R	3125,4				
C22S/P38Q/K40A/F41R/V138I/F173L/D175R/A190S/V213A/S218L/A226R	282,9				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Y/V138I/F173L/D175Q/A190S/V213A/S218T/A226R	1650,6				
C22S/P38Q/K40A/F41Q/V138I/F173S/D175W/A190S/V213A/S218V/A226R	2187,2				

Мутационная строка	Расщепление FB, EC₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 80% плазма, EC₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% плазма, EC₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% A₂M-депл. плазма, EC₅₀ (нМ)	t_{1/2} в 50% плазме крови человека (мин) (EGVD'АЕ) (SEQ ID NO: 13)
C22S/P38Q/K40M/F41H/V138I/D175S/A190S/V213A/A226R	1060,4				
C22S/P38Q/K40V/F41R/V138I/F173L/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	279,1				
C22S/P38Q/K40V/F41R/L99H/V138I/F173M/D175N/A190S/V213A/S218T/A226R	638,9				
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173L/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R	112,9				
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99M/V138I/F173L/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R	212,8				
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173M/D175T/A190S/V213A/S218I/A226R	882				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99Y/V138I/F173L/D175S/A190S/V213A/S218T/A226R	1225,5				
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218I/A226R	92,9				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99W/V138I/F173M/D175H/A190S/V213A/S218T/A226R	414,5				
C22S/P38Q/K40M/F41H/L99H/V138I/D175S/A190S/V213A/S218V/A226R	277,4				
C22S/P38Q/K40V/F41R/V138I/F173S/D175N/A190S/V213A/S218I/A226R	716,7				
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99F/V138I/F173L/D175N/A190S/V213A/A226R	631,2				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99H/V138I/D175Q/A190S/V213A/S218V/A226R	300,8				

Мутационная строка	Расщепление FB, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 80% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% A ₂ M-депл. плазма, EC ₅₀ (нМ)	t _{1/2} в 50% плазме крови человека (мин) (EGVD'A E) (SEQ ID NO: 13)
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175H/A190S/V213A/S218T/A226R	121,2				
C22S/P38Q/K40M/F41K/L99W/V138I/F173M/A190S/V213A/S218N/A226R	956,5				
C22S/P38Q/K40Q/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	100,2				
C22S/P38Q/K40I/F41R/L99N/V138I/D175T/A190S/V213A/S218V/A226R	202,9				
C22S/P38Q/K40Q/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175S/A190S/V213A/S218V/A226R	149,9				
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218L/A226R	138,6				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175F/A190S/V213A/S218V/A226R	193				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175W/A190S/V213A/S218T/A226R	500				
C22S/P38Q/K40L/F41R/L99Y/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	57				
C22S/P38Q/K40M/F41R/L99S/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	472				
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/D175N/A190S/V213A/S218I/A226R	170				
C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173S/D175Y/A190S/V213A/S218V/A226R	287				
C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173L/D175R/A190S/V213A/S218T/A226R	51				

Мутационная строка	Расщепление FB, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 80% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% плазма, EC ₅₀ (нМ)	Расщепление FB, 64% A ₂ M-депл. плазма, EC ₅₀ (нМ)	t _{1/2} в 50% плазме крови человека (мин) (EGVD'A E) (SEQ ID NO: 13)
C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218T/A226R	223				
C22S/P38Q/K40A/F41K/L99N/V138I/D175H/A190S/V213A/S218V/A226R	121				
C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173Y/D175Y/A190S/V213A/S218I/A226R	465				

Таблица 10В. Анализы EC₅₀ для расщепления фактора В сконструированными протеазами на основе MTSP-1, uPA и химазы

Каркас	Мутационная строка	расщепление фактора В чел. (ИФА) EC ₅₀ (нМ)		
		n	Средн. значение	± CO
uPA	V38D/A96E/D97G/C122S/Y172L/A98G/H99M/T97a_L97bdel	1	нет расщепления при 1,2 мкМ	
uPA	V38D/C122S/T97a_L97bdel	1	нет расщепления при 3 мкМ	
uPA	V38D/A96G/D97E/A98G/H99V/C122S/T97a_L97bdel	1	нет расщепления при 0,95 мкМ	
uPA	C122S/V38D/A96N/D97A/A98G/H99V/T97a_L97bdel	1	нет расщепления при 1 мкМ	
uPA	V38D/C122S/D97L/A98G/H99V/T97a_L97bdel	1	нет расщепления при 0,95 мкМ	
uPA	V38D/C122S/A96E/D97R/A98G/H99V/T97a_L97bdel	1	нет расщепления при 3 мкМ	

<i>Каркас</i>	<i>Мутационная строка</i>	расщепление фактора В чел. (ИФА) EC ₅₀ (нМ)		
		<i>n</i>	<i>Средн. значение</i>	$\pm CO$
uPA	V38D/C122S/A96E/D97H/A98G/H99 L/T97a_L97bdel	1	нет расщепления при 1,05 мкМ	
uPA	V38D/A96E/D97E/C122S/A98G/H99 A/T97a_L97bdel	1	нет расщепления при 0,75 мкМ	
uPA	V38D/C122S/A96D/D97G/A98G/H99 A/T97a_L97bdel	1	нет расщепления при 1,1 мкМ	
uPA	V38D/D97A/C122S/A98G/H99L/T97 a_L97bdel	2	6560,0	8145, 9
uPA	V38D/C122S/A96D/D97W/A98N/H9 9L/T97a_L97bdel	1	3720,0	
uPA	V38D/C122S/A96D/D97T/A98G/H99 M/T97a_L97bdel	1	7860,0	
uPA	V38D/A98G/H99A/C122S/T97a_L97 bdel	1	нет расщепления при 0,8 мкМ	
uPA	V38D/A98G/H99A/C122S/L97bdel	1	нет расщепления при 1,6 мкМ	
uPA	V38D/A98G/H99L/C122S/T97a_L97 bdel	1	нет расщепления при 0,55 мкМ	

[0346] Кроме того, различные сконструированные протеазы на основе химазы были протестированы для оценки их исходной стабильности путем оценки влияния непрямого буфера и буфера MTSP (+/- EDTA) на сконструированные протеазы на основе химазы. В экспериментах использовали пептидный субстрат EGVDAE-QF (SEQ ID NO: 52).

[0347] На ФИГ. 4А–4Е представлены графики, на которых показана стабильность пяти различных протеаз на основе химазы, протестированных с использованием пептидного субстрата, в PBS, при 37 °С. В таблице 11А приведены сводные данные, представленные на ФИГ. 4А–4Е, и перечислены протестированные сконструированные протеазы.

Таблица 11А. Активность сконструированных протеаз на основе химазы, протестированных на пептидном субстрате

Фигура	Мутация сконструированной протеазы	Доля остаточной активности						
		0 ч	2 ч	4 ч	6 ч	24 ч	72 ч (день 3)	168 ч (день 7)
ФИГ. 4А	C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	1,00	0,96	0,91	0,86	0,92	0,85	0,67
ФИГ. 4В	C22S/P38Q/V138I/A190S/V213A/A226R	1,00	0,96	0,91	0,86	0,92	0,85	0,67
ФИГ. 4С	C22S/P38Q/V138I/A190S/V213A/A226R	1,00	1,02	1,01	1,02	1,01	1,02	0,85
ФИГ. 4D	C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	1,00	0,97	0,99	0,95	0,92	0,91	0,77
ФИГ. 4Е	C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R	1,00	0,94	0,92	0,82	0,67	0,60	0,47

[0348] Как показано, эти протеазы были более стабильными в непрямом буфере с pH 7,4. Химаза дикого типа, встречающаяся в природе, показала потерю активности во всех буферах, и EDTA не оказывает заметного влияния на стабильность.

[0349] Затем измеряли константу скорости второго порядка (k^*) для ингибирования различных не встречающихся в природе протеаз на основе химазы в плазме для экстраполяции периода полувыведения из 100% плазмы. Если коротко, использовали исходную химазу, имеющую модификации C22S/A226R. Использовали концентрацию исходной химазы и тестируемых протеаз на основе химазы, перечисленных ниже в таблице 11В, равную 50 нМ, а другую протестированную химазу C22S/L99R/F173Y/K192R/S218L/A226R использовали в концентрации 25 нМ. Для исходной химазы измеряли время протеазной активности в присутствии плазмы, используя 4,2 мкМ CPQ2-ITLLSA-K(5FAM)-K-PEG8-K(биотин)-NH₂ (SEQ ID NO: 17)/21 мкМ нейтравидина при 37 °С. Сводная информация по результатам представлена в таблице 11В ниже.

Таблица 11В. Константа скорости второго порядка и рассчитанное $t_{1/2}$

Мутационная строка	k^* ($\%^{-1}c^{-1}$)	рассчитанное $t_{1/2}$ (с) (в 100% плазме)
C22S/A226R	7,32E-5	95
C22S/L99R/F173Y/K192R/S218L/A226R	6,24E-5	111
C22S/L99Y/F173Y/K192R/S218L/A226R	3,71E-5	187

Пример 4. Анализ на гемолиз с возвратным добавлением фактора В

[0350] Анализы гемолиза проводили для оценки гемолитической активности различных партий фактора В, и партию, полученную от компании ComrTech, по сравнению с партией, полученной самостоятельно. Если коротко, использовали обедненную фактором В человеческую сыворотку, и для возвратного добавления использовали очищенную плазму или рекомбинантный человеческий фактор В. Эритроциты (эр.) кролика или эр. курицы промывали в GVB/Mg/EGTA, и в обедненную сыворотку добавляли фактор В. Затем отслеживали лизис эр. с помощью CVF/FD/человеческой конвертазы фактора В. По результатам анализа получали стандартные кривые, по которым сравнивали партии фактора В. На ФИГ. 5–6 показана гистограмма контролей, используемых для анализа на гемолиз, и стандартные кривые, полученные по протестированному сконструированному протеазам в анализе на гемолиз с возвратным добавлением фактора В, соответственно. В таблице 12 ниже представлена сводка данных для сконструированных протеаз на основе MTSP-1 и uPA. На ФИГ. 6 также показано, что сконструированная на основе MTSP-1 протеаза F97E/K224N/F99L/D217I/C122S/C[17]S/C[19]S способна ингибировать гемолиз. Эта сконструированная протеаза была протестирована в двух концентрациях (образцы 1 и 2). Все использованные в данном примере ссылки на сконструированные протеазы даны в химотрипсиновой нумерации. Расшифровка нумерации по химотрипсину для модифицированных протеазных доменов сконструированных протеаз представлена в таблицах 2, 4 и 6 для uPA, MTSP-1 и химазы соответственно.

Таблица 12. Сводные данные по гемолизу при возвратном добавлении фактора В

Каркас	Мутационная строка	$[Протеаза]_{выс}$ окая (нМ)	Возвратное добавление FB человека, EC ₅₀ (нМ)
MTSP-1	C122S	4000	480,4
		4000	304,0
		4000	916,7
MTSP-1		4000	37,3
		400	32,2
MTSP-1	I41G/F97D/F99L/C122S	4000	266,9
		4000	108,6
		4000	333,9
MTSP-1	A77aT/F94Y/C122S/D125G	4000	65,9
		4000	125,3
MTSP-1	I41A/F97D/F99L/C122S	4000	282,9
MTSP-1	I41G/F97D/F99L/C122S/Y146D/C[17]S/C[19]S	4000	282,9
		4000	394,7
MTSP-1	I41G/F97E/F99L/C122S/C[17]S/C[19]S	4000	362,5
		4000	357,5
		4000	292,5
MTSP-1	I41N/F97D/F99L/C122S/C[17]S/C[19]S	4000	222,8
MTSP-1	F97L/T98G/F99V/C122S/C[17]S/C[19]S/- null_D96insD	4000	4593,0
		4000	3493,0

Пример 5. Анализ с расщеплением пептидов (k_{cat}/K_m)

[0351] Анализы с расщеплением пептидов проводили для оценки соотношения k_{cat}/K_m для различных сконструированных протеаз по настоящему изобретению на основе MTSP-1, uPA или химазы. Все использованные в данном примере ссылки на сконструированные протеазы даны в химотрипсиновой нумерации. Расшифровка нумерации по химотрипсину для модифицированных протеазных доменов сконструированных протеаз представлена в таблицах 2, 4 и 6 для uPA, MTSP-1 и химазы соответственно. Расщепление различных субстратов оценивали и определяли k_{cat}/K_m для протеазной активности. Если коротко, значения k_{cat}/K_m определяли по наклонам линейной части графика зависимости V_o от концентрации субстрата. Как правило, использовали следующие условия: концентрация протеазы 50 нМ, концентрация субстрата максимум 20 мкМ и 1,5-кратные последовательные разведения, и температура 30 °С. Для расчетов использовали полуавтоматизированный протокол кинетики Михаэлиса — Ментен с использованием измерений в четырех повторностях.

[0352] Для сконструированных протеаз на основе химазы использовали следующие пептидные субстраты с гашением флуоресценции (QF): TQ2-KDVFYQMKK-Lys(5FAM)-NH₂ (SEQ ID NO: 29) и TQ2-KDVFYQMKK-Lys(5FAM) (SEQ ID NO: 30). Для сконструированных протеаз на основе MTSP-1 и uPA использовали следующие пептидные субстраты: 5FAM-EQQKRKIVL-K(QXL520)-NH₂ (SEQ ID NO: 31), CPQ2-PEQQKR-K(5FAM)-NH₂ (SEQ ID NO: 32), TQ2-GEQQKRKIVL-Lys(5FAM)-NH₂ (SEQ ID NO: 33), Ac-QQKR-ACC (SEQ ID NO: 34). В таблице 13А ниже представлены различные субстраты, использованные для тестирования протеазной активности в определенных последовательностях сайтов расщепления, а в таблице 13В ниже представлено для субстрата EGVDAE QF (SEQ ID NO: 52) значение k_{cat}/K_m (M⁻¹s⁻¹) различных протестированных протеаз.

Таблица 13А. Пептидные субстраты для различных последовательностей сайтов расщепления

Аминокислотная последовательность сайта расщепления	Применяемые пептидные субстраты
EGVD (SEQ ID NO: 35)	Ac-EGVD-ACC (SEQ ID NO: 39)
	CPQ2-EGVDAE-K(5FAM)-K-NH ₂ (SEQ ID NO: 40)
	Биотин-GGGLSSLTETIEGVDAE-K(TAMARA)-NH ₂ (SEQ ID NO: 41)
	CPQ2-EGVDAE-K(5FAM)-K-PEG8-K(Biotin)-NH ₂ (SEQ ID NO: 42)
QQKR (SEQ ID NO: 36)	CPQ2-PEQQKR-K(5FAM)-NH ₂ (SEQ ID NO: 32)
	TQ2-GEQQKRKIVL-Lys(5FAM)-NH ₂ (SEQ ID NO: 33)
	Ac-QQKR-ACC (SEQ ID NO: 34)
	5FAM-EQQKRKIVL-K(QXL520)-NH ₂ (SEQ ID NO: 31)
DVFY (SEQ ID NO: 37)	TQ2-KDVFYQMKK-Lys(5FAM)-NH ₂ (SEQ ID NO: 29)
	TQ2-KDVFYQMKK-Lys(5FAM) (SEQ ID NO: 30)
	Ac-WEHR-ACC (SEQ ID NO: 43)
KNQKR (SEQ ID NO: 38)	Ac-KNQK-ACC-TFA-соль (SEQ ID NO: 44)
	TQ2-KNQKRQKQ-Lys(5FAM)-NH ₂ (SEQ ID NO: 45)
	Ac-KNQK-ACC (SEQ ID NO: 46)
	WSHPQFEKKNQKRQKQ-K(5FAM)-NH ₂ (SEQ ID NO: 47)

Таблица 13В. Значения k_{cat}/K_M для сконструированных протеаз на основе химазы, измеренные с применением EGVDAE-QF (SEQ ID NO: 52)

Мутация	EGVDAE QF (SEQ ID NO: 52) k_{cat}/K_M ($M^{-1}c^{-1}$)
C22S/F173Y/D175N/A226R	2665
C22S/K40L/F41R/L99N/F173Y/S218L/A226R	197
C22S/K40L/F41H/L99N/F173Y/S218L/A226R	190
C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/S218L/A226R	194
C22S/K40L/F41R/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	793
C22S/K40L/F41H/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	638
C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	721

[0353] Результаты анализов с расщеплением пептидов представлены ниже в таблицах 14А–14В.

