

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 766**

51 Int. Cl.:
C12N 9/64 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10709961 .6**
96 Fecha de presentación: **03.03.2010**
97 Número de publicación de la solicitud: **2245150**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.11.2010**

54 Título: **Proteasa para el acondicionamiento de heridas y el cuidado de la piel**

30 Prioridad:
03.03.2009 EP 09003063

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.08.2012

73 Titular/es:
**B.R.A.I.N. Biotechnology Research And
Information Network AG
Darmstädter Strasse 34
64673 Zwingenberg, DE**

72 Inventor/es:
**NIEHAUS, Frank;
ECK, Jürgen;
SCHULZE, Renate y
KROHN, Michael**

74 Agente/Representante:
Illescas Taboada, Manuel

ES 2 386 766 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteasa para el acondicionamiento de heridas y el cuidado de la piel

- 5 La invención se refiere a composiciones farmacéuticas y cosméticas, así como a artículos médicos que comprenden una proteasa, denominada desbrilasa, de *Lucilia sericata* para su uso en el acondicionamiento de heridas y el cuidado de la piel. La desbrilasa se identificó usando el transcriptoma larvario, es decir preparaciones de ARNm y conversión en ADNc, y se preparó usando técnicas recombinantes y posterior expresión en células huésped adecuadas. La proteasa de la invención tiene actividad fibrinolítica, caseinolítica y activadora de PAR-2 (receptor
- 10 activado por proteasa 2). En una realización, se proporcionan composiciones que comprenden desbrilasa para la limpieza de células necróticas, tejido y manguitos de fibrina de heridas que cicatrizan lentamente o no cicatrizan, conocida como desbridamiento. En otra realización, se proponen usos cosméticos de la desbrilasa en el campo del cuidado y el alisado de la piel.
- 15 La invención se refiere además a una molécula de ácido nucleico que codifica una serina proteasa que tiene la capacidad de escindir fibrina y caseína, que es una molécula de ácido nucleico que codifica la serina proteasa que comprende o está constituida por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 4 así como a moléculas de ácido nucleico que codifican precursores o fragmentos de dicha serina proteasa. Además, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 3 y
- 20 una molécula de ácido nucleico que codifica una serina proteasa cuya secuencia de aminoácidos es al menos un 80%, más preferido al menos un 85% y la forma más preferida es al menos un 90% idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 3. Cualquiera de los ácidos nucleicos anteriores, en los que T se sustituye por U también están dentro del alcance de la invención.
- 25 La cicatrización de heridas tiene tres fases distintas: (1) inflamación; (2) migración y proliferación celular; y (3) remodelado. En la fase inflamatoria, las proteasas son liberadas por células del sistema inmunitario. Diversas linfoquinas son secretadas a partir de neutrófilos y macrófagos, que modulan la siguiente fase de la cicatrización de heridas. La segunda fase se denomina fase de proliferación e incluye migración de fibroblastos, proliferación y la síntesis de nuevas moléculas de la matriz extracelular. Estos eventos parecen producirse en un orden determinado
- 30 en el que moléculas de la matriz extracelular incluyendo fibronectina, colágeno y proteoglicanos son secretadas en el lecho de granulación. La fase inflamatoria alcanza un máximo a los 3 días. La segunda fase de la cicatrización de heridas normalmente alcanza un máximo aproximadamente de una a dos semanas después de la lesión y viene seguida por una tercera fase mucho más larga de remodelación tisular que comienza en un plazo de semanas y puede durar varios meses. Durante la fase de remodelación, la matriz de tejido conectivo madura a medida que las fibras de colágeno desorganizadas son sustituidas por moléculas de colágeno más gruesas y más alineadas. Esta remodelación tisular eventualmente contribuye a la resistencia a la tracción de la herida y, a menudo, está acompañada por la formación de una cicatriz.
- 35 Una lesión cutánea virtualmente siempre implica una lesión de los vasos sanguíneos. La cicatrización de heridas, por lo tanto, también comprende el proceso de coagulación, que es un proceso complejo mediante el cual la sangre forma coágulos. Ésta es una parte importante de la hemostasia, mediante la cual la pared de un vaso sanguíneo dañado es cubierta por un coágulo que contiene plaquetas y fibrina para detener la hemorragia y comenzar la reparación preferida del vaso dañado. Los trastornos de la coagulación pueden conducir a un mayor riesgo de hemorragia y/o trombosis. La coagulación se inicia casi instantáneamente después de que una lesión del vaso
- 45 sanguíneo haya dañado el endotelio. Las plaquetas forman inmediatamente un tapón hemostático en el sitio de la lesión (hemostasia primaria). La hemostasia secundaria se produce simultáneamente, en la que factores de coagulación en el plasma sanguíneo responden en una compleja cascada para formar hebras de fibrina que refuerzan el tapón plaquetario. La cascada de coagulación de la hemostasia secundaria tiene dos rutas, la ruta de activación por contacto (conocida anteriormente como la ruta intrínseca) y la ruta del factor tisular (conocida anteriormente como la ruta extrínseca) que conducen ambas a la formación de fibrina. Se sabe ahora que la ruta principal para la iniciación de la coagulación de la sangre es la ruta del factor tisular. Las rutas son una serie de reacciones, en las que un zimógeno (precursor enzimático inactivo) de una serina proteasa y su co-factor glucoproteico se activan para convertirse en componentes activos que catalizan a continuación la siguiente reacción en la cascada, dando como resultado finalmente fibrina reticulada. Los factores de coagulación son generalmente
- 50 serina proteasas, excepto por FVIII y FV que con glucoproteínas y el Factor XIII que es una transglutaminasa. La cascada de coagulación se divide convencionalmente en tres rutas. El factor tisular y la ruta de activación por contacto activan ambas la "ruta común final" de factor X, trombina y fibrina.
- 55 La fibrina es una proteína implicada en la coagulación de la sangre. Es una proteína fibrilar que es polimerizada para formar un tapón o coágulo hemostático - junto con plaquetas - en el sitio de una herida. La fibrina se prepara a partir de su zimógeno fibrinógeno, una glucoproteína soluble en plasma que es sintetizada por el hígado. En la cascada de coagulación, el zimógeno protrombina es activado a la serina proteasa trombina, que es responsable de convertir el fibrinógeno en fibrina. La fibrina es reticulada a continuación por el factor XIII para formar un coágulo.
- 60 La plasmina escinde proteolíticamente la fibrina en productos de degradación de fibrina, lo que inhibe la excesiva formación de fibrina. La plasmina es generada por la escisión proteolítica de plasminógeno, una proteína del plasma
- 65

sintetizada en el hígado. Esta escisión es catalizada por el activador de plasminógeno tisular (t-PA) que es sintetizado y secretado por el endotelio. El plasminógeno es atrapado durante la formación de coágulos y es activado lentamente cuando la herida ha dejado de sangrar y el coágulo se ha disuelto.

5 La desintegración del coágulo durante la cicatrización de heridas es una etapa importante para permitir la formación y la remodelación de la matriz, tal como se ha descrito anteriormente. Se piensa que una causa potencial para
 10 heridas de cicatrización lenta o crónicas es una falta de fibrinólisis. Los llamados "manguitos de fibrina", constituidos por fibrina, laminina, fibronectina, tenascina, colágeno y leucocitos dificultan el intercambio de nutrientes, factores de crecimiento y gas, conduciendo a anoxia, formación de úlcus y prevención de angiogénesis. La disolución
 15 proteolítica de estos "manguitos de fibrina" apoya la neovascularización, invasión de leucocitos, migración de fibroblastos, formación de un nuevo epitelio e induce la proliferación y la migración celulares. Además, la cicatrización de heridas es retardada por la presencia de pus, restos tisulares, bacterias y exudados que pueden ser
 20 retirados por agentes de desbridamiento.

15 El desbridamiento se define como la retirada de tejido no vital de las heridas. En heridas crónicas, el desbridamiento significa la eliminación de necrosis así como la retirada de los apósitos de heridas, cuerpos extraños y otras
 20 sustancias no vitales. El suficiente desbridamiento representa un prerrequisito básico para un proceso de cicatrización de heridas no retardado. Además de tratar los factores causantes de la cicatrización retardada de heridas, el desbridamiento debe ser la primera etapa en una preparación del lecho de la herida adaptado a la fase,
 25 adecuado para heridas crónicas. Se han descrito diferentes métodos de desbridamiento en heridas crónicas tales como cirugía, terapia con gusanos, láser, ultrasonidos, hidroterapia, método de húmedo a seco, autólisis, enzimas
 30 proteolíticas, desbridamiento osmótico o químico.