Таблица 14А. Данные анализа с расщеплением пептидов для каркаса на основе uPA

Каркас	Мутационная строка (нумерация по химопр.)	Специфическая активность (мкМ субстрата/мин/мкМ фермента)			k_{cat}/K_M ($M^{-1}c^{-1}$) (AGR-ACC)			k_{cat}/K_M ($M^{-1}c^{-1}$) (GLAR-ACC) (SEQ ID NO: 49)		
		QQKR-ACC (SEQ ID NO: 48)			n	Средн. значение	$\pm CO$	n	Средн. значение	$\pm CO$
uPA	C122S	0,0			4	9,68E+04	1,37E+03	8	6,86E+03	1,60E+03
uPA	H99L/C122S							4	3,15E+04	4,81E+03
uPA	H99P/C122S							2	2,19E+05	8,64E+03
uPA	G18E/R36S/V38D/C122S/V159A	0,0						2	1,75E+03	6,06E+01
uPA	H99D/C122S							2	1,31E+03	6,45E+01
uPA	H99N/C122S	0,2						1	5,38E+03	
uPA	H99C/C122S	0,5								
uPA	C122S/R217V	0,1						1	6,81E+03	

Каркас	Мутационная строка (нумерация по химопр.)	Специфическая активность (мкМ субстрата/мин/мкМ фермента)			k_{cat}/K_M ($M^{-1}c^{-1}$) (AGR-ACC)			k_{cat}/K_M ($M^{-1}c^{-1}$) (GLAR-ACC) (SEQ ID NO: 49)		
		QQKR-ACC (SEQ ID NO: 48)			n	Средн. значение	$\pm CO$	n	Средн. значение	$\pm CO$
uPA	R36H/S37dP/ V38D/C122S/ A184T							2	5,49E+02	1,42E+01
uPA	V38D/C122S/ T97a_L97bdel				1	6,95E+03		1	4,90E+04	
uPA	V38D/A96G/D 97E/A98G/H9 9V/C122S/T97 a_L97bdel				1	5,27E+03		1	3,05E+04	
uPA	C122S/V38D/ A96N/D97A/A 98G/H99V/T9 7a_L97bdel				1	9,16E+03		1	3,12E+04	
uPA	V38D/C122S/ D97L/A98G/H 99V/T97a_L97 bdel				1	5,77E+03		1	2,54E+04	
uPA	V38D/C122S/ A96E/D97R/A 98G/H99V/T9 7a_L97bdel				1	1,32E+04		1	1,79E+04	
uPA	V38D/C122S/ A96E/D97H/A 98G/H99L/T97 a_L97bdel				1	5,05E+04		1	4,21E+05	
uPA	V38D/A96E/D 97E/C122S/A9 8G/H99A/T97 a_L97bdel				1	1,04E+04		1	8,53E+03	
uPA	V38D/C122S/ A96D/D97G/A 98G/H99A/T9 7a_L97bdel				1	1,53E+04		1	8,49E+03	
uPA	V38D/D97A/C 122S/A98G/H 99L/T97a_L97 bdel				1	7,60E+04		1	5,31E+05	
uPA	V38D/C122S/ A96D/D97W/ A98N/H99L/T 97a_L97bdel				1	3,86E+04		1	2,52E+05	

Каркас	Мутационная строка (нумерация по химопр.)	Специфическая активность (мкМ субстрата/мин/мкМ фермента)			k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) (AGR-ACC)			k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) (GLAR-ACC) (SEQ ID NO: 49)		
		QQKR-ACC (SEQ ID NO: 48)	<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$	<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$		
uPA	V38D/C122S/ A96D/D97T/A 98G/H99M/T9 7a_L97bdel				1	4,79E+ 04		1	2,08E+ 05	

Таблица 14А. Продолжение. Данные анализа с расщеплением пептидов для каркаса на основе uPA

Каркас	Мутационная строка (нумерация по химопр.)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$) (QQKR-ACC) (SEQ ID NO: 48)		
		<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$
uPA	C122S	5	1,67E+02	3,05E+01
uPA	H99L/C122S	2	3,24E+03	7,27E+01
uPA	H99P/C122S	2	6,18E+03	3,05E+02
uPA	G18E/R36S/V38D/C122S/V159A	0		
uPA	H99D/C122S	2	6,00E+02	2,83E+01
uPA	H99N/C122S	1	3,68E+02	
uPA	H99C/C122S	2	2,30E+03	4,47E+02
uPA	C122S/R217V	2	8,42E+02	2,10E+02
uPA	R36H/S37dP/V38D/C122S/A184T	0		
uPA	V38D/A96E/D97G/C122S/Y172L/A98G/H99M/T97a_L9 7bdel	1	7,50E+03	
uPA	V38D/C122S/T97a_L97bdel	1	9,14E+03	
uPA	V38D/A96G/D97E/A98G/H99V/C122S/T97a_L97bdel	2	6,86E+04	8,34E+03
uPA	C122S/V38D/A96N/D97A/A98G/H99V/T97a_L97bdel	2	7,61E+04	3,87E+03
uPA	V38D/C122S/D97L/A98G/H99V/T97a_L97bdel	2	3,64E+04	5,64E+03
uPA	V38D/C122S/A96E/D97R/A98G/H99V/T97a_L97bdel	2	5,51E+04	5,48E+03

<i>Каркас</i>	<i>Мутационная строка (нумерация по химотр.)</i>	<i>k_{cat}/K_m (M⁻¹s⁻¹) (QQR-ACC) (SEQ ID NO: 48)</i>		
		<i>n</i>	<i>Средн. значение</i>	<i>± CO</i>
uPA	V38D/C122S/A96E/D97H/A98G/H99L/T97a_L97bdel	2	1,42E+05	3,50E+04
uPA	V38D/A96E/D97E/C122S/A98G/H99A/T97a_L97bdel	2	4,43E+04	2,65E+03
uPA	V38D/C122S/A96D/D97G/A98G/H99A/T97a_L97bdel	2	9,24E+04	2,03E+03
uPA	V38D/D97A/C122S/A98G/H99L/T97a_L97bdel	2	7,19E+04	2,26E+04
uPA	V38D/C122S/A96D/D97W/A98N/H99L/T97a_L97bdel	2	2,05E+05	5,39E+03
uPA	V38D/C122S/A96D/D97T/A98G/H99M/T97a_L97bdel	2	7,28E+04	1,47E+04
uPA	V38D/D97E/L97bV/A98G/H99V/C122S/A96_H99del	1	1,39E+04	
uPA	V38D/A96G/D97A/H99E/C122S/L97b_H99del	1	6,05E+02	
uPA	V38D/C122S/A96_H99delinsPGVE	1	6,74E+02	
uPA	V38D/C122S/L97b_H99del/D97delinsEG	1	1,39E+04	
uPA	V38D/T97aS/L97bV/A98T/H99E/C122S/A96_H99del	1	1,11E+03	
uPA	V38D/C122S/A96del/A98_H99del/-nulldelinsLK	1	2,77E+04	
uPA	V38D/A96G/D97E/A98G/H99E/C122S/T97a_H99del	1	5,74E+02	
uPA	V38D/C122S/A96del/A98_H99del/-nulldelinsRS	1	2,71E+04	
uPA	V38D/D97E/C122S/-null_H99delinsSPG	1	4,31E+03	
uPA	Y40H/C122S	0		
uPA	V38D/A98G/H99A/C122S/T97a_L97bdel	1	5,99E+04	
uPA	V38D/A98G/H99A/C122S/L97bdel	1	3,44E+03	
uPA	V38D/A98G/H99L/C122S/T97a_L97bdel	1	8,81E+04	

Таблица 14А. Продолжение. Данные анализа с расщеплением пептидов для каркаса на основе uPA

<i>Каркас</i>	<i>Мутационная строка (нумерация по химотр.)</i>	<i>k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (QQKR/KI-QF) (SEQ ID NO: 50)</i>		
		<i>n</i>	<i>Средн. значение</i>	<i>± CO</i>
uPA	C122S	0		
uPA	H99L/C122S	0		
uPA	H99P/C122S	0		
uPA	H99D/C122S	0		
uPA	V38D/A96E/D97G/C122S/Y172L/A98G/H99M/T97a_L97bdel	0		
uPA	V38D/C122S/T97a_L97bdel	0		
uPA	C122S/V38D/A96N/D97A/A98G/H99V/T97a_L97bdel	1	5,16E+02	
uPA	V38D/C122S/D97L/A98G/H99V/T97a_L97bdel	0		
uPA	V38D/C122S/A96E/D97R/A98G/H99V/T97a_L97bdel	1	4,73E+02	
uPA	V38D/C122S/A96E/D97H/A98G/H99L/T97a_L97bdel	1	1,45E+03	
uPA	V38D/A96E/D97E/C122S/A98G/H99A/T97a_L97bdel	0		
uPA	V38D/C122S/A96D/D97G/A98G/H99A/T97a_L97bdel	1	2,77E+02	
uPA	V38D/D97A/C122S/A98G/H99L/T97a_L97bdel	1	6,57E+02	
uPA	V38D/C122S/A96D/D97W/A98N/H99L/T97a_L97bdel	1	3,09E+03	
uPA	V38D/C122S/A96D/D97T/A98G/H99M/T97a_L97bdel	1	9,75E+02	
uPA	V38D/C122S/A96del/A98_H99del/-nulldelinsLK			

Таблица 14В. Данные анализа с расщеплением пептидов для каркаса на основе MTSP-1 и каркаса на основе химазы

<i>Каркас</i>	<i>Мутационная строка (нумерация по химотр.)</i>	Специфическая активность (мкМ субстрата/мин/мкМ фермента)			k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (QHRR-ACC) (SEQ ID NO: 51)		
		QQKR-ACC (SEQ ID NO: 48)			<i>n</i>	<i>Средн. значение</i>	\pm <i>CO</i>
MTSP	C122S	2,6			1	3,39E+03	
MTSP	I41G/F97D/F99L/C122S				1	1,07E+06	
MTSP	A77aT/F94Y/C122S/D125G				1	4,08E+04	
MTSP	I41A/F97D/F99L/C122S				1	5,35E+05	
MTSP	I41S/F97D/F99V/C122S/Y146D/C[17]S/C[19]S				1	1,06E+05	
MTSP	I41G/F97D/F99L/C122S/Y146D/C[17]S/C[19]S				1	6,87E+05	
MTSP	I41G/F97E/F99L/C122S/C[17]S/C[19]S				1	7,72E+05	
MTSP	I41N/F97D/F99L/C122S/C[17]S/C[19]S				1	8,05E+05	
MTSP	I41A/F97D/F99V/C122S/Y146D/Q175T/C[17]S/C[19]S				1	5,03E+04	
MTSP	I41G/F97D/F99M/C122S/C[17]S/C[19]S				1	2,41E, +05	
MTSP	F97L/T98G/F99V/C122S/C[17]S/C[19]S/-null_D96insD				1	2,62E+04	

Таблица 14В. Продолжение. Данные анализа с расщеплением пептидов для каркаса на основе MTSP-1 и каркаса на основе химазы

Каркас	Мутационная строка (нумерация по химопр.)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (QQKR-ACC) (SEQ ID NO: 48)			k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (RQAR-ACC) (SEQ ID NO: 54)			k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (ангиотензиноген-QF)		
		<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$	<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$	<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$
MTSP	C122S	9	2,28E+04	1,28E+04	7	3,89E+06	8,69E+05			
MTSP	F97E/K224N/F99L/D217I/C122S/C[17]S/C[19]S	2	1,49E+06	4,24E+05	1	2,31E+07				
MTSP	C[17]S/C[19]S/F97E/F99L/C122S/Q175L/Q192M/D217I/K224R	2	1,15E+06	2,05E+05	1	2,36E+07				
MTSP	C[17]S/C[19]S/F97M/F99L/C122S/Q175W/D217I/K224A	1	2,90E+06		1	3,72E+07				
MTSP	I41G/F97D/F99L/C122S	1	1,23E+05		1	4,91E+06				
MTSP	A77aT/F94Y/C122S/D125G	1	1,14E+05		1	4,27E+06				
MTSP	I41A/F97D/F99L/C122S	1	9,48E+04		1	3,92E+06				
MTSP	I41S/F97D/F99V/C122S/Y146D/C[17]S/C[19]S	1	5,13E+04		1	3,85E+05				
MTSP	I41G/F97D/F99L/C122S/Y146D/C[17]S/C[19]S	1	5,05E+04		1	2,66E+06				
MTSP	I41G/F97E/F99L/C122S/C[17]S/C[19]S	1	1,08E+05		1	3,50E+06				

Каркас	Мутационная строка (нумерация по химопр.)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (QQR-ACC) (SEQ ID NO: 48)			k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (RQR-ACC) (SEQ ID NO: 54)			k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (ангиотензиноген-QF)		
		<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$	<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$	<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$
MTSP	I41N/F97D/F99L/C 122S/C[17]S/C[19]S	1	1,24E+05		1	2,39E+06				
MTSP	I41A/F97D/F99V/C 122S/Y146D/Q175T /C[17]S/C[19]S	1	3,79E+04		1	1,97E+05				
MTSP	I41G/F97D/F99M/C 122S/C[17]S/C[19]S	1	3,45E+04		1	1,28E+06				
MTSP	F97L/T98G/F99V/C 122S/C[17]S/C[19]S /-null_D96insD	1	1,08E+04		1	2,17E+04				
MTSP	C122S/C[17]S/C[19]S /S/-null_T98insA	1	1,17E+04		3	3,38E+05	1,47E+04			
MTSP	C122S/C[17]S/C[19]S /S/-null_T98insAA	1	1,92E+03		3	5,27E+05	3,26E+05			
MTSP	C[17]S/C[19]S/I41Q /F97T/F99L/C122S/ Y146D/Q175W	2	4,96E+05	3,20E+04	1	1,85E+07				
MTSP	C[17]S/C[19]S/I41F /F97D/F99I/C122S/ Y146D/Q175S/D21 7T	2	1,19E+05	1,19E+05	1	8,78E+06				
MTSP	C[17]S/C[19]S/I41R /F97D/F99N/C122S/ Y146D/D217V/K22 4Q	2	1,64E+04	8,81E+03	1	1,11E+05				
MTSP	C[17]S/C[19]S/I41R /F97E/F99N/C122S/ Y146D/D217Y/K22 4M	2	1,70E+04	8,13E+03	1	1,76E+05				

Каркас	Мутационная строка (нумерация по химопр.)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (QQR-ACC) (SEQ ID NO: 48)			k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (RQAR-ACC) (SEQ ID NO: 54)			k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (ангиотензиноген-QF)		
		<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$	<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$	<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$
MTSP	C[17]S/C[19]S/I41G /F97E/F99L/C122S/ R161G/D217Y/K22 4Q	2	3,61E+0 4	2,62E+0 4	1	1,05E+0 7				
MTSP	C[17]S/C[19]S/I41R /F97D/F99H/C122S/ Y146D/Q175P/Q19 2M/D217F/K224L	1	2,09E+0 3		1	6,67E+0 3				
MTSP	C[17]S/C[19]S/I41R /F97E/F99S/C122S/ Y146D/Q175R/D21 7I/K224M	2	1,33E+0 4	1,11E+0 4	1	4,45E+0 4				
MTSP	C[17]S/C[19]S/I41K /F97D/F99Y/C122S	2	5,62E+0 2	1,98E+0 1	1	7,04E+0 4				
MTSP	I41K/F97D/F99H/C 122S/C[17]S/C[19]S	2	5,49E+0 2	1,27E+0 2	1	7,71E+0 3				
MTSP	F94Y/F99L/C122S/ G197A/C[17]S/C[19] JS	1	6,73E+0 5		1	4,58E+0 6				
MTSP	F99L/C122S/L172M /G197A/C[17]S/C[19] 9JS	1	1,72E+0 5		1	9,70E+0 6				
MTSP	D23Y/L70Q/F99L/K 110I/C122S/V183A/ A204V/C[17]S/C[19] JS	1	4,91E+0 5		1	1,12E+0 7				
MTSP	F94Y/C122S/C[17]S /C[19]S	2	2,23E+0 5	4,54E+0 3	1	7,10E+0 6				

Каркас	Мутационная строка (нумерация по химопр.)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (QQKR-ACC) (SEQ ID NO: 48)			k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (RQAR-ACC) (SEQ ID NO: 54)			k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (ангиотензиноген-QF)		
		<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$	<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$	<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$
химаза	C22S							2	1,69E+05	1,14E+03
химаза	C22S/L99G							1	1,73E+04	
химаза	C22S/F173L							1	1,29E+05	
химаза	C22S/L99G/F173L							1	1,17E+04	

Таблица 14В. Продолжение. Данные анализа с расщеплением пептидов для каркаса на основе MTSP-1 и каркаса на основе химазы

Каркас	Мутационная строка (нумерация по химопр.)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (DVFY/QM-QF) (SEQ ID NO: 55)			k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) (NVFY/QM-QF) (SEQ ID NO: 56)		
		<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$	<i>n</i>	Средн. значение	$\pm CO$
химаза	C22S	2	1,79E+05	4,99E+03	3	1,22E+05	5,17E+04
химаза	C22S/L99G	1	4,93E+05		1	7,20E+05	
химаза	C22S/F173L	1	1,34E+05		1	1,32E+05	
химаза	C22S/L99G/F173L	1	3,59E+05		1	7,78E+05	

Пример 6. Испытания сконструированных протеаз на ингибирование

[0354] Испытания на ингибирование проводили с использованием сконструированных протеаз на основе химазы. Для проверки возможности адекватного ингибирования сконструированных протеаз на основе химазы использовали различные серпины, способные ингибировать активность протеаз, что позволяло выбирать устойчивую к ингибированию в плазме сконструированную протеазу. Сводные данные испытаний на ингибирование приведены ниже в таблице 15. Все использованные в данном примере

ссылки на сконструированные протеазы даны в химотрипсиновой нумерации.

Расшифровка нумерации по химотрипсину для модифицированных протеазных доменов сконструированных протеаз представлена в таблицах 2, 4 и 6 для uPA, MTSP-1 и химазы соответственно.

Таблица 15. Сводные данные по ингибированию серпином

Мутационная строка	Ингибитор в плазме	$k_{app}(M^{-1}s^{-1})$
C22S	Антихимотрипсин (ACT) в плазме	31 166
C22S/A226R	альфа-2-макроглобин (A ₂ M)	812
	ACT	1045
C22S/F41I/L99W/G151L/F173K/R217S/A226R	A ₂ M–YESD/VM	530–37
C22S/F41V/L99W/G151L/F173K/R217S/A226R	A ₂ M	329
C22S/L99H/F173Y/K192R/S218L/A226R	A ₂ M	356
C22S/L99Y/F173Y/K192R/S218L/A226R	A ₂ M	3127
C22S/F173Y/D175N/A226R	A ₂ M	645
	ACT	428
C22S/K40L/F41R/L99N/F173Y/S218L/A226R	ACT в плазме	190
C22S/K40M/F41R/L99N/G151S/F173Y/S218L/A226R	ACT в плазме	317
C22S/K40L/F41H/L99N/F173Y/S218L/A226R	ACT в плазме	193
C22S/K40L/F41L/L99N/G151H/F173Y/S218V/A226R	ACT в плазме	252
C22S/K40L/F41K/L99H/G151S/F173Y/S218L/A226R	ACT в плазме	139
C22S/K40L/F41K/L99H/F173Y/S218L/A226R	ACT в плазме	147
C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/S218L/A226R	ACT в плазме	197
C22S/A190S/A226R	ACT в плазме	1599
C22S/S189T/A190S/A226R	ACT в плазме	935
C22S/K40L/F41R/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	ACT в плазме	37
C22S/K40L/F41H/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	ACT в плазме	40
C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	ACT в плазме	28
C22S/P38Q/V138I/V183I/L199V/A226R/F228V	ACT в плазме	269
C22S/K40M/F41R/L99Q/F173Y/D175R/S218I/A226R	46 мин (изобрет.)	

Пример 6. Расщепление фактора В и активность протеазы KLK5

[0355] На ФИГ. 7А представлен график, демонстрирующий ингибирование гемолиза при помощи KLK5 и сравнение со сконструированной протеазой на основе химазы C22S/F173Y/D175N/A226R. Все использованные в данном примере ссылки на сконструированные протеазы даны в химотрипсиновой нумерации. Расшифровка нумерации по химотрипсину для модифицированных протеазных доменов

сконструированных протеаз представлена в таблицах 2, 4 и 6 для uPA, MTSP-1 и химазы соответственно. Если коротко, реакционную смесь для расщепления получали из 4,0 мкМ фактора В человека (Complement Technologies) в 20 мкл буфера (50 мМ Tris pH 7,4/50 мМ NaCl/0,01% Tween 20). Различные концентрации протеазы KLK5 или сконструированной на основе химазы протеазы C22S/F173Y/D175N/A226R (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78 и 0,39 с контролем при 0,0 нМ) добавляли к 4 мкМ фактора В и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. После расщепления оценивали 6 мкл реакционной смеси в анализе на гемолиз.

[0356] Реакционные смеси для расщепления фактора В разбавляли в 20 мкл GVB (Complement Technologies), 10 мМ MgCl₂ и 8 мМ EGTA (GVB/Mg/EGTA). Затем добавляли 45 мкл сыворотки с пониженным содержанием человеческого фактора В (Complement Technologies) к 5 мкл расщепленного фактора В человека с получением конечного объема 90% сыворотки. Параллельно 50 мкл эритроцитов кролика (Colorado Serum Co.) разводили до 950 мкл при помощи GVB/Mg/EGTA и осторожно перемешивали. После центрифугирования при 2000 об/мин в течение 5 минут при 4 °С клетки кролика ресуспендировали в 1 мл GVB/Mg/EGTA. Затем промытые клетки кролика инкубировали со смесью расщепленного фактора В и сыворотки в буфере GVB/Mg/EGTA с получением 15% конечной концентрации сыворотки и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С при встряхивании. Затем реакционную смесь центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 минут и 100 мкл супернатанта переносили в прозрачный плоскодонный 96-луночный планшет. Поглощение планшета считывали при 415 нм спектрофотометром и вычисляли EC₅₀. Результаты анализа на гемолиз представлены на ФИГ. 7А, где видно, что протеаза KLK5 была эффективной для ингибирования гемолиза.

[0357] На ФИГ. 7В представлен график, демонстрирующий расщепление фактора В при помощи KLK5 и сконструированной протеазы на основе химазы C22S/F173Y/D175N/A226R. Если коротко, реакционную смесь для расщепления получали из 4,0 мкМ человеческого фактора В (Complement Technologies) в 20 мкл буфера (50 мМ Tris pH 7,4/50 мМ NaCl/0,01% Tween 20). Различные концентрации KLK5 (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78 и 0,39 с контролем при 0,0 нМ) добавляли к 4 мкМ фактора В и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. После расщепления 15 мкл реакционной смеси переносят в 96-луночный планшет с 1,5 мкл 0,2 н. HCL. После

гашения реакционные смеси готовили для анализа на фактор В методом твердофазного ИФА.

[0358] Строят стандартную кривую фактора В, используя концентрации 800, 533,3, 355,5, 237,0, 158,0, 105,3, 70,2, 46,8, 31,2, 20,8, 0,0 пМ в 1% BSA-PBST. 384-луночный планшет покрывали моноклональным антителом к человеческому фактору Va (№ A225, Quidel) в концентрации 2 мкг/мл в карбонатном буфере (25 мкл/лунка). После блокирования в течение 1 часа при комнатной температуре 1% BSA-PBST (100 мкл/лунка), гидролизаты (химаза + фактор В) разбавляли до 800 пМ, а стандарты разбавляли 1 : 1,5 от 800 пМ в блокирующем буфере (25 мкл/лунка). Планшет встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре.

[0359] Затем добавляли биотинилированное моноклональное антитело к человеческому фактору Vb (Quidel) с концентрацией 0,125 мкг/мл для обнаружения связанного фактора В. Затем комплекс стрептавидин-HRP разбавляли 1 : 200 в блокирующем буфере (25 мкл/лунка) и планшет встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшет проявляли с помощью реагента ELISABright (50 мкл/лунка) в течение 1 минуты при комнатной температуре и считывали в сканере для планшетов EnVision. На ФИГ. 7В показаны два независимых эксперимента с различными маточными растворами KLK5. Эти результаты показывают, что протеаза KLK5 была эффективной в отношении расщепления фактора В с сопоставимой активностью в различных используемых концентрациях.

[0360] Расщепление фактора В при помощи KLK5 также оценивали с помощью окрашенного кумасси геля. На ФИГ. 8А–8В показаны окрашенные кумасси гели, демонстрирующие примеры расщепления фактора В при помощи KLK5 и сконструированной протеазы на основе химазы C22S/F173Y/D175N/A226R. Если коротко, реакционную смесь для расщепления получали из 4,0 мкМ фактора В человека (Complement Technologies) в 20 мкл буфера (50 мМ Tris pH 7,4/50 мМ NaCl/0,01% Tween 20). Различные концентрации KLK5 или сконструированной протеазы на основе химазы C22S/F173Y/D175N/A226R (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78 и 0,39 с контролем при 0,0 нМ) добавляли к 4 мкМ фактора В и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. После расщепления 15 мкл реакционной смеси переносили в 96-луночный планшет с 1,5 мкл 0,2 н. HCL. После гашения готовили реакционные смеси для геля ДСН-

ПААГ. 20 мкл реакционных смесей наносили в лунку с 4–12% гелем Bis-Tris Criterion. Проводили денситометрический анализ расщепления фактора В и рассчитывали EC₅₀.

[0361] На ФИГ. 9 представлены данные масс-спектрометрии (МС), идентифицирующие сайт расщепления ²³⁴Arg в пределах сайта расщепления QQKR/KIV (SEQ ID NO: 9) фактора В с помощью KLK5 и идентифицирующие сайт расщепления ²²¹Asp в пределах сайта расщепления EGVDAE (SEQ ID NO: 13) фактора В сконструированной протеазой на основе химазы C22S/A226R. Если коротко, фактор В человека (Comptech) инкубировали в концентрации 2 мкМ с различными концентрациями калликреина 5 (KLK5, R&D Systems) или со сконструированной протеазой на основе химазы C22S/A226R в концентрации 10 нМ или 100 пМ в течение от 10 минут до 1 часа при 37 °С в 20 мМ буфере Tris с pH 8 с водой типа 16-О или 18-О. Реакционную смесь гасили при помощи 20 мкМ ингибитора FFR-СМК в течение 30 минут при комнатной температуре. Половину образца дополнительно обрабатывали реактивом Rapidgest/химотрипсином и доводили до pH 3 добавлением 1 мл 1% TFA. Затем добавляли ТСЕР (конечная концентрация 100 мМ) для восстановления дисульфидов в течение 30 минут при 37 °С. 12 мл каждого образца связали с наконечником Ziptip (Millipore) и элюировали 15 мл 80% ACN и 0,1% TFA. После сушки в Speedvac образцы повторно растворяли в 4 мл смеси 30% ACN и 0,05% TFA. В 0,35 мл образца загружали 0,45 мл матрикса СНСА (10 мг/мл) на планшете OptiPlate и анализировали с помощью MALDI-MS (ABI 4700) как в линейном (m/z 2–22k), так и в рефлексном (m/z 1500–5400) режимах. Тандемную МС проводили на интересующих пептидах, когда это было возможно. Были обнаружены два крупных пептидных фрагмента ~33 и 59 кДа. Таким образом, 100 пМ KLK5 производит расщепление в 1 из 38 Arg в течение 10-минутной реакции и в 4 из 38 Arg в течение 60-минутной реакции (Arg175, Arg193, Arg730 и Arg739). При концентрации 10 нМ отщепление обнаруживали в 18 из 38 Arg в течение 10- и 60-минутных реакций (Arg50, Arg74, Arg94, Arg175, Arg182, Arg193, Arg202, Arg203, Arg259, Arg381, Arg415, Arg658, Arg679, Arg708, Arg710, Arg730, Arg739). Самое раннее событие расщепления происходило в Arg730.

[0362] Реконструированные ионные хроматограммы, показанные на ФИГ. 9, относятся к продуктам реакции калликреина 5 («KLK»), сконструированной протеазы на основе химазы C22S/A226R («на основе химазы») и фактора В из плазмы («контрольный Fb»). Эти хроматограммы показывают, что сконструированная протеаза на основе химазы

C22S/A226R расщепляет фактор В в остатке ²²¹Asp, причем пик на 3,8 минуты, соответствует интактной химазе, пик на 4,73 минуты соответствует интактному фактору В (739 остатков с четырьмя А2-гликанами, MW 91802) и пик на 4,63 минуты соответствует расщеплению в ²²¹Asp в виде остатков 222–739, содержащих два А2-гликана (MW 62827). Напротив, KLK5 расщепляет фактор В в остатке ²³⁴Arg (пик на 4,69 минуты, MW 61437). В этом образце не присутствовал остаточный интактный фактор В (верхняя линия).

Пример 7. Активация комплемента и высвобождение цитокинов, измеренные в мышинной модели острого респираторного дистресс-синдрома

[0363] На ФИГ. 10 представлена схема, изображающая общий способ измерения активации комплемента и высвобождения цитокинов из тканей на мышинной модели острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) при лечении сконструированной протеазой на основе химазы. Все использованные в данном примере ссылки на сконструированные протеазы даны в химотрипсиновой нумерации. Расшифровка нумерации по химотрипсину для модифицированных протеазных доменов сконструированных протеаз представлена в таблицах 2, 4 и 6 для uPA, MTSP-1 и химазы соответственно. Если коротко, мыши получали инъекции сконструированной протеазы на основе химазы C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R, и измеряли легочную функцию, а после умерщвления — жидкость бронхоальвеолярного лаважа. На ФИГ. 10 сконструированная протеаза обозначена как «протеаза».

[0364] После периода адаптации каждое животное взвешивали и случайным образом распределяли в группу лечения на основе массы тела. В день 0 (0 часов) мышей анестезировали и вводили одну интратрахеальную (ИТ) инстилляцию липополисахарида (ЛПС, Sigma) в дозе 50 мкг на мышшь. Контрольные мыши получали инстилляцию стерильного 0,9% физраствора (50 мкл). У всех животных контролировали общее состояние здоровья и массу тела в ходе развития заболевания. Респираторные функции измеряли с помощью плетизмографии всего тела (ПВТ) на находящихся в сознании мышцах через 0, 6, 24 и 48 часов после ИТ-инстилляции ЛПС. Через 3 (три) часа после ИТ-инстилляции ЛПС мыши получали внутривенную (в/в) инъекцию сконструированной протеазы на основе химазы

C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R в дозе 5 мг/кг или 6,5 мг/кг, а контрольные животные получали в/в инъекцию носителя (PBS).

Подгруппа мышей получала вторую в/в инъекцию сконструированной протеазы на основе

химазы C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R в дозе 5 мг/кг или 6,5 мг/кг, через 27 часов после ИТ-инстилляций ЛПС (т. е. через 24 часов после первой в/в инъекции). Мышей умерщвляли через 24 и 48 часов после ИТ-инстилляций ЛПС. Для получения плазмы кровь отбирали путем лицевого прокола под анестезией и собирали в микроконтейнерные пробирки с K₂EDTA. После центрифугирования при 2000 × g в течение 10 минут при 4 °C плазму аликвотировали (60 мкл) и хранили при -80 °C для последующего анализа на цитокины и комплемент.

[0365] Затем проводили трахеотомию для открытия легких. Трахею соединяли с канюлей, пережимали левое легкое, и вводили 0,9 мл холодного раствора PBS 1X, ингибитор протеазы 1X (SigmaFAST®) (3 × 300 мкл) для получения жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF) из правой доли легких. Первую аликвоту (300 мкл) сохраняли для подсчета общего количества клеток BALF с дифференциальным подсчетом клеток. Каждую из двух других аликвот по 60 мкл сохраняли при -80 °C для будущего анализа комплемента и цитокинов. Правое легкое немедленно подвергали быстрой заморозке и хранили при -80 °C для анализа комплемента и цитокинов в гомогенате легкого. Легкое гомогенизировали в 1 × PBS + 0,1% Triton X-100 с коктейлем ингибиторов протеаз с получением гомогената 20 мг/100 мкл и центрифугировали при 2520 × g в течение 15 минут при 4 °C. Затем супернатант обрабатывали для анализа на цитокины.

[0366] Через три часа после инъекции сконструированной протеазы на основе химазы C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R плетизмографические измерения показали значительное снижение значений PenH, что указывает на улучшение функции легких. Однако этот эффект не сохранялся с течением времени (измерения через 24 часа и 48 часов). Через 48 часов после введения ЛПС животные, получавшие 2 дозы сконструированной протеазы на основе химазы C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R в дозе 5–6,5 мг/кг, показали значительное улучшение массы тела, что позволяет предположить, что указанная сконструированная протеаза снижает тяжесть симптомов ОРДС. При умерщвлении через 48 часов после введения ЛПС животные, получавшие 2 дозы сконструированной протеазы на основе химазы 5–6,5 мг/кг, показали тенденцию к снижению соотношения нейтрофилов к лимфоцитам в BALF, что указывает на уменьшение воспалительных инфильтратов сконструированной протеазой на основе химазы C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R. Эти

результаты представлены на ФИГ. 11А–11С. На ФИГ. 11А показан индекс застоя в легких, определяемый значением PenH. На ФИГ. 11В показана потеря массы тела, измеренная у испытуемых животных. На ФИГ. 11С показано соотношение нейтрофилов к лимфоцитам (NLR) в BALF, измеренное у испытуемых животных. Приведенные данные представляют собой среднее +/- SEM, а значения *р указывают < 0,05 при использовании Т-критерия Стьюдента. Эти результаты показывают, что сконструированная протеаза на основе химазы C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R эффективно улучшает дыхательную функцию в мышинной модели ОРДС. На ФИГ. 11А–11С эта сконструированная протеаза обозначена как «протеаза».