25 Los agentes de desbridamiento digieren rápidamente el tejido necrótico sin dañar a las células vivas, acelerando de este modo los procesos de cicatrización. La búsqueda de dichos agentes de desbridamiento ha incluido el empleo
 30 de una gran variedad de materiales vegetales y animales, tales como gusanos o larvas de mosca azul, pero también de enzimas como papaína, bromelaína y ananaína de origen vegetal (por ejemplo los documentos US 6548556, EP
 35 0194647 B1, US 5106621), proteasas de origen microbiano (por ejemplo proteasa de *Vibrio* esp., documento US 5145881; termolisina de *Bacillus* esp., documentos WO 03/088993 A1, US 2003/0198632 A1) y de animales (por
 40 ejemplo tripsina y quimotripsina de pescado, documento US 6846485). Algunas enzimas de desbridamiento funcionan como inhibidores de proteasa en la cascada de coagulación (nexina-1 inhibidora de trombina (PN-1),
 45 documento US 5112608) o en la reacción de fase aguda (alfa1-antitripsina, documento US 6262020). El propósito principal de las enzimas desbridantes es limpiar una herida de todos los diversos elementos de tejido necrótico y
 50 dispersar secreciones exudativas tenaces. Las enzimas proteolíticas aplicadas apropiadamente limpian superficies infectadas de su exudado inflamatorio sin dañar a los tejidos vivos. Éstas facilitan el drenaje de áreas de
 55 acumulaciones purulentas, sanguíneas y fibrinosas localizadas, promueven la liberación de bacterias ocultas haciéndolas accesibles para el sistema de defensa inmunitaria.

40 La acción enzimática de las enzimas desbridantes puede utilizarse para heridas no cicatrizantes (por ejemplo, documento Lobmann et al., *Proteases and the diabetic foot syndrome: Mechanisms and therapeutic Implications*.
 45 *Diabetes Care* 28 (2005), 461-471), pero también puede ser beneficiosa para el tratamiento de enfermedades cutáneas inflamatorias tales como psoriasis y eczema y similares, y afecciones cutáneas menos graves, tales como
 50 arrugas, acné y piel seca, como se describe por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos N° 4.524.136; 5.439.935; 5.441.740; 5.554.366; 5.853.705 y 6.780.444. También están disponibles productos comerciales que
 45 comprenden dichas enzimas, por ejemplo Accuzyme® (papaína) y Granulex® (tripsina), cuya aplicación está limitada para el desbridamiento de heridas.

50 Se ha realizado un esfuerzo continuo para encontrar mejores enzimas de desbridamiento de heridas. Algunos de los criterios para una enzima de desbridamiento de heridas altamente preferida son al menos uno y preferiblemente más
 55 tales como todos los siguientes: debe ser capaz de una digestión rápida de la fibrina, colágeno desnaturalizado, elastina y exudado; debe respetar los tejidos de piel humana de aspecto normal; no debe ser tóxica ni irritante para
 60 heridas; debe prepararse fácilmente, ser estable y fácilmente aplicable. Como ejemplo, composiciones enzimáticas concentradas estables adecuadas para el almacenamiento en condiciones ambiente, mientras mantienen la
 65 actividad enzimática y kits que comprenden composiciones enzimáticas, se describen en el documento WO 2007/074454 A2.

Varios enfoques para tratar heridas crónicas comprenden el uso de apósitos que mantienen a la herida hidratada para apoyar la viabilidad de células del sistema inmunitario que se infiltran en la herida.

60 Para el tratamiento de heridas, se propuso el uso de proteasas, es decir exo- y endopeptidasas, así como el uso de inhibidores de proteasa.

65 Un dispositivo a base de silicona para liberación controlada de enzimas para el desbridamiento proteolítico de heridas fue descrito por Bott et al. (*A silicone-based controlled-release device for accelerated proteolytic debridement of wounds*, *Wound Repair Regen.* (2007) 15: 227-35) que usa una proteasa de la familia de subtilisina. Análogamente, el documento US 7368128 describe un apósito para la liberación sostenida de enzimas desbridantes

constituidas por una capa de material absorbente y un material polimérico degradable.

5 Durante siglos, se ha sabido que los gusanos tienen efectos beneficiosos sobre las heridas. El método de Terapia de Desbridamiento con Gusanos (MDT) fue adoptado y usado de forma rutinaria en los Estados Unidos durante toda la década de 1930 y a principios de la década de 1940, pero la MDT fue sustituida por la introducción de la penicilina y modernos procedimientos quirúrgicos (Child FS, Roberts EF. The treatment of chronic osteomyelitis with live maggots. New York State J Med 1931; 31: 937-43; Teich S, Myers RAM. Maggot therapy for severe skin infections. South Med J 1986; 79: 1153-5; Church JCT. Larvae therapy in modern wound care: A review. Primary Intention 1999; Mayo: 63-8; Sherman RA, Hall MJR, Thomas S. Medicinal maggots: An ancient remedy for some contemporary afflictions. Ann Rev Entomol 45 (2000): 55-81, Courtenay, M. et al., Larva therapy in wound management, J. R. Soc. Med. 93 (2000): 72-74).

15 La aplicación de gusanos a una herida es percibida frecuentemente como desagradable e incluso dolorosa por el paciente. Sin embargo, las larvas de diferentes especies de insecto se utilizan para la limpieza y la cicatrización de heridas no tratables de forma convencional. Los gusanos de algunas especies de mosca se alimentan de tejido necrótico y, a través de su actividad desbridante, ayudan a la cicatrización de heridas crónicas de tejido blando, tales como úlceras de presión y por estasis venosa, infecciones de pie diabéticas, y heridas post-operatorias, que son resistentes a intervención quirúrgica o por antibióticos (Sherman RA. 1998, Maggot debridement in modern medicine. Infect Med 15: 651-6, Sherman RA, Hall MJR, Thomas S., 2000, Medicinal maggots: An ancient remedy for some contemporary afflictions. Ann Rev Entomol 45: 55-81).

20 Los gusanos medicinales ejercen tres acciones principales: 1) desbridan (limpian) heridas disolviendo el tejido muerto (necrótico), infectado; 2) desinfectan la herida, destruyendo bacterias; y 3) estimulan la cicatrización de heridas.

25 Horobin et al. (2006) describen MDT con larvas de *Lucilia sericata* o gusanos de la mosca verde que se aplican a heridas crónicas para ayudar a la cicatrización, desencadenando la migración de fibroblastos y la remodelación de la matriz (Horobin et al., Promotion of human dermal fibroblast migration, matrix remodelling and modification of fibroblast morphology within a novel 3D model by *Lucilia sericata* larval secretions, J Invest Dermatol. 126: 1410-1418). Previamente, han caracterizado algunas actividades enzimáticas presentes en excreciones/secreciones (ES) de gusano (Horobin et al. 2003, Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon interactions between human dermal fibroblasts and extracellular matrix components, Br. J. Dermatol. 148: 923-933).

35 La actividad bactericida de secreciones de gusanos de *Lucilia sericata* hacia colonizadores de heridas típicos tales como *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus* se demostró usando larvas del tercer estadio (Daeschlein, G. et al., 2007, In vitro antibacterial activity of *Lucilia sericata* maggot secretions, Skin Pharmacol. Physiol. 20: 112-115).

40 Las interacciones entre fibroblastos y la matriz extracelular circundante desempeñan un papel crucial en la formación de tejido, influyendo en la proliferación de fibroblastos, la migración y la remodelación tisular. Los mecanismos postulados mediante los cuales los gusanos mejoran la formación tisular en las heridas pueden ser mediante la promoción de la motilidad de fibroblastos, la aceleración de la remodelación de la matriz extracelular y la coordinación de respuestas celulares, posibilitando una distribución más amplia de fibroblastos viables. Se demostró que los productos de ES de *L. sericata* promovían la migración de fibroblastos sobre una superficie recubierta de fibronectina y que esto estaba relacionado con la degradación de fibronectina por serina proteasas en excreciones/secreciones de gusano (Chambers et al. 2000, Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds, Brit J Dermatol. 148: 14-23).