[0367] На ФИГ. 12А–12D представлены результаты измерения цитокинов BALF и легком мышинной ткани после лечения сконструированной протеазой на основе химазы C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R. На ФИГ. 12А–12D эта сконструированная протеаза обозначена как «протеаза». Если коротко, ткани BALF и легкого собирали аналогично описанному выше, через 24 часа после однократного введения сконструированной протеазы на основе химазы C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R внутривенно в дозе 5 мг/кг через 3 часа после инстилляций ЛПС. Ткани обрабатывали для количественного определения цитокинов/хемокинов с использованием матрицы мышинных цитокинов/матрицы мышинных хемокинов 31-Plex (MD31), измеряя Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-гамма, IL-1альфа, IL-1бета, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1альфа, MIP-1бета, MIP-2, RANTES, TNF-альфа и VEGF (Eve Technologies) Образцы центрифугировали перед аликвотированием и разбавляли в 2 раза, после чего выполняли анализ в соответствии с протоколом Eve Technology. IL-2, IL-6 и CXCL9 значительно снижаются в бронхоальвеолярном лаваже (BALF) мыши, а IL-6 значительно снижается в тканях легких, что указывает на более низкое воспаление в легких, и может привести к последующему снижению хемоаттракции воспалительных клеток в ткань легких. Значения представляют собой среднее +/- SEM и *р < 0,05, **р < 0,01 с использованием критерия Стьюдента. Эти результаты показывают, что данная сконструированная протеаза эффективно снижает воспалительные цитокины IL-2 и IL-6 и хемокин CXCL9 в мышинной модели ОРДС.

Пример 8. Оценка активности и характеристика экспрессированной в клетках млекопитающих сконструированной протеазы на основе химазы

[0368] Оценивали способность зимогена сконструированной протеазы на основе химазы (C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218I/A226R) (таблица 7B) (продуцированной в культуральной системе млекопитающих, очищенной и активированной) расщеплять CFB. Все использованные в данном примере ссылки на сконструированные протеазы даны в химотрипсиновой нумерации. Расшифровка нумерации по химотрипсину для модифицированных протеазных доменов сконструированных протеаз представлена в таблицах 2, 4 и 6 для uPA, MTSP-1 и химазы соответственно. Ферментативное расщепление фактора В комплемента (CFB, Complement Technologies кат. № A135) оценивали с помощью анализа AlphaLISA. После расщепления *in vitro* при 37 °C в течение 1 часа реакционную смесь разбавляли и переносили в многолуночный планшет для обнаружения CFB на основе гранул. Для обнаружения CFB антитело к фактору Ba (Quidel, кат. № A225), меченное DIG (Biotium Mix N' Stain Kit, кат. № 92450), объединяли с акцепторными гранулами с антителами к DIG (Perkin Elmer, кат. № AL113C) и биотинилированное антитело к фактору Bb (Quidel, кат. № A712) спаривали с донорными стрептавидиновыми гранулами (Perkin Elmer, кат. № 6760002S). Если нерасщепленный CFB остался, акцепторная и донорная гранулы объединяются, и в результате возбуждения лазером синглетный кислород из донорной гранулы запускает хемилюминесцентный сигнал от акцепторной гранулы, который активирует флуорофоры, содержащиеся в той же акцепторной грануле. После расщепления CFB сконструированной протеазой, протестированной в этом примере, полученные продукты расщепления — Ba и Bb — больше не связаны и происходит исчезновение или уменьшение сигнала. Расщепление полноразмерного CFB количественно оценивали путем линейной регрессии по стандартной кривой CFB в отсутствие химазы. В таблице 16 показаны результаты расщепления CFB при использовании указанной сконструированной протеазы.

Таблица 16. Расщепление фактора В комплемента (CFB)

Сконструированная протеаза на основе химазы	Анализ	Показатель	Измерение
C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218I/A226R	AlphaLISA	EC ₅₀	190–212 нМ

[0369] Сконструированную протеазу также оценивали на ингибирование гемолиза как в стандартном анализе альтернативного пути (AP) гемолиза, так и в усовершенствованной версии анализа, аналогичной описанной в примере 4. Ингибирование гемолиза низкомолекулярным ингибитором фактора В LNP023 (Iptacoran, MedChemExpress кат. № NY-127105) оценивали в тех же экспериментах для сравнения. Для стандартного анализа AP различные концентрации сконструированной протеазы C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218I/A226R или LNP023 или соответствующие контрольные образцы носителя предварительно смешивали с 20% нормальной человеческой сывороткой (NHS) в течение 10 минут при 37 °С. Затем добавляли эритроциты (эр.) кролика с буфером альтернативного пути (желатиновый вероналовый буфер, GVB + Mg + EGTA, 0,1% желатина, 5 мМ веронала, 145 мМ NaCl, 0,025% NaN₃, pH 7,3, 10 мМ MgCl₂ и 8 мМ EGTA) и инкубировали в течение 30 минут при 37 °С. Затем клетки осаждали и измеряли оптическую плотность (OD) в супернатанте при 415 нм для оценки лизиса. Для улучшенной версии анализа были проведены следующие корректировки: NHS заменили на лишенную человеческого фактора В сыворотку (Complement Technologies кат. № A335), фактор В, очищенный из сыворотки человека, добавляли в сыворотку в итоговой концентрации 1,6 мМ для анализа на гемолиз, и проводили предварительную инкубацию сыворотки с лекарственным веществом в течение 180 мин при 37 °С. Процент лизиса рассчитывали по следующей формуле: $[(OD_{415} \text{ образца} - OD_{415} \text{ отрицательного контроля EDTA}) / (OD_{415} \text{ положительного контроля физраствора} - OD_{415} \text{ EDTA}) * 100]$ (таблица 17А и таблица 17В). Значения IC₅₀ рассчитывали с помощью нелинейной регрессии (Prism 9, зависимость ответа от log(ингибитор, bv), 4-параметрическая модель с переменным наклоном) (таблица 18А и таблица 18В).

Таблица 17А. Ингибирование при стандартном анализе AP-гемолиза эритроцитов

Исследуемый препарат	Сконструированная протеаза	LNP023	Концентрация (мМ)
% гемолиза	Не исследован	0	10
	3,88	0	3
	47,86	1,16	1
	88,23	0	0,33

Исследуемый препарат	Сконструированная протеаза	LNP023	Концентрация (мМ)
	102,20	6,08	0,11
	Не исследован	93,92	0,011

Таблица 17В. Ингибирование при улучшенном анализе АР-гемолиза эритроцитов

Исследуемый препарат	Сконструированная протеаза	LNP023	Концентрация (мМ)
% гемолиза	Не исследован	0	10
	0	33,94	3
	4,09	108,48	1
	30,45	102,50	0,33
	103,94	110,53	0,11
	104,70	Не исследован	0,037
	112,73	Не исследован	0,012
	Не исследован	102,27	0,011
	99,24	Не исследован	0,004
	104,47	Не исследован	0,001

Таблица 18А. Ингибирование при стандартном анализе АР-гемолиза эритроцитов

Исследуемый препарат	Сконструированная протеаза	LNP023
IC ₅₀ (мМ)	0,92	0,027

Таблица 18В. Ингибирование при улучшенном анализе АР-гемолиза эритроцитов

Исследуемый препарат	Сконструированная протеаза	LNP023
IC ₅₀ (мМ)	0,27	2,6

Пример 9. Легочная функция, измеренная в мышинной модели острого респираторного дистресс-синдрома

[0370] На ФИГ. 13 представлена схема, демонстрирующая общий способ измерения функции легких на модели острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у мышей, получавших сконструированную протеазу на основе химазы по настоящему изобретению. Все использованные в данном примере ссылки на сконструированные протеазы даны в химотрипсиновой нумерации. Расшифровка нумерации по химотрипсину для модифицированных протеазных доменов сконструированных протеаз представлена в таблицах 2, 4 и 6 для uPA, MTSP-1 и химазы соответственно. Если коротко, мыши получали инъекции сконструированной протеазы на основе химазы C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218I/A226R или, через пероральный зонд, LNP023 (AdooQ Biosciences A18905), и легочную функцию измеряли до лечения и через 24 часа после инстилляций ЛПС.

[0371] После периода адаптации каждое животное взвешивали и случайным образом распределяли в группу лечения на основе массы тела. В день 0 (0 часов) мышей анестезировали и вводили одну интратрахеальную (ИТ) инстилляцию липополисахарида (ЛПС, Sigma) в дозе 50 мкг на мышшь. У всех животных контролировали общее состояние здоровья и массу тела в ходе развития заболевания. Респираторные функции измеряли с помощью плетизмографии всего тела (ПВТ) на находящихся в сознании мышах через 0 и 24 часа после ИТ-инстилляций ЛПС. Непосредственно перед ИТ-инстилляцией ЛПС мыши получали внутривенную (в/в) инъекцию сконструированной протеазы на основе химазы, указанной выше, в дозе 5,15 мг/кг. Животные, являющиеся отрицательным контролем, получали в/в инъекцию носителя (PBS). Животные с активным препаратом сравнения получали дозу 30 мг/кг LNP023 перорально. Мышей умерщвляли через 24 часа после ИТ-инстилляций ЛПС

[0372] Через двадцать четыре часа после введения сконструированной протеазы на основе химазы, указанной выше, или LNP023, плетизмографические измерения показали значительную защиту от застоя в легких, что свидетельствует о защите легочной функций при помощи данного лечения. Эти результаты представлены на ФИГ. 14. Влияние на индекс застоя в легких показано кратностью изменения относительно исходного значения PenH. Показанные данные означают +/- SEM, и значения **p составляют < 0,01 с использованием однофакторного дисперсионного анализа с применением критерия множественных сравнений Даннета.

[0373] В таблице 19 показано сравнение уровней дозы примера сконструированной протеазы на основе химазы и уровней дозы LNP023, вводимых *in vivo*

Таблица 19

Лечение	Доза (мг/кг)	Приблизительная молекулярная масса (г/моль)	Молярная доза (мкмоль/кг)	Кратность различия молярной дозы (LNP023: сконструированная протеаза)
Сконструированная протеаза	5,15	25 100	0,2	~355
LNP023	30	422,5	7,1	

[0374] В таблице 19 в сочетании с защитным эффектом лечения на индекс застоя в легких, наблюдаемым на ФИГ. 14, показано, что сконструированная протеаза на основе химазы, протестированная в этом примере, является столь же эффективной для защиты дыхательной функции на мышинной модели ОРДС, как и активный препарат сравнения LNP023 при введении приблизительно в 355 раз более низкой молярной концентрации.

[0375] Результаты свидетельствуют об эффективной регуляции сконструированными протеазами в низких концентрациях, тогда как низкомолекулярные терапевтические средства требуют более высоких концентраций и частого введения.

Пример 10. Экспрессия и очистка немеченых сконструированных протеаз на основе химаз в системе экспрессии у млекопитающих

[0376] Клетки НЕК293 временно трансфицировали векторами экспрессии сконструированной протеазы на основе химазы, собирали и очищали глубинной фильтрацией. Все использованные в данном примере ссылки на сконструированные протеазы даны в химотрипсиновой нумерации. Расшифровка нумерации по химотрипсину для модифицированных протеазных доменов сконструированных протеаз представлена в таблицах 2, 4 и 6 для uPA, MTSP-1 и химазы соответственно. Собранный материал культуры разбавляли в 1,5 раза 25 мМ Tris HCl, pH 7,5 (CCS). CCS наносили на катионообменную колонку (Capto SP ImPres или аналогичную) при 20 мл/мин. Колонку промывали 10 объемами колонки 90% буфера А (25 мМ Tris HCL, pH 7,5) + 10% буфера В (с 25 мМ Tris HCL, 1 М NaCl pH 7,5) при 20 мл/мин. Рекомбинантную сконструированную

химазу элюировали из колонки 40 объемами колонки линейного градиента от 10% буфера В до 65% буфера В при 10 мл/мин, 5 мл пиковых фракций, содержащих сконструированную химазу, собирали, объединяли и количественно определяли с помощью поглощения при 280 нм.

[0377] Сконструированные протеазы на основе химазы активировали путем инкубации с энтерокиназой после доведения объединенных фракций до 150 мМ NaCl буфером А и добавления CaCl₂ до 4 мМ. Активацию инициировали добавлением энтерокиназы (ЕКmax, Invitrogen) и инкубировали при 37 °С в течение ночи. Сконструированные химазные протеазы при этом способе были активированы приблизительно на 90%, и их дополнительно очищали от неактивированной химазы и энтерокиназы катионообменной хроматографией с использованием той же процедуры, описанной выше. Объединенные фракции собирали в PBS, 0,1% PS80 (pH 7,4) с чистотой более 98% мономера, HMWS и LMWS менее 2% (ФИГ. 15).

[0378] На ФИГ. 15 представлена электрофореграмма ДСН-ПААГ (с восстановлением), демонстрирующая экспрессию, очистку и активацию сконструированной протеазы на основе химазы по настоящему изобретению.

Пример 11. Увеличение периода полувыведения (HE) и стратегии технологичности при использовании HSA или Fc-домена IgG1 (Fc)

[0379] Девятнадцать сконструированных протеаз на основе химазы с учетом активности расщепления (таблица 10) протестировали на временную экспрессию в виде зимогенов в клетках HEK293. Все использованные в данном примере ссылки на сконструированные протеазы даны в химотрипсиновой нумерации. Расшифровка нумерации по химотрипсину для модифицированных протеазных доменов сконструированных протеаз представлена в таблицах 2, 4 и 6 для uPA, MTSP-1 и химазы соответственно. Экспрессировались восемь из девятнадцати протеаз по данным анализа ДСН-ПААГ-электрофореза осветленных супернатантов тканевой культуры (таблица 20, ФИГ. 16). В качестве С-концевых партнеров по слиянию для выбранных для кратковременной экспрессии в клетках CHO-S или HEK293 вариантов были выбраны HSA или Fc человека с целью увеличения растворимости, химического и *in vivo* периода полувыведения. Слитые белки, как с меткой HSA, так и с меткой Fc, экспрессировались в системе временной экспрессии в HEK293 (ФИГ. 17). Слияние с HSA сохраняло экспрессию сконструированной протеазы с

мутационной строкой № 1 (МС № 1), которая высоко оценивалась по специфической активности при исходном скрининге с продукцией в *E. coli*.

Таблица 20. Активность расщепления фактора В показательными сконструированными протеазами на основе химазы

№ МС	Мутационная строка	ЕС50 расщепления Fb	Экспрессия в НЕК293
1	C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R	28,1	
2	C22S/P38Q/K40L/F41R/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	36,3	Y
3	C22S/P38Q/K40M/F41H/V138I/F173Y/D175R/A190S/V213A/S218V/A226R	47,6	
4	C22S/P38Q/K40M/F41R/V138I/F173L/D175R/A190S/V213A/S218T/A226R	51,0	
5	C22S/P38Q/K40L/F41R/L99Y/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	57,0	Y
6	C22S/P38Q/K40L/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175T/A190S/V213A/S218V/A226R	57,6	
7	C22S/P38Q/K40L/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175S/A190S/V213A/S218I/A226R	60,3	Y
8	C22S/K40L/F41K/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	61,0	
9	C22S/P38Q/K40L/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	65,3	Y
10	C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218V/A226R	71,8	Y
11	C22S/F41K/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	77,0	
12	C22S/K40L/F41K/F173Y/D175N/S218L/A226R	77,0	
13	C22S/P38Q/K40M/F41R/L99N/V138I/F173Y/D175T/A190S/V213A/S218V/A226R	92,1	Y
14	C22S/P38Q/K40A/F41R/L99H/V138I/F173Y/D175N/A190S/V213A/S218I/A226R	92,9	Y
15	C22S/K40L/F41R/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	119	
16	C22S/K40L/F41H/L99N/F173Y/D175N/S218L/A226R	139	
17	C22S/P38Q/K40A/F41K/L99H/V138I/D175S/A190S/V213A/S218V/A226R	142,3	Y
18	C22S/F173Y/D175N/A226R	170	

№ МС	Мутационная строка	ЕС50 расщеп- ления Fb	Экспресси я в НЕК293
19	C22S/K40L/F41R/L99H/F173Y/D175Y/S218I/A226R		

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированная протеаза, содержащая модифицированный протеазный домен химазы, модифицированный протеазный домен сериновой протеазы 1 мембранного типа (MTSP-1), модифицированный протеазный домен активатора плазминогена урокиназного типа (uPA) или модифицированный протеазный домен родственной калликреину пептидазы 5 (KLK5), причем сконструированная протеаза способна расщеплять фактор В.
2. Сконструированная протеаза по п. 1, причем расщепление фактора В сконструированной протеазой образует один или более функционально неактивных фрагментов.
3. Сконструированная протеаза по п. 2, причем один или более функционально неактивных фрагментов способны уменьшать активацию комплемента.
4. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–3, причем расщепление фактора В приводит к образованию фрагмента фактора В, который имеет сниженную функциональность.
5. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–4, причем фактор В представляет собой фактор В приматов, не являющихся человеком.
6. Сконструированная протеаза по п. 5, причем примат, не являющийся человеком, представляет собой яванского макака.
7. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–4, причем фактор В представляет собой человеческий фактор В.
8. Сконструированная протеаза по п. 7, причем фактор В содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.
9. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–8, причем расщепление фактора В происходит в сайте, не являющемся мишенью фактора D.
10. Сконструированная протеаза по п. 9, причем расщепление в сайте, не являющемся мишенью фактора D, генерирует по меньшей мере два фрагмента, которые не являются Va и Vb.

11. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–10, причем расщепление фактора В приводит к снижению образования продуктов расщепления фактора В, Ва и Вb, по сравнению с расщеплением фактором D.
12. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–8, причем расщепление фактора В происходит в сайте, являющемся мишенью фактора D.
13. Сконструированная протеаза по п. 12, причем сайт расщепления фактора В, являющийся мишенью фактора D, содержит QQKR/KIV (SEQ ID NO: 9).
14. Сконструированная протеаза по п. 9, причем сайт расщепления фактора В содержит последовательность, выбранную из: WEHR/KGT (SEQ ID NO: 10), KNQKR/QKQ (SEQ ID NO: 11), DVFY/QMI (SEQ ID NO: 12), EGVD/AE (SEQ ID NO: 13), DHKL/KSG (SEQ ID NO: 14), TPW/SLA (SEQ ID NO: 15), KVSEAD (SEQ ID NO: 20), IRPSKG (SEQ ID NO: 4), GGEKRD (SEQ ID NO: 5), GKKEAG (SEQ ID NO: 3) и DHKL/KSG (SEQ ID NO: 21).
15. Сконструированная протеаза по п. 9, причем сайт расщепления фактора В содержит последовательность, выбранную из WEHR/KGT (SEQ ID NO: 10) и KNQKR/QKQ (SEQ ID NO: 11), и при этом сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен MTSP-1 или модифицированный протеазный домен uPA.
16. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–15, причем сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен MTSP-1.
17. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–15, причем сконструированная протеаза не содержит модифицированный протеазный домен MTSP-1.
18. Сконструированная протеаза по п. 16, содержащая одну или более модификаций относительно протеазного домена MTSP-1, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.
19. Сконструированная протеаза по п. 18, причем модификация представляет собой одно или более из замены, добавления и делеции одного или более аминокислотных остатков.
20. Сконструированная протеаза по п. 16, причем одна или более модификаций находятся в одном или более положениях, соответствующих одному или более

положениям, выбранным из D622, I640, L678, A686, F703, D705, F706, T707, F708, K719, C731, D734, Y755, Q783, V791, Q802, A814, D828 и K835 в протеазном домене MTSP-1, содержащем последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 18.

21. Сконструированная протеаза по п. 16, причем одна или более модификаций выбраны из представленных в таблице 5А.

22. Сконструированная протеаза по п. 16, причем одна или более модификаций выбраны из показательных мутационных строк, представленных в таблице 5В.

23. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–15, причем сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен uPA.

24. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–15, причем сконструированная протеаза не содержит модифицированный протеазный домен uPA.

25. Сконструированная протеаза по п. 23, содержащая одну или более модификаций относительно протеазного домена uPA, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

26. Сконструированная протеаза по п. 25, причем модификация представляет собой одно или более из замены, добавления и делеции одного или более аминокислотных остатков.

27. Сконструированная протеаза по п. 23, причем одна или более модификаций находятся в одном или более положениях, соответствующих одному или более положениям, выбранным из S37, D60, L97, G161, R179, H180, V185, Y187, I207, A247, D248, A251, H252, C279, Y308, V316, A343, Q353, R378, K385 в протеазном домене uPA, содержащем последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8.

28. Сконструированная протеаза по п. 23, причем одна или более модификаций выбраны из представленных в таблице 3А.

29. Сконструированная протеаза по п. 23, причем одна или более модификаций выбраны из показательных мутационных строк, представленных в таблице 3В.

30. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–19, причем сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен химазы.

- 31.** Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–19, причем сконструированная протеаза не содержит модифицированный протеазный домен химазы.
- 32.** Сконструированная протеаза по п. 30, причем сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен химазы, а сайт расщепления содержит последовательность, выбранную из DVFY/QMI (SEQ ID NO: 12), EGVD/AE (SEQ ID NO: 13), DHKL/KSG (SEQ ID NO: 14) и TPW/SLA (SEQ ID NO: 15).
- 33.** Сконструированная протеаза по п. 30, содержащая одну или более модификаций относительно протеазного домена химазы, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.
- 34.** Сконструированная протеаза по п. 33, причем модификация представляет собой одно или более из замены, добавления и делеции одного или более аминокислотных остатков.
- 35.** Сконструированная протеаза по п. 30, причем одна или более модификаций являются одним или более положениями, соответствующими одному или более положениям, выбранным из S36 C7, V21, P26, G31, R37, K74, K80, I90, L101, L103, F110, V125, F157, D159, S176, A177, F178, K179, L186, V196, G199, A203, A207, F209 в протеазном домене химазы, содержащем последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6.
- 36.** Сконструированная протеаза по п. 30, причем одна или более модификаций выбраны из представленных в таблице 7А.
- 37.** Сконструированная протеаза по п. 30, причем одна или более модификаций выбраны из показательных мутационных строк, представленных в таблице 7В.
- 38.** Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–19, причем сконструированная протеаза содержит модифицированный протеазный домен KLK5, необязательно содержащий одну или более аминокислотных модификаций SEQ ID NO: 23.
- 39.** Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–19, причем сконструированная протеаза не содержит модифицированный протеазный домен KLK5.
- 40.** Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–39, причем сконструированная протеаза имеет отношение k_{cat}/K_m примерно 100, примерно 200, примерно 300, примерно 400, примерно 500, примерно 600, примерно 700, примерно 800, примерно 900, примерно

1000, примерно 1000, примерно 1100, примерно 1200, примерно 1300, примерно 1400, примерно 1500, примерно 1600, примерно 1,700, примерно 1800 или примерно 1900 М⁻¹ с⁻¹ для расщепления фактора В.

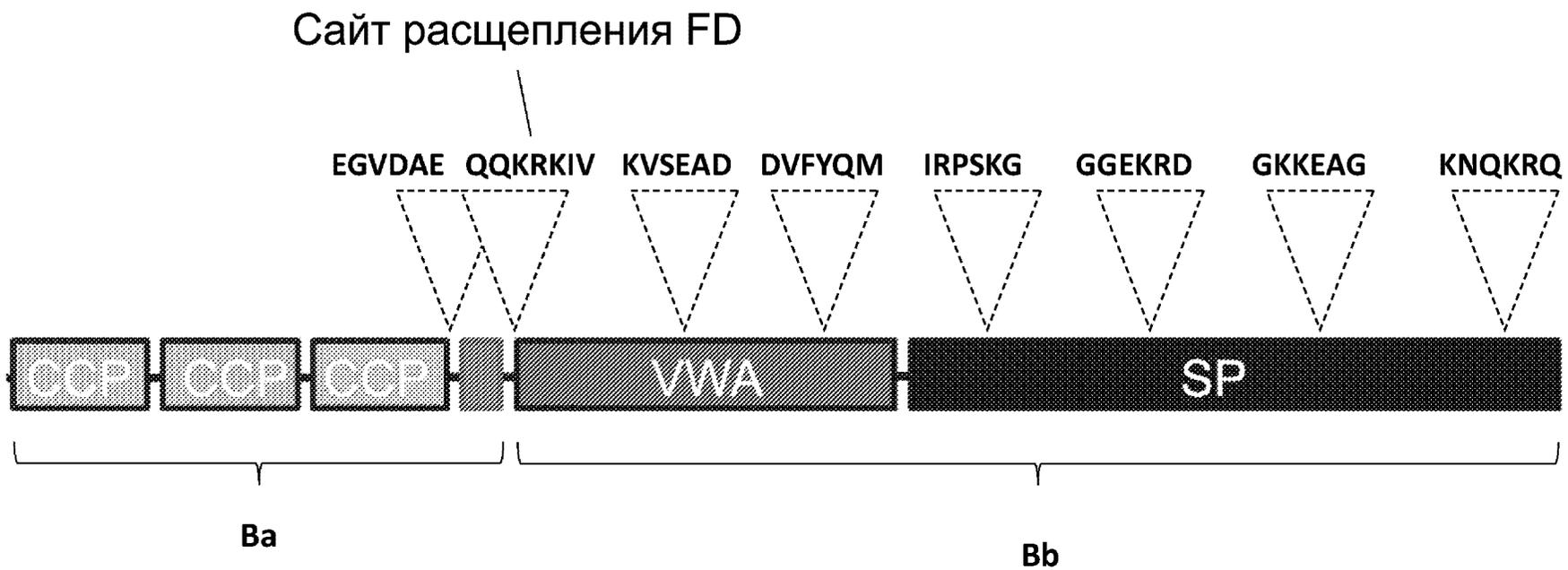
41. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–40, причем сконструированная протеаза имеет отношение k_{cat}/K_m от примерно 10^3 до примерно 10^9 М⁻¹ с⁻¹ для расщепления фактора В.
42. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–41, причем сконструированная протеаза имеет EC₅₀ для фактора В менее чем примерно 20 нМ.
43. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–42, причем сконструированная протеаза имеет EC₅₀ для фактора В менее чем примерно 1 нМ.
44. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–41, причем сконструированная протеаза имеет EC₅₀ для фактора В примерно 20, примерно 25 или примерно 60 нМ.
45. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–41, причем сконструированная протеаза имеет EC₅₀ для расщепления фактора В от примерно 1000 до примерно 4500 нМ.
46. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–45, причем сконструированная протеаза имеет период полувыведения из плазмы крови человека более чем примерно 72 часа.
47. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–46, причем сконструированная протеаза имеет период полувыведения из плазмы крови человека более чем примерно 120 часов.
48. Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–47, причем сконструированная протеаза имеет период полувыведения из плазмы крови человека примерно 7 дней.
49. Сконструированная протеаза по п. 48, причем каталитическая активность составляет от примерно 10% до примерно 50% или от примерно 90% до примерно 100%.
50. Сконструированная протеаза по п. 16, причем сконструированная протеаза имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с протеазой, содержащей протеазный домен MTSP-1, который не является модифицированным.

- 51.** Сконструированная протеаза по п. 16, причем сконструированная протеаза имеет повышенную биодоступность по сравнению с протеазой, содержащей протеазный домен MTSP-1, который не является модифицированным.
- 52.** Сконструированная протеаза по п. 23, причем сконструированная протеаза имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с протеазой, содержащей протеазный домен uPA, который не является модифицированным.
- 53.** Сконструированная протеаза по п. 23, причем сконструированная протеаза имеет повышенную биодоступность по сравнению с протеазой, содержащей протеазный домен uPA, который не является модифицированным.
- 54.** Сконструированная протеаза по п. 30, причем сконструированная протеаза имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с протеазой, содержащей протеазный домен химазы, который не является модифицированным.
- 55.** Сконструированная протеаза по п. 30, причем сконструированная протеаза имеет повышенную биодоступность по сравнению с протеазой, содержащей протеазный домен химазы, который не является модифицированным.
- 56.** Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–55, причем сконструированная протеаза является неиммуногенной.
- 57.** Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–56, причем сконструированная протеаза имеет форму зимогена.
- 58.** Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–56, причем сконструированная протеаза находится в активной форме.
- 59.** Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–58, причем сконструированная протеаза слита с компонентом, который увеличивает период полувыведения сконструированной протеазы.
- 60.** Сконструированная протеаза по п. 59, причем компонент представляет собой Fc-домен.
- 61.** Сконструированная протеаза по п. 59, причем компонент представляет собой человеческий сывороточный альбумин.

- 62.** Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–15, которая содержит модифицированный протеазный домен химазы с последовательностью, которая на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 6.
- 63.** Сконструированная протеаза по п. 62, причем модифицированный протеазный домен химазы с SEQ ID NO: 6 содержит одну из мутационных строк из таблицы 7B.
- 64.** Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–15, которая содержит модифицированный протеазный домен сериновой протеазы 1 мембранного типа (MTSP-1) с последовательностью, которая на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 7.
- 65.** Сконструированная протеаза по п. 64, причем модифицированный протеазный домен MTSP-1 с SEQ ID NO: 7 содержит одну из мутационных строк из таблицы 5B.
- 66.** Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–15, которая содержит модифицированный протеазный домен активатора плазминогена урокиназного типа (uPA) с последовательностью, которая на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 22.

- 67.** Сконструированная протеаза по п. 66, причем модифицированный протеазный домен uPA с SEQ ID NO: 22 содержит одну из мутационных строк из таблицы 3В.
- 68.** Сконструированная протеаза по любому из пп. 1–15, которая содержит модифицированный протеазный домен родственной калликреину протеазы 5 (KLK5) с последовательностью, которая на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или на по меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 23.
- 69.** Способ инактивации фактора В, включающий приведение фактора В в контакт с любой из сконструированных протеаз по пп. 1–68.
- 70.** Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту любой из сконструированных протеаз по пп. 1–68.
- 71.** Способ по п. 70, в котором заболевание или состояние связано с нарушением регуляции комплемента.
- 72.** Способ по любому из пп. 70–71, в котором заболевание или состояние представляет собой воспалительное заболевание или состояние.
- 73.** Способ по любому из пп. 70–72, в котором лечение представляет собой заместительную терапию.
- 74.** Способ по любому из пп. 70–73, в котором лечение блокирует активацию комплемента.
- 75.** Способ по любому из пп. 70–74, в котором лечение модулирует аутоиммунную реакцию.
- 76.** Способ по любому из пп. 70–75, в котором заболевание или состояние представляет собой врожденную недостаточность комплемента.

77. Способ по любому из пп. 70–76, в котором лечение предназначено для повреждения эндотелиальных или почечных клеток.
78. Способ по любому из пп. 70–77, в котором заболевание или состояние выбрано из волчаночного нефрита, С3-гломерулопатии (С3-ГП), первичной IgA-нефропатии, ишемически-реперфузионного (I/R) поражения трансплантата почки, ассоциированного с антителами к цитоплазме нейтрофилов (АНЦА) васкулита (ААВ), сепсиса, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), заболевания, вызванного коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), атипичного гемолитико-уремического синдрома (аГУС), мембранозной нефропатии (МН) и пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ).
79. Способ по любому из пп. 70–78, в котором заболевание или состояние представляет собой дефицит белка контроля.
80. Способ по любому из пп. 70–78, в котором заболевание или состояние представляет собой вторичное расстройство комплемента.
81. Способ по любому из пп. 70–78, в котором заболевание или состояние представляет собой связанное с иммунитетом заболевание или состояние.
82. Способ по любому из пп. 70–81, в котором сконструированную протеазу вводят субъекту подкожно.
83. Способ по п. 82, в котором сконструированная протеаза активируется *in situ* в месте нахождения компонента комплемента с нарушенной регуляцией.
84. Способ по из по любому из пп. 70–83, в котором сконструированная протеаза представлена в жидком стабильном составе.
85. Фармацевтическая композиция, содержащая любую из сконструированных протеаз по пп. 1–68 и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.
86. Фармацевтическая композиция по п. 85, причем сконструированная протеаза представлена в жидком стабильном составе.
87. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 85–86, причем композиция приготовлена для подкожного введения.