50 Una gran y diversa familia de genes de serina proteasa fue identificada en el ADNc del primer estadio larvario de la mosca del estiércol, *Lucilia cuprina* (Elvin et al. 1994, An estimate of the number of serine protease genes expressed in sheep blowfly larvae (*Lucilia cuprina*)" Insect Molecular Biol 3: 105-115). Dos proteínas similares a quimotripsina se purificaron a partir de los productos de ES de larvas de primer estadio de *Lucilia cuprina* (Casu et al. 1994, Excretory/secretory chymotrypsin from *Lucilia cuprina*: purification, enzymatic specificity and amino acid sequence deduced from mRNA, Insect Molecular Biol 3: 201-211). Diversos inhibidores de proteasa activos contra serinas proteínas similares tanto a tripsina como a quimotripsina se usaron para caracterizar buenas proteasas de *Lucilia cuprina* mediante ensayos de alimentación *in vitro* (Casu et al. 1994, Isolation of a trypsin-like serine protease gene family from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*, Insect Molecular Biol 3: 159-170). Se observó un retardo significativo del crecimiento larvario al alimentar a larvas del primer estadio con inhibidores de tripsina, particularmente el inhibidor de tripsina de soja. La alimentación con quimostatina, un inhibidor específico de quimotripsina, no dio como resultado ningún retardo significativo del crecimiento. Esta información sugiere que las serina proteasas similares a tripsina son, probablemente, las principales enzimas digestivas del intestino. Además, Borovsky et al. (1996) Eur. J. Biochem. 237: 279-287 identificaron y secuenciaron un ADNc de longitud completa que codifica tripsina de mosca gris, *Neobellieria bullata*.

65 Chambers et al. (2003, Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from greenbottle larva

Lucilia sericata used for the clinical debridement of non-healing wounds, British J. Dermatol 148: 14-23) describen proteasas con actividades contra fibrina y componentes de la matriz extracelular en larvas del primer al tercer estadio de la mosca verde *Lucilia sericata*. Descubrieron la actividad específica más alta en excreciones de las fases larvarias tempranas (primer y segundo estadio). Se piensa que las proteasas con actividades similares quimotripsina y tripsina contenidas en productos excretorios/secretorios (ES) de larvas contribuyen al desbridamiento de heridas mediante la retirada de tejido necrótico. Se detectaron tres clases de enzima proteolítica en las secreciones usando caseína marcada con isotiocianato de fluoresceína como sustrato modelo: serina proteinasas (pH óptimos 8-9) de dos subclases diferentes (similares a tripsina y similares a quimotripsina), aspartilo proteinasa (pH óptimo 5) y una metaloproteinasa (pH óptimo 9) con características de exopeptidasa. Usando componentes de la MEC relevantes para la piel como sustratos, los productos de ES de *L. sericata* disolvieron coágulos de fibrina y degradaron fibronectina, laminina y tipos de colágeno I y III disueltos en ácido.

A pesar de estos resultados, todavía hoy los científicos y médicos buscan el principio activo tras la enorme cantidad de proteínas proteolíticamente activas en las larvas. Se sabe que las secreciones larvarias son capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular (MEC)/la herida, fibronectina, laminina y colágenos I, III, IV y V. Estas macromoléculas se descubren en el esfacelo de heridas crónicas y también componen los "manguitos de fibrina" que son predominantes en úlceras crónicas. La degradación de laminina y fibronectina por secreciones larvarias es inhibida por PMSF, pero no significativamente por APMSF o por el inhibidor de metaloproteinasa 1,10-fenantrolina. La actividad de las secreciones larvarias muestra un pH óptimo de 8,0 - 8,5 (Chambers et al. 2000, Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the green bottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds, Brit J Dermatol. 148: 14-23), lo que no es coherente con el amplio intervalo de pH de ácido a básico en heridas crónicas. Por lo tanto, existe una necesidad de enzimas desbridantes con actividad en un intervalo de pH mucho más amplio que el descrito para las secreciones larvarias.

En el documento US 7144721 B1 se especula que la principal actividad proteolítica en secreciones larvarias es una actividad de serina proteinasa y que hay dos tipos de actividad de serina proteinasa presentes; uno derivado de una enzima quimotriptica y otro derivado de una enzima triptica. El documento US 2008/0108551 A1 proporciona pruebas de que la degradación de la matriz extracelular es una etapa importante en la cicatrización de heridas mediada por proteasas por *Lucilia sericata*. En dicha solicitud se postulan una serina proteasa y una metaloproteasa aisladas de productos de excreción/secreción de *Lucilia sericata*, que degradan el componente de la matriz extracelular fibronectina o aumentan la migración celular, respectivamente. Aparentemente, los productos de degradación biológicamente activos de fibronectina promueven la cicatrización de heridas. En el documento WO 2007/138361 A3 se describe una quimotripsina de larvas de *Lucilia sericata* para su uso en el tratamiento de heridas. Proteínas adicionales que están aparentemente implicadas en la cicatrización de heridas como una nucleasa (documento WO 2007/122424 A2) y un ligando para el receptor similar a *toll* (documento US 2005/0053597 A1) se identificaron en los productos de secreción de larvas de *Lucilia sericata*.

A pesar del progreso realizado en los últimos años en el desarrollo de composiciones de desbridamiento, sería deseable proporcionar compuestos o composiciones de desbridamiento claramente definidas que comprenden componentes definidos con propiedades al menos similares si no mejoradas en comparación con los materiales de la técnica anterior descritos anteriormente. Este objetivo podría conseguirse, por ejemplo, identificando el principio activo responsable de la cicatrización mejorada proporcionada por los gusanos. Dichos compuestos también serían útiles para aplicaciones cosméticas.

Por consiguiente, en una primera realización, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica

(i) una serina proteasa que tiene la capacidad de escindir fibrina y caseína, que es (a) una molécula de ácido nucleico que codifica la serina proteasa que comprende o está constituida por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 4; (b) una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 3; (c) una molécula de ácido nucleico que codifica una serina proteasa cuya secuencia de aminoácidos es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a); preferiblemente al menos un 85 % idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, y la forma más preferida es al menos un 95% idéntica; (d) una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de nucleótidos de (b), preferiblemente al menos un 85% idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, y la forma más preferida es al menos un 95% idéntica; (e) una molécula de ácido nucleico que está degenerada con respecto a la molécula de ácido nucleico de (d); o (f) una molécula de ácido nucleico correspondiente a la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de (a) a (d) en la que T es sustituida por U;

(ii) un fragmento de la serina proteasa de (i) con la misma actividad que la serina proteasa de (i);

(iii) un propéptido de la serina proteasa de (i) que es escindido a su forma activa preferiblemente inmediatamente antes o durante el tratamiento de una herida, en el que el propéptido es codificado por una molécula de ácido nucleico seleccionada entre (a) una molécula de ácido nucleico que codifica el propéptido de serina proteasa que comprende o está constituida por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 6; (b) una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 5; (c) una molécula de ácido nucleico que codifica un propéptido de serina proteasa cuya secuencia de aminoácidos es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a); preferiblemente al menos un

85% idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, y la forma más preferida es al menos un 95% idéntica; (d) una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de nucleótidos de (b), preferiblemente al menos un 85% idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, y la forma más preferida es al menos un 95% idéntica; (e) una molécula de ácido nucleico que está degenerada con respecto a la molécula de ácido nucleico de (d); o (f) una molécula de ácido nucleico correspondiente a la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de (a) a (d) en la que T es sustituida por U; o

(iv) un pre-propéptido de la serina proteasa de (i), en el que el pre-propéptido es codificado por una molécula de ácido nucleico seleccionada entre (a) una molécula de ácido nucleico que codifica el pre-propéptido de serina proteasa que comprende o está constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2; (b) una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1; (c) una molécula de ácido nucleico que codifica un pre-propéptido de serina proteasa cuya secuencia de aminoácidos es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a); preferiblemente al menos un 85% idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, y la forma más preferida es al menos un 95% idéntica; (d) una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de nucleótidos de (b), preferiblemente al menos un 85% idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, y la forma más preferida es al menos un 95% idéntica; (e) una molécula de ácido nucleico que está degenerada con respecto a la molécula de ácido nucleico de (d); o (f) una molécula de ácido nucleico correspondiente a la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de (a) a (d) en la que T es sustituida por U.

La expresión "molécula de ácido nucleico" de acuerdo con la presente invención incluye ADN, tal como ADNc o ADN genómico, y ARN. También se incluyen moléculas imitadoras de ácidos nucleicos conocidas en la técnica tales como derivados sintéticos o semi-sintéticos de ADN o ARN y polímeros mixtos. Dichas moléculas imitadoras de ácidos nucleicos o derivados de ácido nucleico de acuerdo con la invención incluyen ácido fosforotioatonucleico, ácido fosforamidatonucleico, ácido 2'-O-metoxietilribonucleico, ácido morfolinonucleico, ácido hexitolnucleico (AHN), ácido péptidonucleico (APN) y ácido nucleico bloqueado (ANB) (véase Braasch y Corey, Chem Biol 2001, 8: 1). El ANB es un derivado de ARN en el que el anillo de ribosa está constreñido por un enlace metileno entre el oxígeno 2' y el carbono 4'.

La expresión "serina proteasa" caracteriza a proteínas que tienen actividad proteolítica como pertenecientes a un subgrupo cuyos miembros comprenden una serina en su centro activo que, junto con histidina y aspartato, forma la triada catalítica común a la mayoría de las serina proteasas (Rawlings, N.D., Barrett, A.J. (1994). Families of serine peptidases. Meth. Enzymol. 244: 19-61). Las serina proteasas se clasifican como hidrolasas y pertenecen al subgrupo del esquema de clasificación numérica EC 3.4.21. Las proteínas codificadas por la molécula de ácido nucleico de la invención pueden exhibir ellas mismas la actividad proteolítica de una serina proteasa (por ejemplo SEQ ID No. 4) o después de maduración o activación adicional (por ejemplo SEQ ID No. 2 ó 6), por ejemplo mediante procesamiento proteolítico; véase también la descripción del propéptido de la invención a continuación. El procesamiento proteolítico puede incluir el corte de un péptido señal de un pre-propéptido (por ejemplo el pre-propéptido que tiene la SEQ ID No. 2) y el procesamiento proteolítico adicional del propéptido (por ejemplo el propéptido que tiene la SEQ ID No. 6) mediante escisión proteolítica.

La expresión "péptido señal", tal como se usa en este documento, define una corta secuencia de aminoácidos (preferiblemente, de 3-60 aminoácidos de largo) que dirige el transporte de una proteína a un compartimento celular particular y, preferiblemente, al retículo endoplasmático.

El término "propéptido", tal como se usa en este documento, describe una cadena molecular lineal de aminoácidos, que es un precursor de una proteína y es escindida durante la maduración o la activación de la proteína (por ejemplo la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 6 o una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 5). El término "pre-propéptido", tal como se usa en este documento, es un precursor del propéptido e incluye además un péptido señal (por ejemplo la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 2 o una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 1). Éste es el principal producto de la traducción. Además, si el pre-propéptido se aplica a una herida, es escindido a su forma activa preferiblemente inmediatamente antes o durante el tratamiento de dicha herida.

La expresión "que tiene la capacidad de escindir fibrina y caseína" preferiblemente se refiere solamente a la actividad de la proteína madura pero también puede incluir la actividad pendiente (a conseguir mediante la escisión o escisiones mencionadas) del pre-propéptido y el propéptido que son precursores de la proteína madura.

El término "proteína", tal como se usa en este documento de forma intercambiable con el término "polipéptido" o "péptido", describe cadenas moleculares lineales de aminoácidos, incluyendo proteínas de cadena sencilla o sus fragmentos, que contienen preferiblemente más de 30 aminoácidos. Un tramo de aminoácidos de 30 aminoácidos y menos de 30 aminoácidos normalmente se llamaría solamente péptido pero no polipéptido. Dependiendo de las circunstancias, el término "proteína" o "polipéptido" en este documento puede indicar la proteína madura (por ejemplo la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 4 o una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 3), el propéptido (por ejemplo la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

No. 6 o una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 5) o el pre-propéptido (por ejemplo la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 2 o una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 1). Los polipéptidos pueden formar, además, oligómeros constituidos por al menos dos moléculas idénticas o diferentes. Las estructuras de orden superior correspondientes de dichos multímeros son, de forma correspondiente, denominadas homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros etc. Además, peptidomiméticos de dichas proteínas/polipéptidos donde el aminoácido o aminoácidos y/o el enlace o enlaces peptídicos han sido sustituidos por análogos funcionales también son abarcados por la invención. Dichos análogos funcionales incluyen todos los aminoácidos conocidos diferentes de los 20 aminoácidos codificados por genes, tales como selenocisteína. Los términos “polipéptido”, “proteína” y “péptido” también se refieren a polipéptidos/proteínas modificadas de forma natural, y péptidos en los que la modificación es realizada, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, fosforilación y modificaciones similares que se conocen bien en la técnica.

En relación con los fragmentos de la presente invención, la expresión “la misma actividad” se refiere a las actividades biológicas como se enumeran en este documento que están presentes en fragmentos de la serina proteasa desbrilasa de acuerdo con la invención. Los fragmentos de acuerdo con esta realización de la presente invención pueden ser polipéptidos o péptidos de igual o menos de 30 aminoácidos, dependiendo de su longitud.

De acuerdo con la presente invención, la expresión “porcentaje (%) de identidad de secuencia” describe el número de emparejamientos (“*aciertos*”) de nucleótidos/aminoácidos idénticos de dos o más secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos alineadas en comparación con el número de restos de nucleótidos o de aminoácidos que componen la longitud global de las secuencias plantilla de ácido nucleico o aminoácido. En otras palabras, usando un alineamiento, para dos o más secuencias o subsecuencias puede determinarse el porcentaje de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo el 80%, 85%, 90% o 95% de identidad), cuando las (sub)secuencias se comparan y alinean para la máxima correspondencia en una ventana de comparación, o sobre una región designada según lo medido usando un algoritmo de comparación de secuencias como se conoce en la técnica, o cuando se alinean de forma manual y se inspeccionan visualmente. Esta definición también se aplica al complemento de una secuencia de ensayo.

El análisis y alineamiento de la secuencia de aminoácidos en relación con la presente invención se realizó usando el algoritmo NCBI BLAST (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997), “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). El especialista en la técnica está al tanto también de programas adecuados para alinear secuencias de ácido nucleico.

Las sustituciones en la secuencia de aminoácidos de la serina proteasa de la presente invención en comparación con las SEQ ID No. 2, 4 ó 6 son preferiblemente conservativas. Esto significa que las sustituciones preferiblemente tienen lugar en una clase de aminoácidos. Por ejemplo, un aminoácido cargado positivamente muta preferiblemente a otro aminoácido cargado positivamente. Lo mismo se cumple para las clases de aminoácidos básicos, aromáticos o alifáticos.

El término “degenerado/a”, de acuerdo con la presente invención, se refiere a la degeneración del código genético. La degeneración se produce debido a que un código de tres letras designa a 20 aminoácidos y un codón de terminación. Dado que existen cuatro bases que se utilizan para codificar información genética, se requieren codones de tres letras para producir al menos 21 códigos diferentes. Las posibles 4^3 posibilidades para bases en tripletes dan 64 posibles codones, lo que significa que debe existir cierta degeneración. Como resultado, algunos aminoácidos son codificados por más de un triplete, es decir por hasta seis. La degeneración surge principalmente a partir de alteraciones en la tercera posición en un triplete. Esto significa que moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia diferente de esa especificada anteriormente, pero que siguen codificando el mismo polipéptido, están dentro del alcance de la presente invención.

El problema encontrado a menudo cuando las heridas no cicatrizan en el momento apropiado es la retirada de los “manguitos de fibrina” y el tejido necrótico para permitir la infiltración de fibroblastos y, por lo tanto, el inicio del proceso de cicatrización de la herida. Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que la serina proteasa codificada por el ácido nucleico de la presente invención tiene excelentes propiedades para preparar a la herida para la cicatrización natural disolviendo estos manguitos de fibrina. Es una serina proteasa biológicamente activa la que se cree que es el principio activo fundamental de la actividad de cicatrización de heridas de *Lucilia sericata*. La enzima también se denomina en este documento como “desbrilasa”, en referencia a su uso sugerido para el desbridamiento de heridas.

Las larvas de *Lucilia sericata* se usan generalmente en la práctica clínica como organismos vivos para tratar heridas que son resistentes al tratamiento convencional. Dado que la terapia con gusanos es bastante desagradable para muchos pacientes y las secreciones de los insectos están lejos de ser una composición farmacéutica definida, los inventores de la presente invención se han propuesto identificar al menos uno de los principios activos del desbridamiento de heridas mediante un enfoque molecular.

La generación de una biblioteca de ADNc a partir de ARNm (el transcriptoma) de larvas del segundo estadio alimentadas en agar-sangre condujo a la identificación de un ácido nucleico que codifica una proteasa similar a tripsina y la secuencia de aminoácidos correspondiente expresada con alta abundancia que es probable que sea la principal proteasa implicada en el desbridamiento de heridas mediante larvas de *Lucilia sericata*. La enzima no se descubrió en bibliotecas de ADNc obtenidas de ARNm aislado de larvas de 5 días de edad (tercer estadio). Esto corresponde a la disminución de la actividad desbridante con fases larvarias en aumento (Chambers et al. 2003).