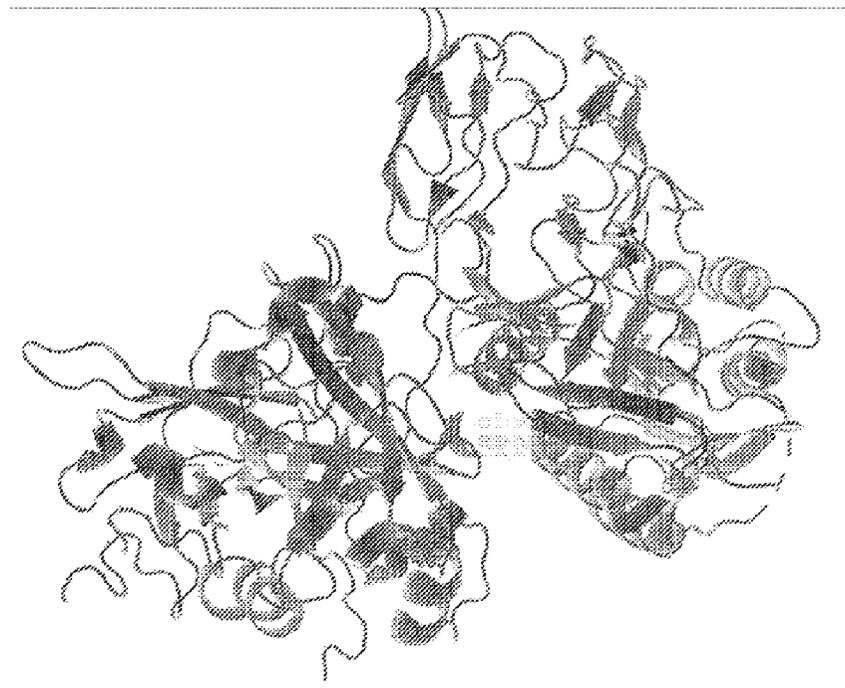


ФИГ. 1А

ФИГ. 1В

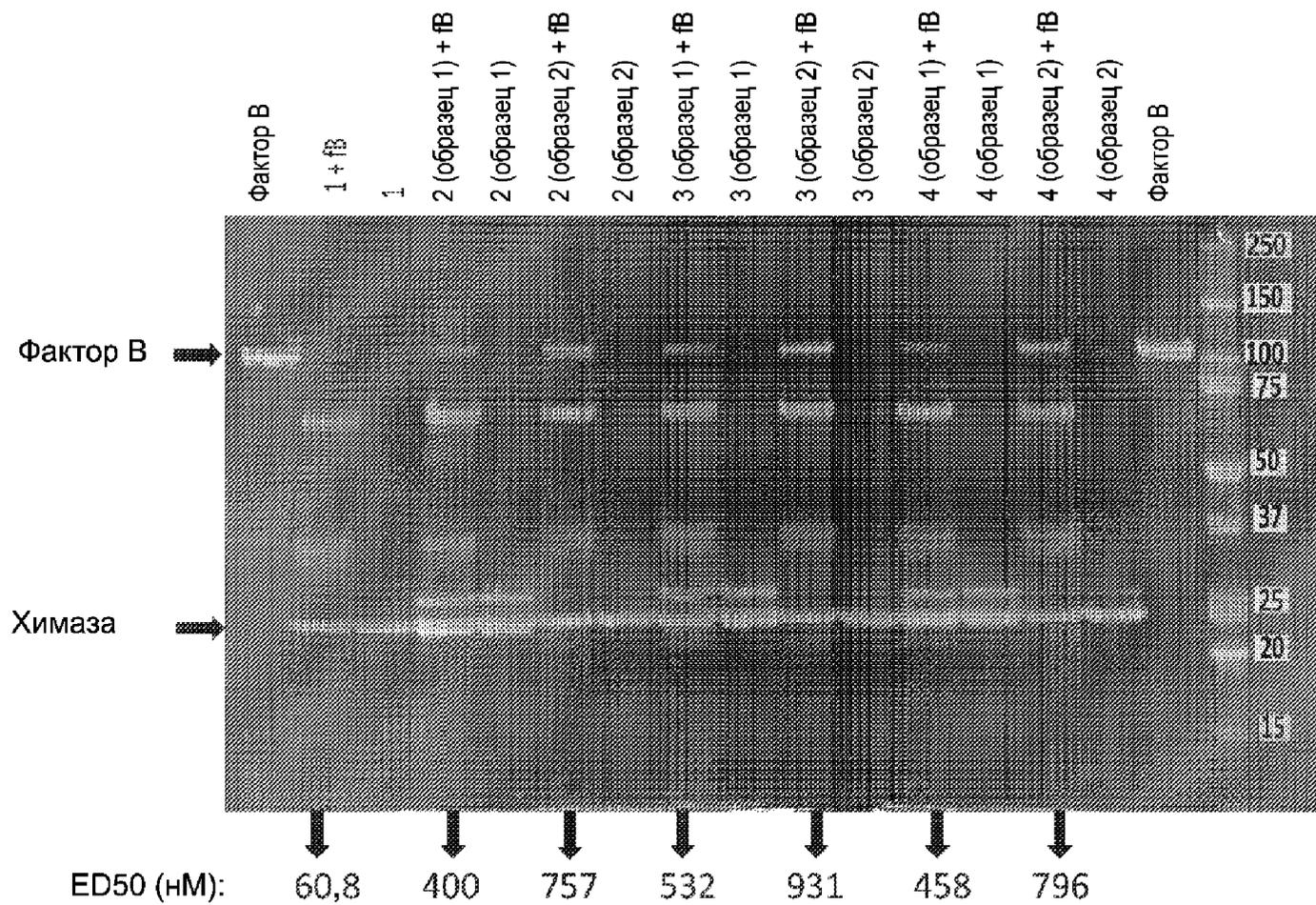


ФИГ. 1С

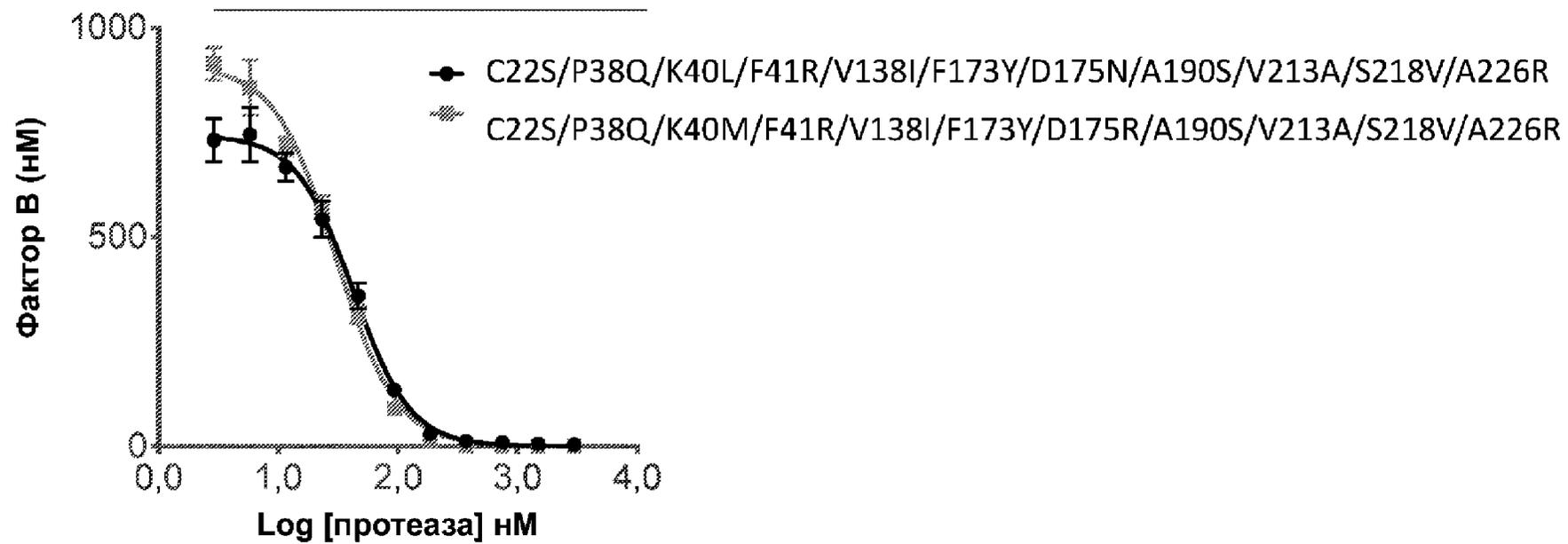


5 с — расщепление DVFY↓QM (Y441 на поверхности белка)
15 с — расщепление EGVD↓AE (V220 невидим в структуре, т. е. высокоподвижен)

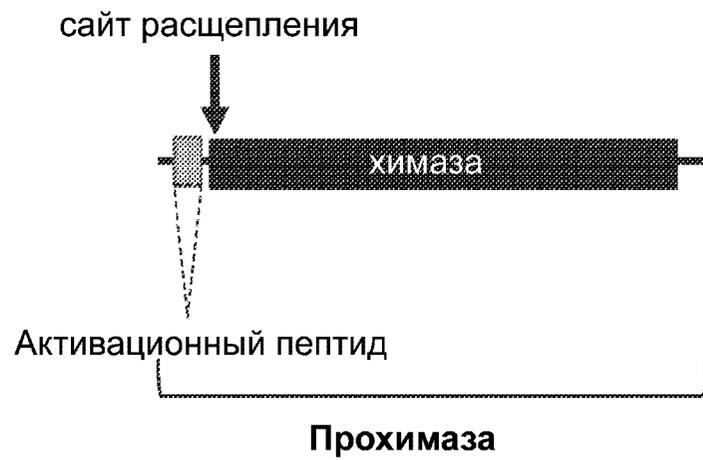
Пример расщепления FB с помощью сконструированных протеаз на основе химазы на окрашенном кумасси геле