El cribado de dichas bibliotecas en busca de actividad proteolítica en caseína produjo varias secuencias de ADNc que codifican proteasas en el transcriptoma de larvas de segundo estadio inducidas por sustrato-sangre. El análisis de secuencias de ADNc en la biblioteca de larvas de segundo estadio inducidas condujo a la identificación de proteasas presentes solamente en la biblioteca de ADNc generada a partir de larvas del segundo estadio pero no en el transcriptoma de larvas en la fase posterior (tercer estadio). Algunas de las proteasas descubiertas mostraban similitud de la secuencia de ácido nucleico con fosfoquimotripsina, tripsina o quimotripsina, respectivamente. No se descubrieron proteasas de tipo metalo-, treonina-, cisteína-, ácido aspártico o ácido glutámico.

En un primer cribado de placa de agar en leche desnatada, se descubrió que varios clones de ADNc secretan enzimas con actividad caseinolítica pero solamente uno mostraba actividad también en un sustrato que contiene fibrina. Esta enzima se caracterizaba en detalle mediante expresión recombinante y evaluación de sus propiedades bioquímicas en diferentes ensayos.

El análisis de la secuencia de ácido nucleico reveló tres proteasas de tipo serina y dos proteasas de tipo tripsina con alta abundancia en el ARNm de larvas inducidas. Las proteasas de tipo tripsina revelaban actividad fibrinolítica y caseinolítica. El análisis de la secuencia de aminoácidos de una de las proteasas fibrinolíticas que corresponde a la desbrilasa representada por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID No. 4 y codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID No. 2 mostraba una identidad de la secuencia de proteínas del 76,1% con una proteasa similar a tripsina de *Sarcophaga sp.*, como similitud más estrecha con enzimas conocidas usando el algoritmo NCBI BLAST (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Se descubrió que la desbrilasa se expresaba con alta abundancia, de este modo es probable que sea la proteasa fundamental implicada en el desbridamiento de heridas por larvas de *Lucilia sericata*. La desbrilasa se expresa y se traduce como pre-propéptido que incluye un péptido señal y aminoácidos propeptídicos (Figura 5A). La activación de la actividad enzimática se consigue eliminando por escisión el péptido señal y escindiendo adicionalmente el propéptido, generando de este modo la proteína madura (SEQ ID No. 4) de desbrilasa, en la que el propéptido es aparentemente escindido adicionalmente mediante autoproteolisis. La proteína madura es codificada preferiblemente por la molécula de ácido nucleico constituida por la SEQ ID No. 3. La desbrilasa madura tiene la capacidad de escindir fibrina y caseína. Su actividad puede inhibirse completamente mediante PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo) y APMSF (fluoruro de 4-amidinofenilmetanosulfonilo). No se detectó inhibición usando inhibidores para proteasas de tipo metalo-, treonina-, cisteína- o ácido aspártico. Esto muestra que la proteína es una serina proteasa y tiene actividad similar a tripsina.

Se sabe que las condiciones de heridas progresivas abarcan un amplio intervalo de pH (Greener B et al 2005. Proteases and pH in chronic wounds. J Wound Care; 14(2)). En otro estudio detallado, se analizaron 247 valores de pH en 39 pacientes con heridas crónicas de orígenes variados en un periodo de 12 meses, detectando valores de 5,45 a 8,65 (Dissemond, J. et al., 2003, pH-Wert des Milieus chronischer Wunden, Untersuchungen im Rahmen einer modernen Wundtherapie, Der Hautarzt 54, No. 12, 959-965). La desbrilasa es altamente estable y activa en un intervalo de pH de 5-10 lo que le hace adecuada en la aplicación en heridas crónicas que ejercen el amplio intervalo de pH, tal como se ha descrito anteriormente.

Además, en un ensayo de activación de receptor celular, se descubrió que la desbrilasa tiene la capacidad de activar el receptor activado por proteasa 2 (PAR 2). PAR 2 es un miembro de la gran familia de receptores 7-transmembrana que se acoplan a proteínas de unión al nucleótido guanosina. PAR 2 es también miembro de la familia del receptor activado por proteasa. Es activado por tripsina, pero no por trombina. La tripsina consigue la escisión proteolítica del extremo amino extracelular del receptor y el nuevo extremo amino funciona como un ligando relacionado y activa el receptor. PAR 2 desempeña un papel importante en la inflamación y el dolor, en la proliferación de fibroblastos (Asano-Kato et al., Tryptase increases proliferative activity of human conjunctival fibroblasts through protease-activated receptor-2, Invest Ophthalmol Vis Sci., 2005 46(12): 4622-6) y en la formación de tejido conectivo que contribuye a la cicatrización de heridas (Borensztajn K. et al., 2008, Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation, 1: Am J Pathol. 172(2): 309-20). Por lo tanto, la enzima similar a tripsina de la invención escindiendo el ligando relacionado activa el receptor que, a continuación, desencadena procesos bioquímicos implicados en promover la cicatrización de heridas. Por ejemplo, está previsto que la desbrilasa pueda utilizarse ventajosamente para disolver "manguitos de fibrina" que se observan frecuentemente en heridas que no cicatrizan, para retirar tejido necrótico y para desencadenar una cascada mediada por el receptor de respuestas inmunitarias y celulares.

Ésta es la primera descripción y caracterización después de la expresión recombinante de una proteasa de *Lucilia sericata* con actividad fibrinolítica, caseinolítica y activadora de PAR 2 y un amplio intervalo de pH de su actividad

enzimática a nivel molecular. Esta previsto que la desbrilasa y fragmentos de la misma con actividad desbrilasa tengan la capacidad de preparar y pre-tratar heridas de cicatrización lenta o crónicas para hacerlas susceptibles a procesos de cicatrización naturales y/o tratamiento médico convencional desbridando la herida, es decir retirada de tejido muerto y disolución de manguitos de fibrina. Además, están previstos usos cosméticos que implican tratamientos cutáneos para mejorar el aspecto o la textura de la piel. La aplicación del propéptido a una herida conducirá a una conversión en la proteína madura mediante escisión enzimática.

La presente invención también se refiere a un a vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención, es decir una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína madura, el propéptido o el pre-propéptido tal como se describe en la memoria descriptiva. Además, el vector puede contener una molécula de ácido nucleico que codifica un fragmento, tal como se ha descrito anteriormente.

Un vector de acuerdo con esta invención es capaz de dirigir la replicación, y/o la expresión de la molécula de ácido nucleico de la invención y/o la expresión del polipéptido codificado por ella.

Preferiblemente, el vector es un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector usado convencionalmente, por ejemplo, en ingeniería genética.

Plásmidos y vectores ejemplares se enumeran, por ejemplo, en Studier y colaboradores (Studier, W.F.; Rosenberg A.H.; Dunn J.J.; Dubendroff J.W., 1990, Use of the T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, Methods Enzymol. 185, 61-89) o los folletos suministrados por las compañías Novagen, Promega, New England Biolabs, Clontech y Gibco BRL. Otros plásmidos y vectores preferidos pueden encontrarse en: Glover, D.M., 1985, DNA cloning: a practical approach, Vol. I-III, IRL Press Ltd., Oxford; Rodriguez, R.L. y Denhardt, D.T. (eds), 1988, Vectors: as survey _ of molecular cloning vectors and their uses, 179-204, Butterworth, Stoneham; Goedeel, D.V., 1990, Systems for heterologous gene expression, Methods Enzymol. 185, 3-7; Sambrook, J.; Russell, D. W., 2001, Molecular cloning: a laboratory manual, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

Los ejemplos no limitantes de vectores adecuados incluyen vectores de plásmidos procariotas, tales como la serie pUC, pBluescript (Stratagene), la serie pET de vectores de expresión (Novagen) o pCRTPOPO (Invitrogen), lambda gt11, pJOE, la serie pBBR1-MCS, pJB861, pBSMuL, pBC2, pUCPKS, pTACT1 y vectores compatibles con la expresión en células de mamífero como pREP (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, plZD35, el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogene), pSPORT1 (GIBCO BRL), pGEMHE (Promega), pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems) pTriEx-Hygro (Novagen) y pCINeo (Promega). Los ejemplos de vectores plasmídicos adecuados para *Pichia pastoris* comprenden, por ejemplo, los plásmidos pAO815 pPIC9K y pPIC3.5K (todos de Invitrogen).

La molécula de ácido nucleico de la presente invención mencionada anteriormente también puede insertarse en vectores, de modo que se genere una fusión traduccional con otra molécula de ácido nucleico. Los productos que surgen de ella se denominan proteínas de fusión y se describirán adicionalmente a continuación. Las otras moléculas de ácido nucleico pueden codificar una proteína que puede aumentar, por ejemplo, la solubilidad y/o facilitar la purificación de la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención. Los ejemplos no limitantes incluyen pET32, pET41, pET43. Los vectores también pueden contener un ácido nucleico expresable adicional que codifica una o más chaperonas para facilitar el correcto plegamiento de la proteína. Los huéspedes de expresión bacteriana adecuados comprenden, por ejemplo, cepas derivadas de BL21 (tales como BL21(DE3), BL21(DE3)PlysS, BL21 (DE3)RIL, BL21 (DE3)PRARE) o Rosetta®.

Los plásmidos particularmente preferidos que pueden usarse para introducir el ácido nucleico que codifica la serina proteasa de la invención en la célula huésped son: pUC18/19 (Roche Biochemicals), pKK-177-3H (Roche Biochemicals), pBTac2 (Roche Biochemicals), pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech), pKK-233-3 (Stratagene) y pET (Novagen). Plásmidos adecuados adicionales se enumeran en el documento PCT/EP03/07148. Se da una preferencia muy particular a un sistema de expresión que se basa en plásmidos que pertenecen a la serie pET.

Para técnicas de modificación de vectores, véase Sambrook y Russel, 2001. Generalmente, los vectores pueden contener uno o más orígenes de replicación (ori) y sistemas de herencia para donación o expresión, uno o más marcadores para selección en el huésped, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y una o más casetes de expresión. Los orígenes de replicación adecuados incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación Col E1, el viral de VS40 y el M 13. Las secuencias codificantes insertadas en el vector pueden sintetizarse por ejemplo mediante métodos convencionales, o aislarse de fuentes naturales. El ligamiento de las secuencias codificantes a elementos reguladores de la transcripción y/o a otras secuencias codificantes de aminoácidos puede realizarse usando métodos establecidos. Los elementos reguladores de la transcripción (partes de una casete de expresión) que aseguran la expresión en células procariotas o eucariotas son bien conocidos por los especialistas en la técnica. Estos elementos comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción (por ejemplo, codón de inicio de traducción, promotores, potenciadores y/o aisladores), sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) (Owens *et al.*, 2001) y opcionalmente señales de poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales

así como traduccionales, y/o regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico de la invención está unida de forma operativa a dichas secuencias de control de la expresión permitiendo la expresión en células procariotas o eucariotas. El vector puede comprender, además, secuencias de nucleótidos que codifican señales de secreción como elementos reguladores adicionales. Dichas secuencias son bien conocidas por el especialista en la técnica. Además, dependiendo del sistema de expresión usado, secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido expresado a un compartimento celular pueden añadirse a la secuencia codificante de la molécula de ácido nucleico de la invención. Dichas secuencias líderes se conocen bien en la técnica. Vectores diseñados específicamente permiten el traslado de ADN entre diferentes huéspedes, tales como bacterias-células fúngicas o bacterias-células animales.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención, tal como se han descrito anteriormente en este documento, pueden estar diseñadas para la introducción directa o para la introducción mediante liposomas, vectores de fago o vectores virales (por ejemplo adenovirales, retrovirales) en la célula. Adicionalmente, los sistemas baculovirales o sistemas basados en Virus Vaccinia o Virus Semliki Forest pueden usarse como vector en un sistema de expresión eucariota para las moléculas de ácido nucleico de la invención. Los vectores de expresión obtenidos de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, virus adeno-asociados, herpesvirus, o virus del papiloma bovino, pueden usarse para la administración de los ácidos nucleicos o vectores en la población celular diana. Los métodos que son bien conocidos por los especialistas en la técnica pueden usarse para construir vectores virales recombinantes; véase, por ejemplo, las técnicas descritas en el documento Sambrook, 2001 y Ausubel, 2001.

Promotores que son particularmente ventajosos para implementar la invención y que se usarán, en particular, en *E. coli* son conocidos por el especialista en la técnica (Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York). Promotores adecuados adicionales son los seleccionados entre T7, lac, tac, trp, ara o promotores inducibles por ramnosa. Otros promotores se mencionan en (Cantrell, SA (2003) Vectors for the expression of recombinant proteins in *E. coli*. Methods in Molecular biology 235: 257-275; Sawers, G; Jarsch, M (1996) Alternative principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology 46(1): 1-9). Se da una preferencia muy particular al uso del promotor T7 en el vector de acuerdo con la invención (Studier, W.F.; Rosenberg A.H.; Dunn J.J.; Dubendroff J.W.; (1990), Use of the T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, Methods Enzymol. 185, 61-89; o folletos suministrados por las compañías Novagen o Promega).

Los ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas son el promotor AOX1 o GAL1 en levadura o el promotor de CMV- (Citomegalovirus), VS40-, VSR (virus del sarcoma de Rous), promotor de beta-actina de pollo, promotor CAG (una combinación de promotor de beta-actina de pollo y potenciador inmediato temprano de citomegalovirus), el promotor gai10, promotor del factor de elongación humano 1 α , potenciador de CMV, promotor de CaM-quinasa, el promotor poliédrico del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (VPNMAc) o un intrón de globina en células de mamífero y otras células animales. Además de elementos que son responsables del inicio de la transcripción dichos elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio poli-A de VS40 o el sitio poli-A de tk o las señales de poliadenilación de VS40, lacZ y VPNMAc poliédrico, cadena abajo del ácido nucleico.

La co-transfección con un marcador seleccionable tal como genes de resistencia a kanamicina o ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias permite la identificación y el aislamiento de las células transfectadas.

Los marcadores seleccionables para el cultivo de células de mamífero son los genes de resistencia de dhfr, gpt, neomicina, higromicina. El ácido nucleico transfectado también puede amplificarse para expresar grandes cantidades del (poli) péptido codificado. El marcador de DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que portan varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy et al. 1991; Bebbington et al. 1992).

Usando dichos marcadores, las células se cultivan en medio selectivo y las células con la mayor resistencia se seleccionan.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a una célula huésped transformada, transducida o transfectada con el vector de la invención.

Las células huésped en las que pueden clonarse vectores que contienen la molécula de ácido nucleico de la invención se usan para replicar y aislar una cantidad suficiente de la enzima recombinante. Los métodos usados para este fin son bien conocidos por el especialista en la técnica (Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York).

Las células huésped procariotas adecuadas comprenden, por ejemplo, bacterias de la especie *Escherichia*, tales como cepas obtenidas de *E. coli* BL21 (por ejemplo BL21(DE3), BL21(DE3)PlysS, BL21(DE3)RIL, BL21(DE3)PRARE, BL21 codon plus, BL21 (DE3) codon plus), Rosetta®, XL1 Blue, NM522, JM101, JM109, JM105, RR1, DH5 α , TOP 10, HB101 o MM294. Células huésped bacterianas adecuadas adicionales son *Streptomyces*, *Salmonella* o *Bacillus* tales como *Bacillus subtilis*. Las cepas de *E. coli* son células huésped procariotas preferidas en

relación con la presente invención.

5 Células huésped eucariotas adecuadas son, por ejemplo, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* o *Pichia sp.*, tales como *P. pastoris*, células de insecto tales como células de *Drosophila S2* o *Spodoptera Sf9*, o células vegetales.

Se da una preferencia muy particular a un sistema de expresión que está presente en *E. coli* BL21 como huésped procariota y *Pichia pastoris* como huésped eucariota.

10 Células huésped de mamífero que podrían usarse incluyen células Hela, HEK293, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C127 de ratón, células COS 1, COS 7 y CV1, QC1-3 de codorniz, células L de ratón, células de melanoma de Bowes y células de ovario de hámster chino (CHO).

15 La presente invención se refiere, además, a un método de producción de una serina proteasa, un fragmento, un propéptido o pre-propéptido de la misma, tal como se ha descrito anteriormente que comprende cultivar la célula huésped de la invención y aislar la serina proteasa, el fragmento, el propéptido o el pre-propéptido producido.

20 Las condiciones adecuadas para cultivar un huésped procariota o eucariota son bien conocidas por el especialista en la técnica. Por ejemplo, condiciones adecuadas para cultivar bacterias son cultivarlas con aireación en medio Luria Bertani (LB). Para aumentar el rendimiento y la solubilidad del producto de expresión, el medio puede tamponarse o suplementarse con aditivos adecuados que se sabe que potencian o facilitan ambos. *E. coli* puede cultivarse de 4 a aproximadamente 37°C, la temperatura o secuencias de temperatura exactas dependen de la molécula a sobreexpresar. En general, el especialista en la técnica también está al tanto de que estas condiciones pueden tener que adaptarse a las necesidades del huésped y los requisitos del polipéptido expresado. En el caso de
25 que un promotor inducible controle el ácido nucleico de la invención en el vector presente en la célula huésped, la expresión del polipéptido puede inducirse mediante la adición de un agente de inducción apropiado. Los protocolos y estrategias de expresión adecuados son conocidos por el especialista en la técnica.