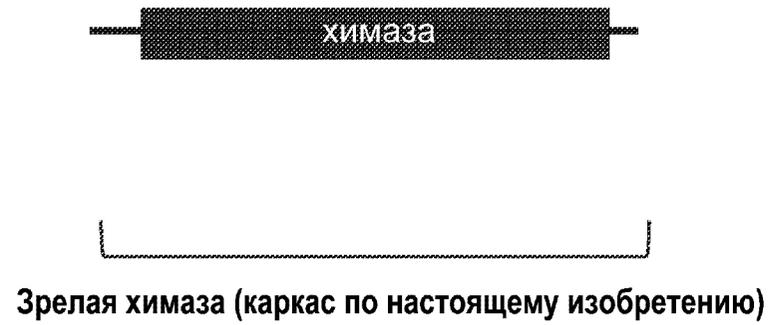
ФИГ. 1D



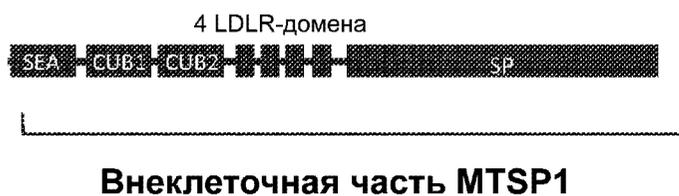
ФИГ. 1Е



ФИГ. 2А



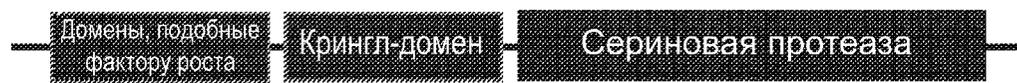
ФИГ. 2В



ФИГ. 3А



ФИГ. 3В



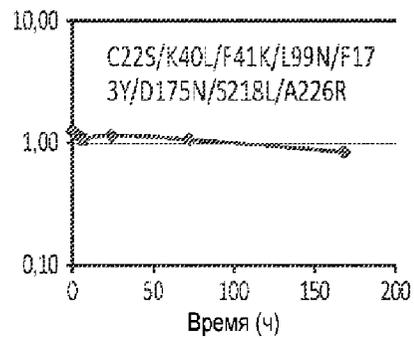
Зимоген uPA

ФИГ. 3С

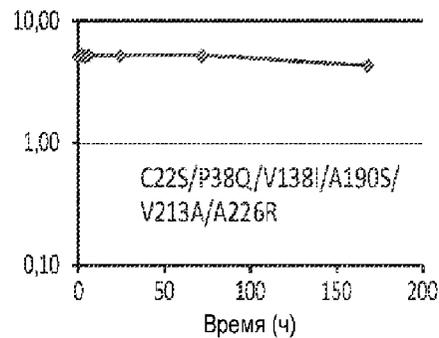


Зрелый uPA

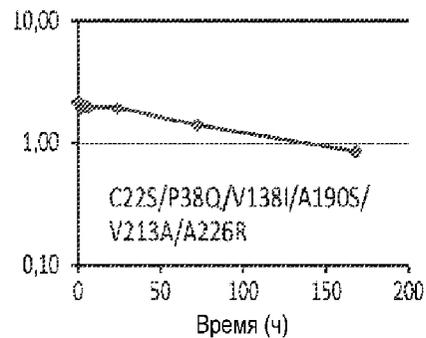
ФИГ. 3D



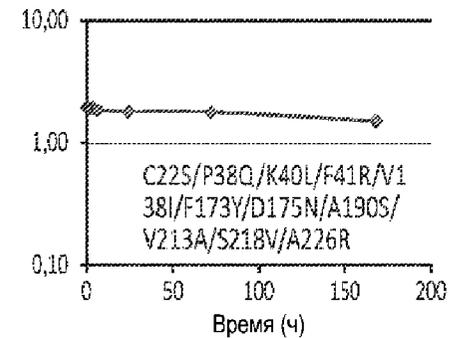
ФИГ. 4А



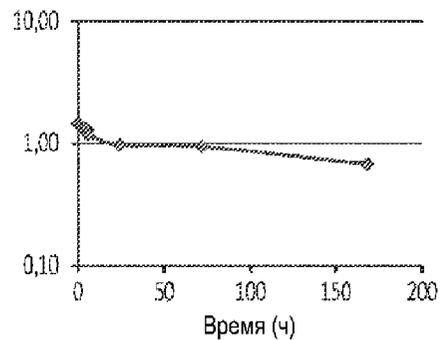
ФИГ. 4В



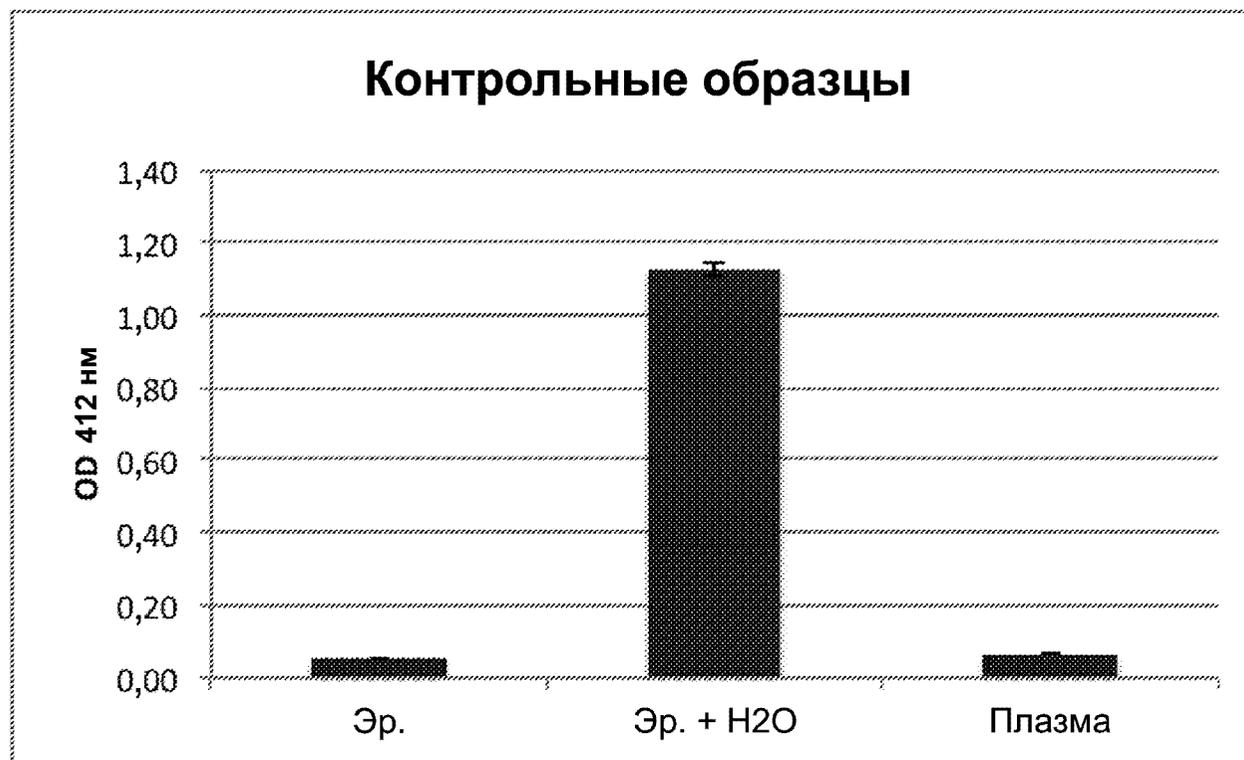
ФИГ. 4С



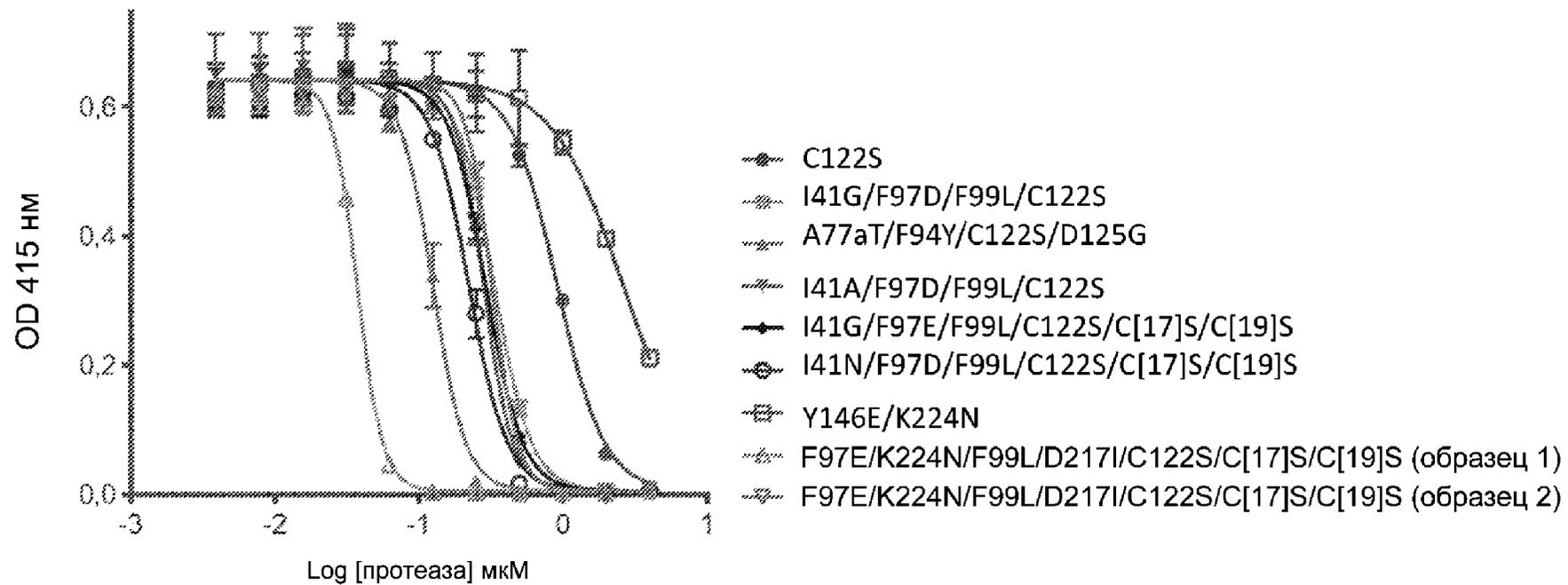
ФИГ. 4D



ФИГ. 4Е

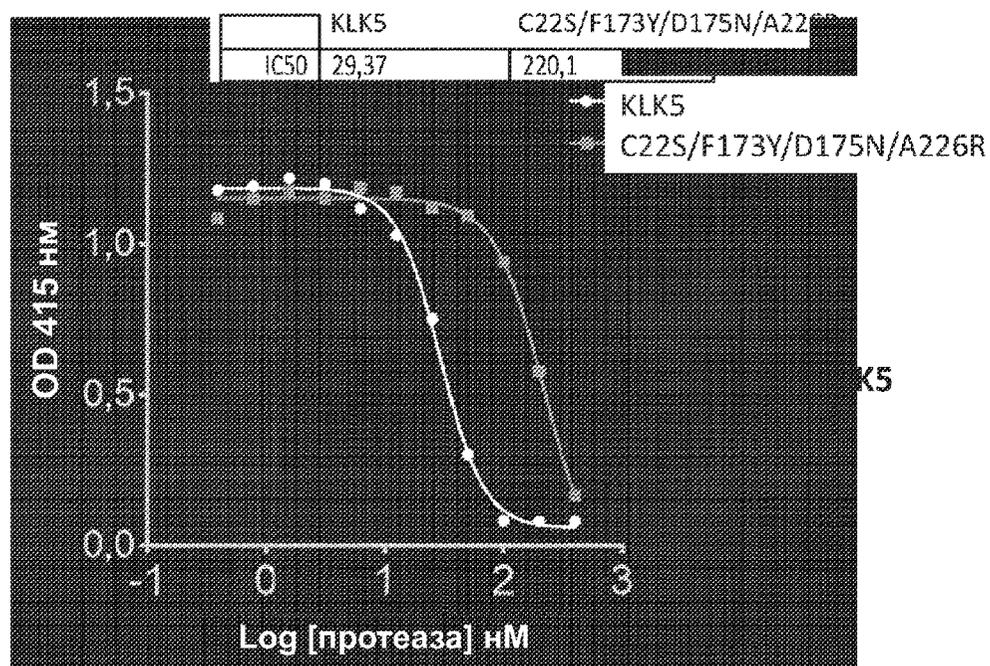


ФИГ. 5



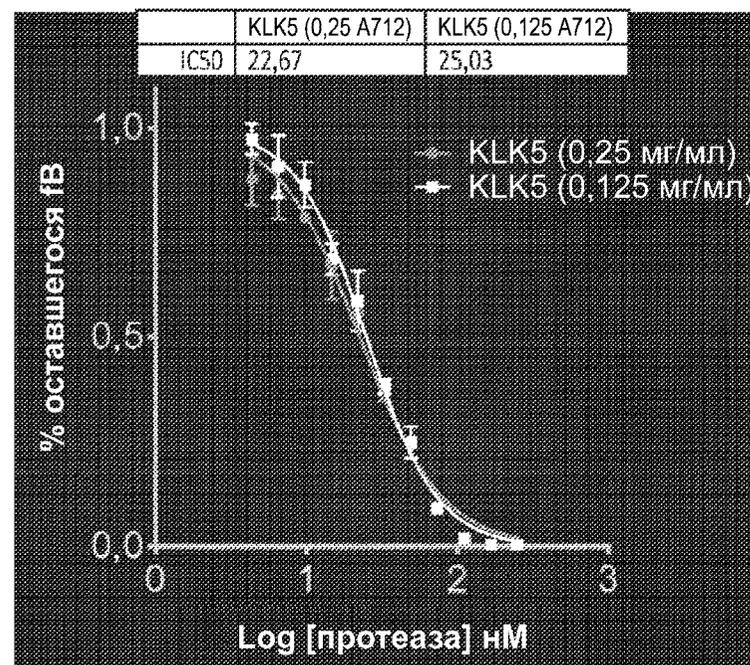
ФИГ. 6

Анализ на гемолиз с KLK5

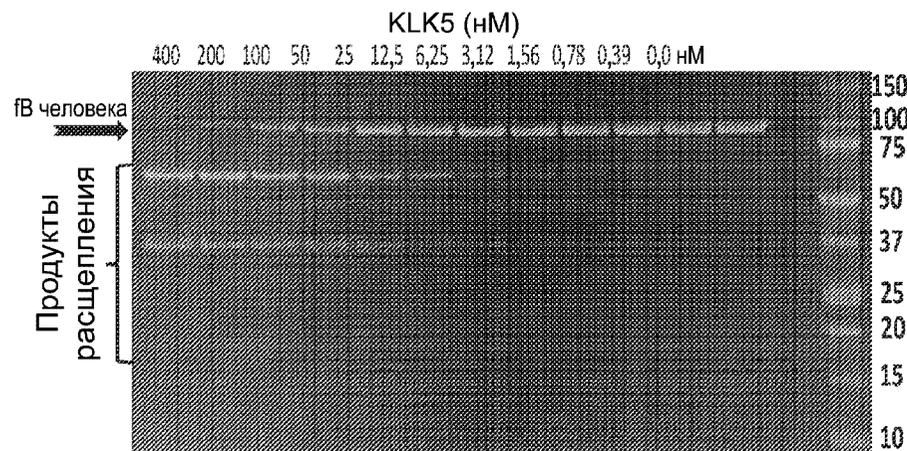


ФИГ. 7А

Анализ расщепления FB при помощи KLK5

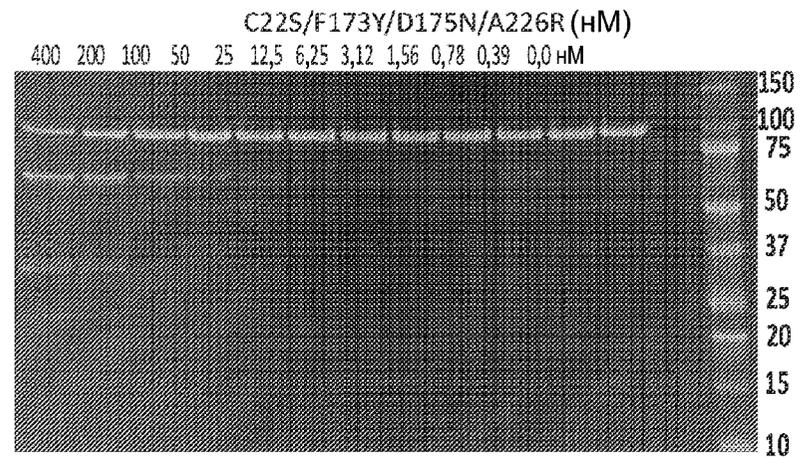


ФИГ. 7В



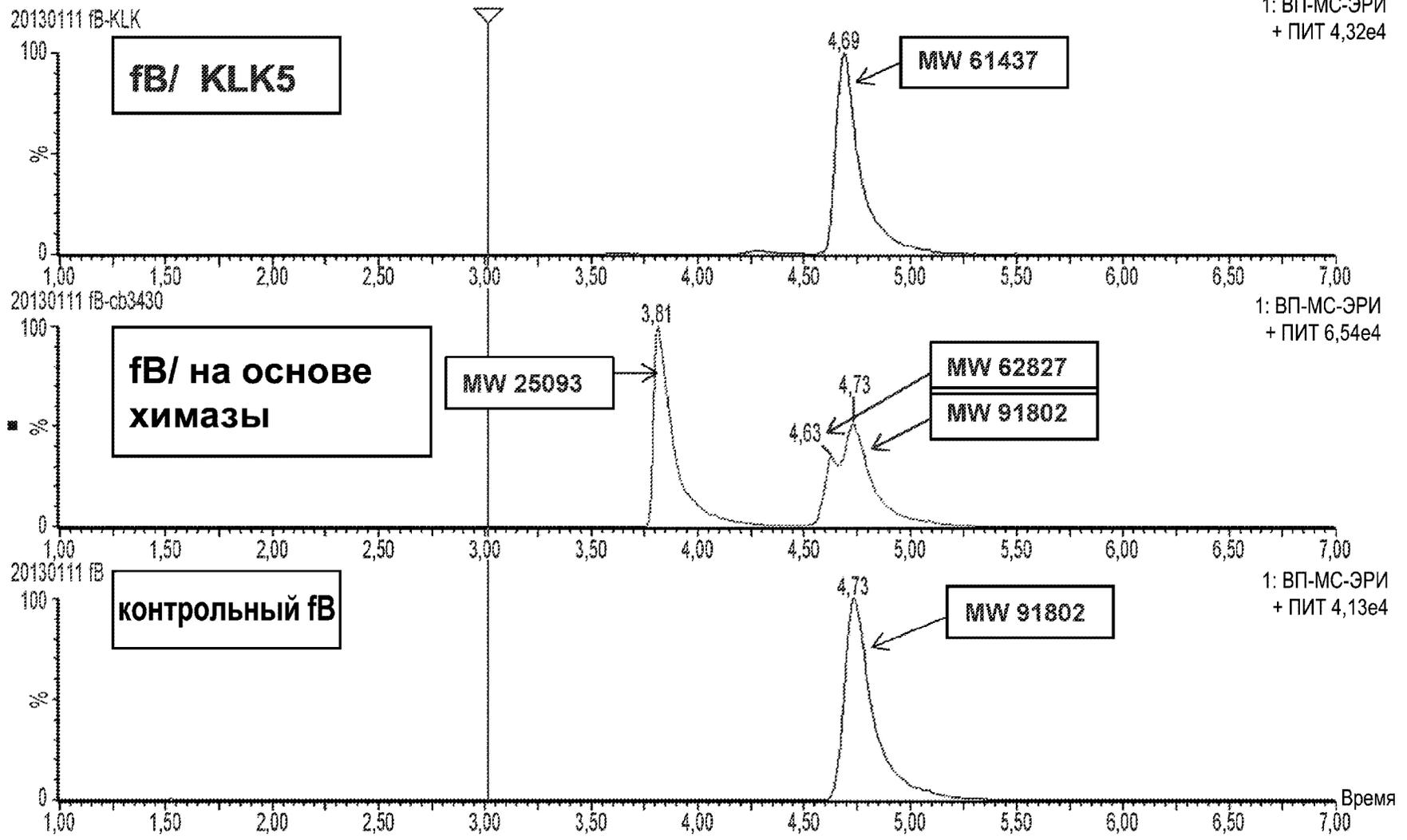
EC50 = ~ 25 нМ

ФИГ. 8А



EC50 = ~ 200 нМ

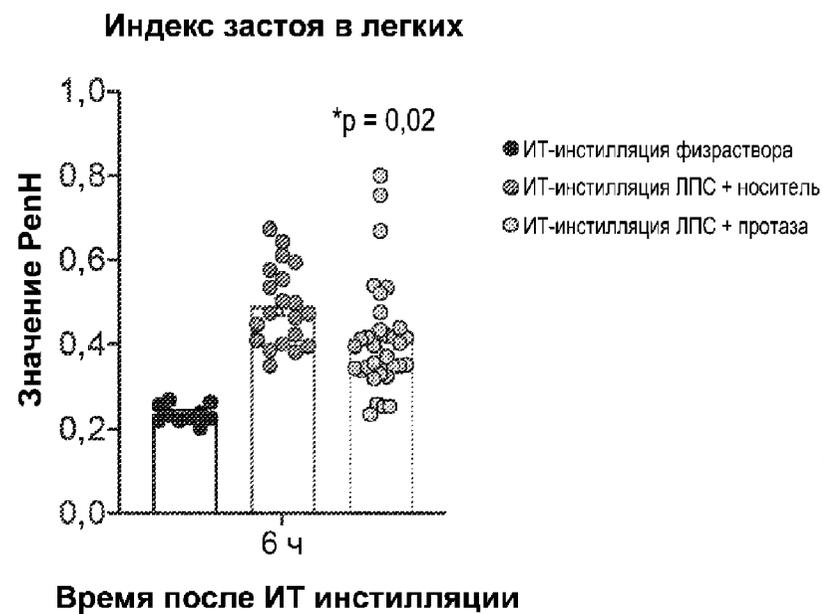
ФИГ. 8В



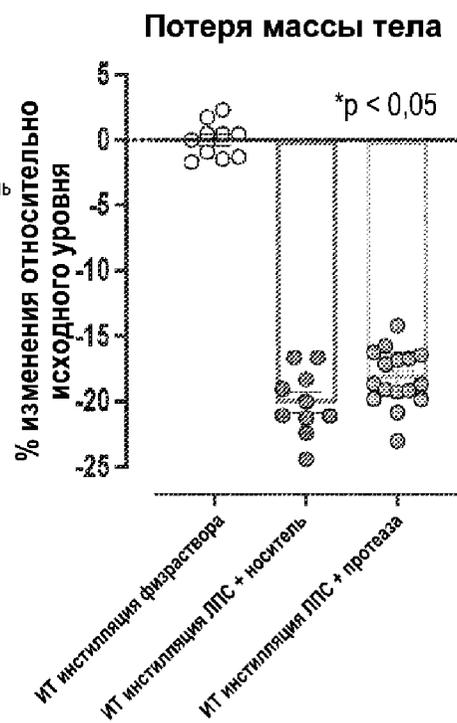
ФИГ. 9



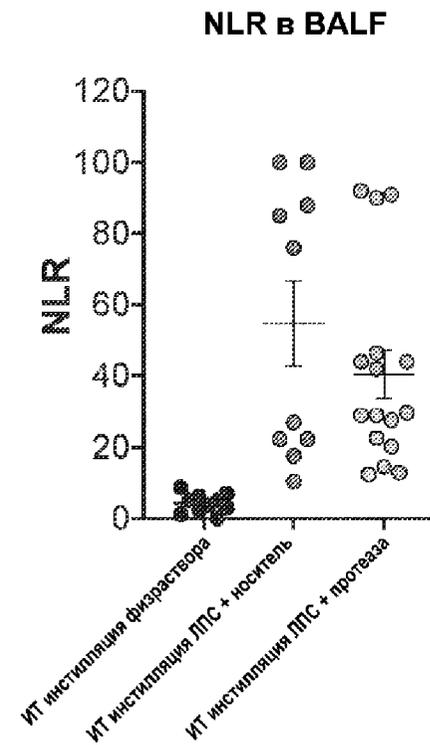