30 Dependiendo del tipo celular y sus requisitos específicos, el cultivo de células de mamífero puede realizarse, por ejemplo, en medio RPMI o DMEM que contiene el 10% (v/v) de FCS, L-glutamina 2 mM y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. Las células pueden mantenerse a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂, saturada en agua.

35 Los medios adecuados para el cultivo de células de insecto son, por ejemplo, TNM + el 10% FCS o medio SF900. Las células de insecto se cultivan habitualmente a 27°C como cultivo de adhesión o suspensión.

Protocolos de expresión adecuados para células eucariotas son bien conocidos por el especialista en la técnica y pueden recuperarse, por ejemplo, de Sambrook, 2001.

40 Los métodos de aislamiento del polipéptido producido se conocen bien en la técnica y comprenden, sin limitación, etapas del método tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel (cromatografía de exclusión molecular), cromatografía de afinidad, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), HPLC de fase inversa, electroforesis en disco de gel o inmunoprecipitación, véase, por ejemplo, en Sambrook, 2001.

45 La presente invención se refiere además a una serina proteasa, o fragmento, que tiene la capacidad de escindir fibrina y caseína; o propéptido, o pre-propéptido que es escindido a su forma activa inmediatamente antes o durante el tratamiento de una herida, codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención. Tal como se ha mencionado, esta serina proteasa también se denomina como "desbrilasa".

50 Tal como se ha descrito anteriormente, la serina proteasa de la invención se caracteriza por que (i) se origina a partir de *Lucilia sericata*, (ii) muestra actividad proteolítica contra fibrina, caseína y Tosyl-Gly-Pro-Arg-AMC, pero no contra Suc-Ala-Ala-Phe-AMC. (iii) La actividad proteolítica de la serina proteasa de la invención contra caseína y fibrina es inhibida por los inhibidores de serina proteinasa PMSF y APMSF y (iv), la desbrilasa preferiblemente activa el receptor activado por proteasa PAR-2. Pudo demostrarse, sorprendentemente, que es activa en un amplio intervalo
55 de pH entre pH 5 y 10 (véase la figura 3B).

60 Tal como se ha mencionado, la invención se refiere, además, a un propéptido de la serina proteasa de la invención que es escindido a su forma activa preferiblemente inmediatamente antes o durante el tratamiento de una herida. Este propéptido preferiblemente tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 6 y también preferiblemente es codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID No. 5.

65 En una realización adicional, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende la serina proteasa de la invención, el fragmento de la serina proteasa de la invención, el propéptido de la invención o el pre-propéptido de la invención.

Además de la secuencia de aminoácidos de la serina proteasa (desbrilasa), el fragmento, el propéptido o el pre-

propéptido de la misma de la presente invención desbrilasa, una proteína de fusión de acuerdo con la presente invención contiene al menos una secuencia de aminoácidos heteróloga adicional. A menudo, pero no necesariamente, estas secuencias adicionales estarán localizadas en el extremo N- o C-terminal del polipéptido. Puede ser conveniente, por ejemplo, expresar inicialmente el polipéptido como una proteína de fusión a partir de la cual los restos de aminoácidos adicionales pueden retirarse, por ejemplo mediante una proteinasa capaz de recortar específicamente el polipéptido de la presente invención.

Las proteínas de fusión ejemplares de desbrilasa, un fragmento de la misma o el (pre-)propéptido de desbrilasa comprenden además un péptido o proteína que puede funcionar para mediar la adhesión de la proteína de fusión a una matriz contenida en apósitos de heridas para conseguir una incorporación estable de desbrilasa en el artículo médico de la invención. La proteína de fusión puede seleccionarse entre el grupo de proteínas activas en superficie o anticuerpos y fragmentos de los mismos. Las propiedades de anticuerpos y fragmentos de los mismos se describirán adicionalmente a continuación en relación con el anticuerpo de la invención.

La presente invención se refiere, además, a una composición que comprende la serina proteasa de la invención, el fragmento de la serina proteasa o fragmento de la misma de la invención, el propéptido de la invención, el pre-propéptido de la invención, la proteína de fusión de la invención, el ácido nucleico de la invención, el vector de la invención, la célula huésped de la invención, o combinaciones de las mismas.

En una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición para administración a un paciente, preferiblemente un ser humano. La composición farmacéutica se usa preferiblemente en una situación adyuvante, es decir para preparar la herida de cicatrización lenta para procesos de cicatrización naturales o tratamiento médico convencional retirando tejido necrótico y disolviendo manguitos de fibrina (desbridamiento). La composición farmacéutica de la invención comprende los compuestos mencionados anteriormente, en solitario o en combinación. La composición puede estar en forma sólida o líquida y puede estar, *inter alia*, en forma de un polvo o polvos, una solución o soluciones o un aerosol o aerosoles, crema o cremas, pomada o pomadas o gel o geles. La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender, opcional y adicionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende una carga, diluyente, material de encapsulado o auxiliar de formulación sólido, semi-sólido o líquido no tóxico, de cualquier tipo. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se conocen bien en la técnica. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse mediante métodos convencionales bien conocidos. La composición farmacéutica puede administrarse por vía tópica. El régimen de dosificación correspondiente a una dosis adecuada para administración será determinado por el facultativo asistente y factores clínicos que pueden, *inter alia*, depender del tamaño de la herida, la fase de gravedad de su estado. La concentración del compuesto o compuestos tal como se ha mencionado anteriormente en una composición para aplicación tópica puede estar en el intervalo del 0,001 al 1% (p/p), preferiblemente el 0,01-0,1 % (p/p). La aplicación tópica sobre heridas se repite, preferiblemente, en una o más de una aplicaciones diarias.

El compuesto o compuestos, tal como se han mencionado anteriormente, pueden usarse como ingrediente activo en una composición farmacéutica para el desbridamiento de heridas crónicas y de cicatrización lenta mediante disolución del manguito de fibrina. La composición farmacéutica de acuerdo con la invención se usa, preferiblemente, en una situación adyuvante, es decir para preparar a la herida de cicatrización lenta para procesos de cicatrización naturales o tratamiento médico convencional retirando tejido necrótico y disolviendo manguitos de fibrina (desbridamiento).

La composición farmacéutica de la invención puede aplicarse en combinación con vehículos o matrices (sólidas) tales como apósito o apósitos, tirita o tiritas o esparadrapo o esparadrapos. El compuesto o compuestos pueden estar unidos covalente o no covalentemente a dicho vehículo o matriz. Estos pueden aplicarse a heridas para promover la cicatrización de heridas.

Por ejemplo, el compuesto o compuestos pueden incorporarse en un apósito a aplicar sobre la herida. Los ejemplos de dichos apósitos incluyen apósitos estratificados o en capas que incorporan partículas hidrocoloides de liberación lenta que contienen el material de cicatrización de heridas o esponjas que contienen el material de cicatrización de heridas opcionalmente cubiertas por apósitos convencionales. La concentración de una solución de la composición farmacéutica a inmovilizar en una matriz de un apósito de herida está generalmente en el intervalo del 0,001 al 1% (p/v) preferiblemente el 0,01-0,1% (p/v). Además, el compuesto o compuestos, tal como se han enumerado anteriormente, pueden incorporarse en un material adecuado capaz de administrar la enzima a una herida de una manera de liberación lenta y controlada.

La renovación del apósito de la herida debe repetirse a intervalos apropiados (por ejemplo 24 h) hasta que se consiga la completa retirada del manguito de fibrina y el tejido necrótico. El apósito es adecuado para cualquier herida que comprende tejido necrótico incluyendo úlceras de pierna, llagas de presión, úlceras diabéticas de pie y quemaduras. Preferiblemente, el apósito comprende una capa de material absorbente tal como hidrocoloides, espuma, por ejemplo espuma de poliuretano, alginatos, quitosano, de modo que pueda usarse en heridas exudantes

al tiempo que se protege la piel circundante de la maceración. La capa en contacto con la herida puede recubrirse con un excipiente, por ejemplo vaselina, para impedir que el apósito se pegue a la herida. El compuesto o compuestos de acuerdo con la invención pueden incorporarse en un material polimérico tal como, por ejemplo, celulosa, polilactatos, polivinilos, copolímeros acrílicos y puede integrarse en el apósito de diferentes maneras. En una realización, el material polimérico está en forma de una película sobre la superficie orientada hacia la herida del apósito. Una alta concentración del compuesto o compuestos se desea en la superficie del apósito que está en contacto con el lecho de la herida para obtener un desbridamiento más eficaz debido a una elevada liberación inicial de la enzima. La película puede estar en forma de una capa o puede estar recubriendo a una red.