ФИГ. 10



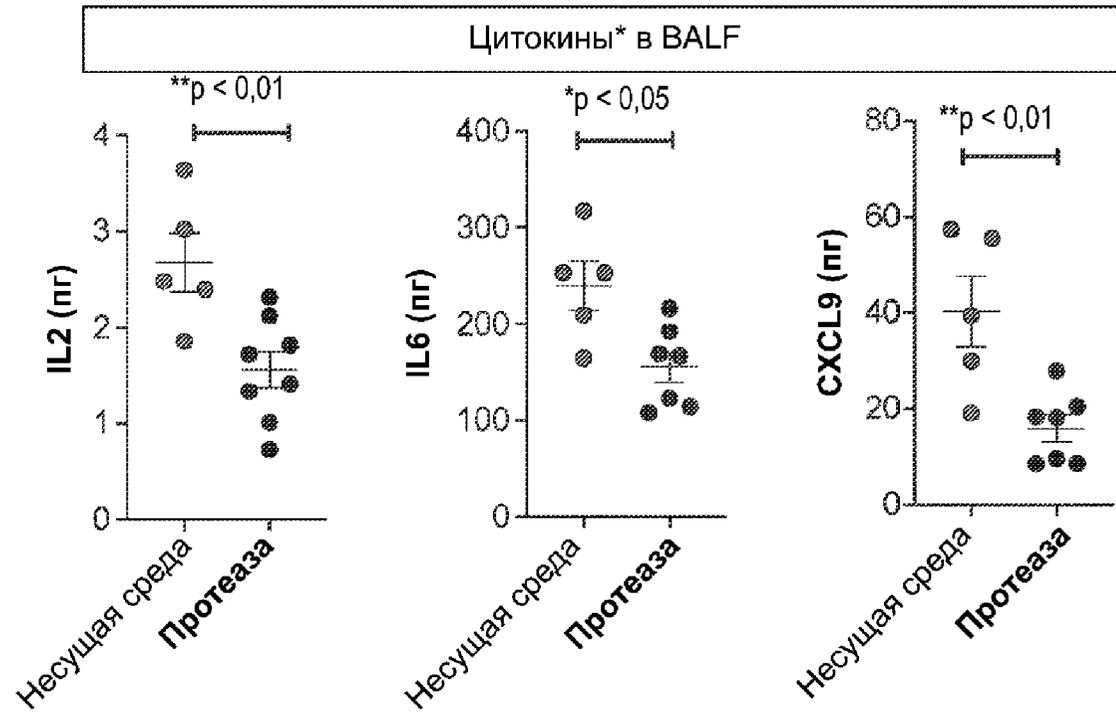
ФИГ. 11А



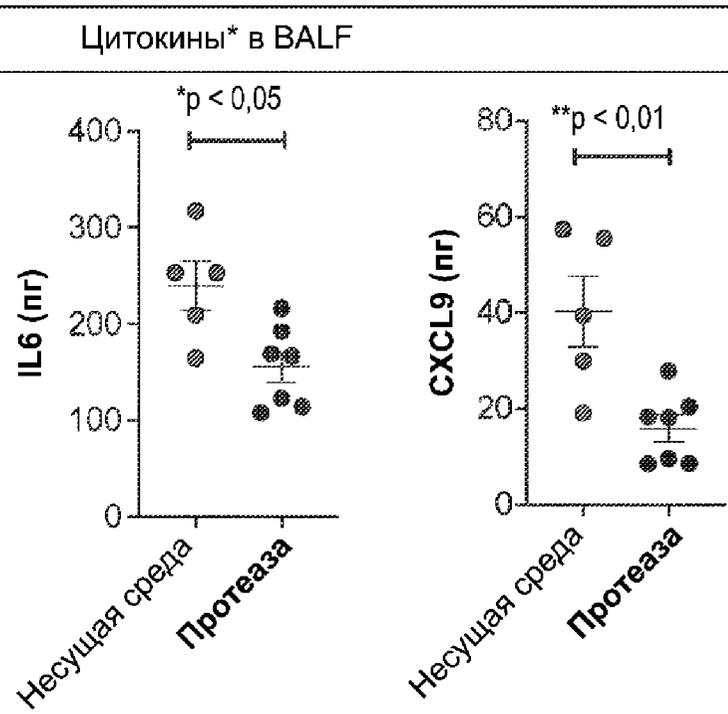
ФИГ. 11В



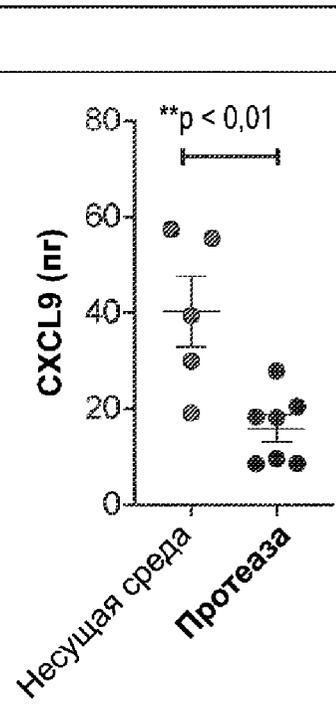
ФИГ. 11С



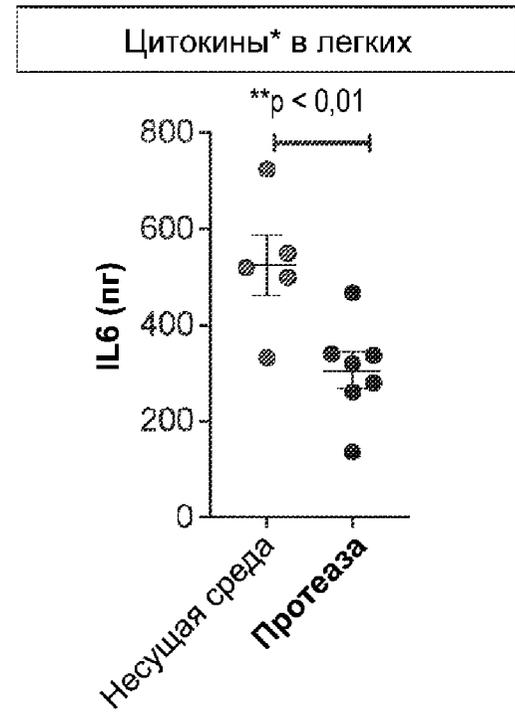
ФИГ. 12А



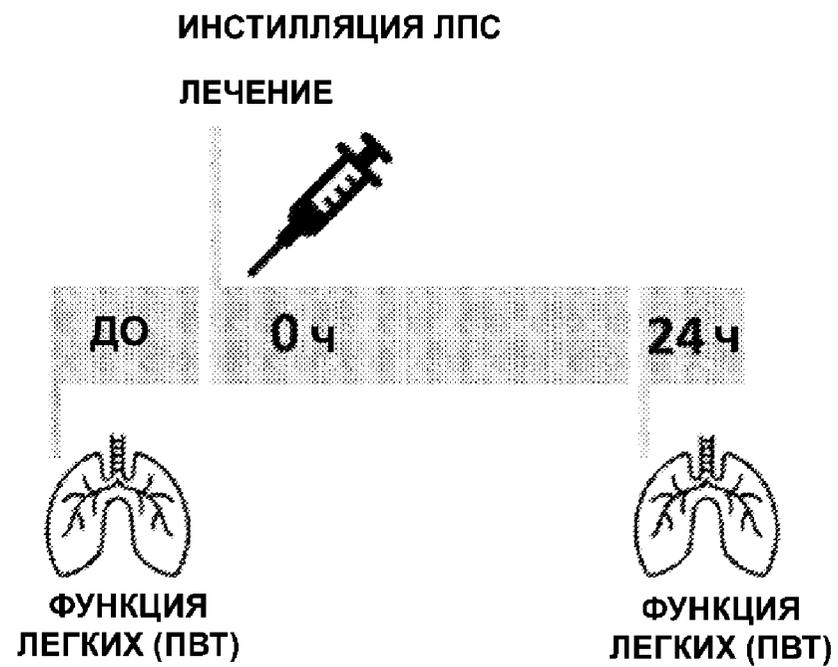
ФИГ. 12В



ФИГ. 12С

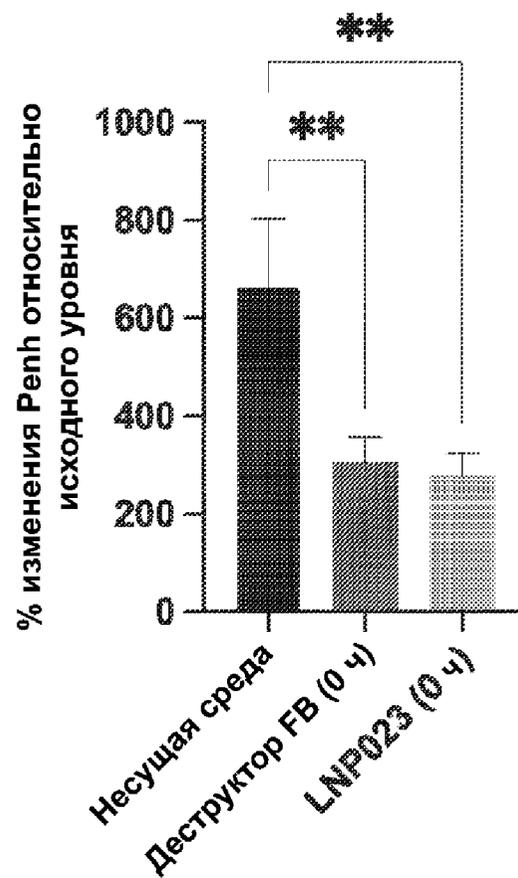


ФИГ. 12D

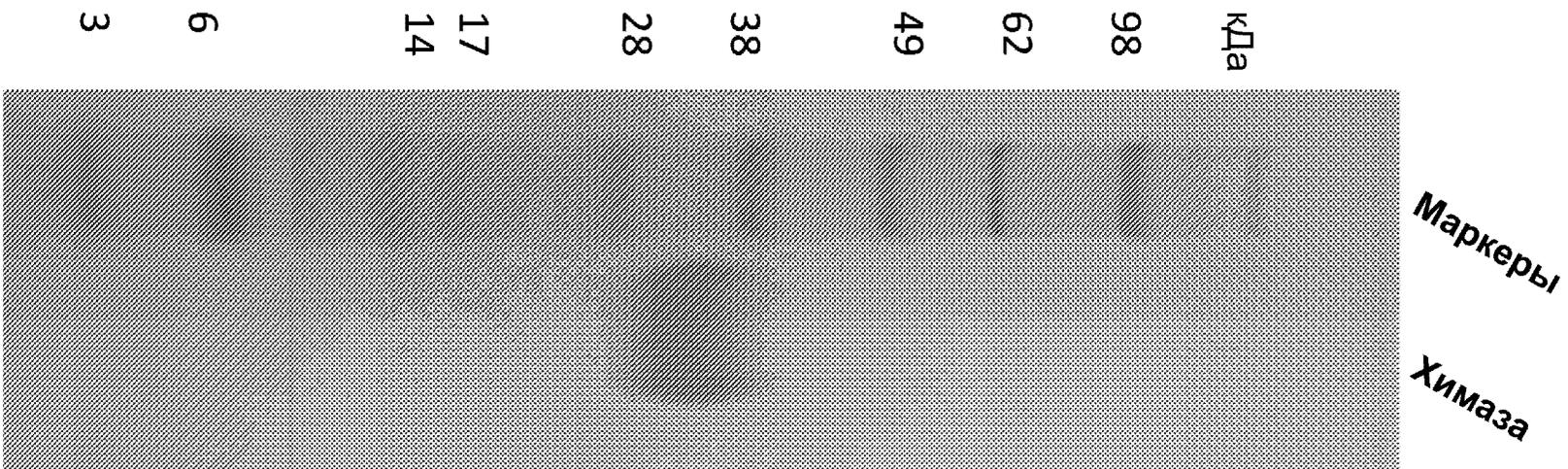


ФИГ. 13

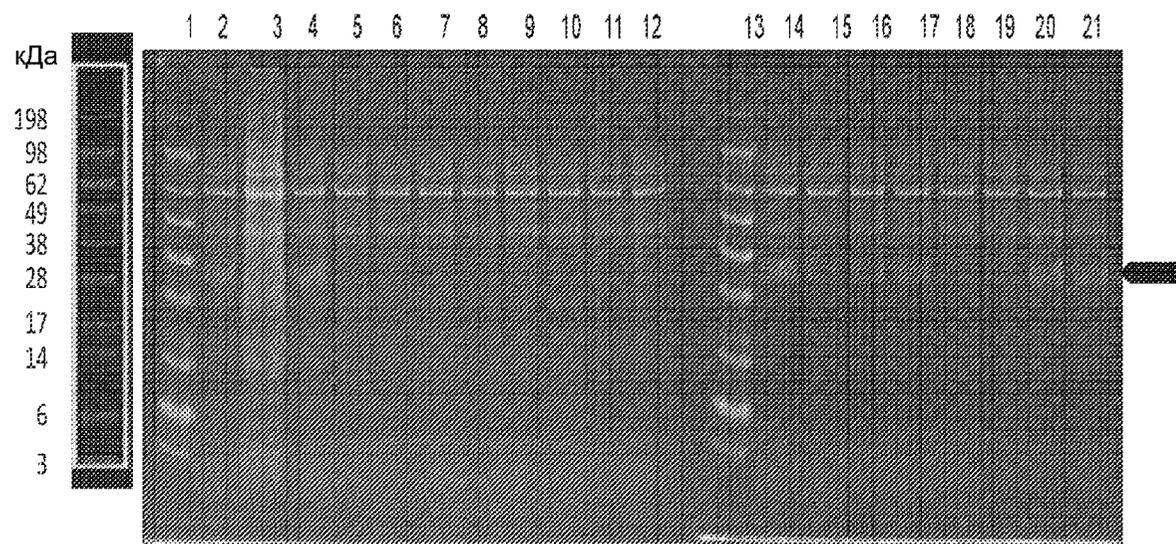
Индекс застоя в легких



ФИГ. 14



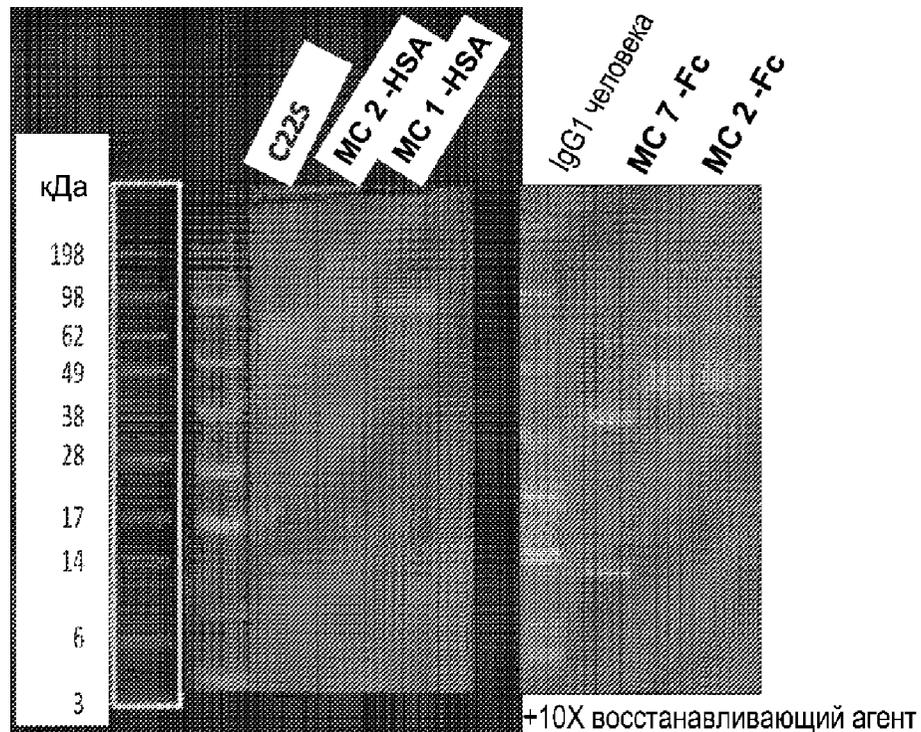
ФИГ. 15



Дорожка	№ МС	Дорожка	№ МС
1	Ступени	13	Ступени
2	МС 2	14	МС 10
3	МС 1	15	МС 17
4	МС 7	16	МС 13
5	МС 4	17	МС 9
6	МС 18	18	МС 3
7	МС 15	19	МС 6
8	МС 16	20	МС 14
9	МС 8	21	МС 5
10	МС 11		
11	МС 12		
12	МС 19		

Краситель 4X NuPage для нанесения на гель + 10X восстанавливающий агент
 Образцы нагревали при 95 градусах 5 мин
 Прогоночный буфер MES, 4–12% Bis-Tris гель, 150 В 1 ч
 Краситель SimplyBlue SafeStain

ФИГ. 16



Образцы нагревали при 95 градусах 5 мин
 Прогоночный буфер MES, 4–12% Bis-Tris гель, 150 В 1 ч
 Краситель SimplyBlue SafeStain

ФИГ. 17