10 Especialmente en el caso de quemaduras de tercer grado, pueden usarse tiritas que comprenden desbrilasa como enzima desbridante en una terapia de desbridamiento de heridas.

En una formulación que comprende el compuesto o compuestos anteriores, opcionalmente comprendidos en un vehículo estéril, la composición farmacéutica de la invención en forma líquida puede rociarse sobre el área de la herida o, en forma sólida o líquida, incorporarse en un vehículo a aplicar a la herida.

En una realización preferida, la serina proteasa de la invención está comprendida en un vehículo sólido tal como un apósito de herida o esparadrapo que está en su forma inactiva y puede activarse a través de escisión de un (pre-)propéptido tal como se ha descrito anteriormente mediante diferentes medios, por ejemplo, cuando se pone en contacto con exudado de la herida. Se prefiere que la actividad enzimática dure durante el tiempo de uso recomendado del apósito, dependiendo de la cantidad de exudado.

Una formulación en gel de la composición farmacéutica de la presente invención comprende, además, al menos un agente formador de gel usado habitualmente en formulaciones de gel farmacéuticas. Los ejemplos de agentes formadores de gel son derivados de celulosa tales como metilcelulosa, hidroxietilcelulosa y carboximetilcelulosa; polímeros de vinilo tales como alcoholes polivinílicos, polivinilpirrolidonas; y derivados de carboxipoli-metileno tales como carbopol. Agentes gelificantes adicionales que pueden usarse para la presente invención son pectinas, gomas, alginatos, agar y gelatina. Además, la formulación de gel o emugel puede contener agentes auxiliares usados habitualmente en este tipo de formulaciones tales como conservantes, antioxidantes, estabilizantes, colorantes y perfumes.

En otra realización preferida, la composición es una composición cosmética.

Una composición cosmética de acuerdo con la invención se utiliza en aplicaciones no terapéuticas.

Las composiciones cosméticas también pueden definirse mediante su uso pretendido, como composiciones para ser frotadas, vertidas, rociadas pulverizadas, o aplicadas de otro modo al cuerpo humano para limpiar, embellecer, promover el atractivo o alterar el aspecto.

La formulación particular de la composición cosmética de acuerdo con la invención no está limitada. Las formulaciones previstas incluyen soluciones de aclarado, emulsiones, cremas, leches, geles tales como hidrogeles, pomadas, suspensiones, dispersiones, polvos, barritas sólidas, espumas, pulverizados y champús. Para este fin, la composición cosmética de acuerdo con la invención puede comprender, además, diluyentes y/o vehículos cosméticamente aceptables. La elección de los vehículos y diluyentes apropiados dependiendo de la formulación deseada está al alcance del especialista en la técnica. Los diluyentes y vehículos cosméticamente aceptables adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen agentes mencionados en Bushell et al. (WO 2006/053613). Las formulaciones preferidas para dicha composición cosmética son soluciones de aclarado y cremas.

La aplicación de la composición de la invención en cosmética está dirigida a tratar a la piel enzimáticamente para exfoliar y alisar y/o intervenir con la formación de cicatrices. Se cree que una concentración adecuada del compuesto o compuestos de la invención para uso cosmético está en el intervalo del 0,0001 al 1% (p/v), preferiblemente del 0,0001 al 0,1% (p/v), aún más preferiblemente del 0,001 al 0,1 % (p/v).

Las cantidades preferidas de las composiciones cosméticas de acuerdo con la invención a aplicar en una única aplicación están entre 0,1 y 10 g, más preferidas entre 0,1 y 1 g, de la forma más preferida 0,5 g. La cantidad a aplicar también depende del tamaño del área a tratar y tiene que adaptarse a ella.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la serina proteasa de la invención, el fragmento de la serina proteasa de la invención, el propéptido de la invención, el pre-propéptido de la invención, la proteína de fusión de la invención, el ácido nucleico de la invención, el vector de la invención o la célula huésped de la invención para la preparación de una composición cosmética para exfoliación de la piel, alisado de la piel o la intervención con la formación de cicatrices, siendo la forma más preferida en forma de una terapia adyuvante.

La invención se refiere, además, a la serina proteasa de la invención, el fragmento de la serina proteasa de la invención, el propéptido de la invención, el pre-propéptido de la invención, la proteína de fusión de la invención, el ácido nucleico de la invención, el vector de la invención o la célula huésped de la invención para su uso en el

tratamiento de heridas.

Las particularidades de la composición que comprende el compuesto o compuestos de la invención a usar en relación con las anteriores aplicaciones en cosmética y terapéutica se han descrito anteriormente.

5 En una realización preferida, las heridas son heridas crónicas o de cicatrización lenta.

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para tratar una herida para promover su cicatrización en un mamífero humano o no humano que comprende aplicar a la herida una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición estéril que comprende la serina proteasa, el fragmento de la misma, el propéptido, el pre-propéptido, la proteína de fusión, el ácido nucleico, el vector o la célula huésped de acuerdo con la invención como ingrediente activo. La invención también se refiere al uso de un compuesto de la invención tal como se han enumerado anteriormente en la preparación o la fabricación de un artículo médico como una tiritá, apósito o esparadrápalo para el desbridamiento de heridas y la disolución del manguito de fibrina.

15 La invención se refiere, además, a la serina proteasa de la invención, el fragmento de la serina proteasa de la invención, el propéptido de la invención, el pre-propéptido de la invención, la proteína de fusión de la invención, el ácido nucleico de la invención, el vector de la invención o la célula huésped de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades cutáneas acompañadas por lesiones cutáneas y/o cicatrización alterada de heridas. Los ejemplos de dichas lesiones cutáneas y/o cicatrización alterada son psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto y eczema y urticaria.

20 En una realización preferida, la composición de la invención comprende adicionalmente al menos un componente seleccionado entre el grupo de una proteasa, nucleasa, excipiente, agente anti-microbiano y agente que alivia el dolor adicional.

30 El proceso de desbridamiento, así como los cambios de apósito, pueden dar origen a dolor para el paciente y, por lo tanto, puede preferirse incorporar un agente que alivia el dolor tal como un compuesto analgésico o anestésico en el apósito de la presente invención.

El apósito de la presente invención puede comprender además composiciones desbridantes diferentes de enzimas, que pueden tener un efecto desbridante aditivo o sinérgico. Un ejemplo de dicho compuesto puede ser la urea.

35 La invención también se refiere a un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo que se une específicamente a la serina proteasa de la invención, o un fragmento de la misma o el propéptido o pre-propéptido de la serina proteasa de la invención.

40 Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención se une específicamente a la serina proteasa (desbrilasa) tal como se ha descrito en detalle anteriormente en este documento o fragmentos de la misma que tienen la actividad de desbrilasa tal como se ha descrito anteriormente o el propéptido o pre-propéptido de la serina proteasa de la presente invención.

45 El anticuerpo de la presente invención puede ser, por ejemplo, policlonal o monoclonal. El término "anticuerpo" también comprende derivados o fragmentos del mismo que siguen conservando la especificidad de unión. Dichos fragmentos comprenden, *inter alia*, fragmentos Fab, F(ab')₂, fragmentos Fv o derivados scFv. Las técnicas para la producción de anticuerpos y fragmentos de los mismos se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 y Harlow y Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. Estos anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, para inmunoprecipitación o purificación por afinidad de desbrilasa o fragmentos de la misma.

50 El anticuerpo de la invención también incluye realizaciones tales como anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados. En la técnica se conocen diversos procedimientos y pueden usarse para la producción de dichos anticuerpos y/o fragmentos. Además, técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos para desbrilasa o fragmentos de la misma etc., descritos anteriormente. Además, pueden usarse animales transgénicos para expresar anticuerpos humanizados específicos de desbrilasa o fragmentos de la misma. De la forma más preferible, el anticuerpo de esta invención es un anticuerpo monoclonal. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos de línea celular continuos. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen la técnica de hibridoma (Köhler y Milstein Nature 256 (1975), 495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) y la técnica de hibridoma de VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96). La resonancia del plasmón superficial tal como se emplea en el sistema BIAcore puede usarse para aumentar la eficiencia de anticuerpos de fago que se unen a un epítipo de los compuestos descritos anteriormente (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). También está previsto, en el contexto de esta invención, que el término "anticuerpo" comprenda construcciones de anticuerpo que pueden expresarse en células, por ejemplo construcciones de anticuerpo que

pueden ser transfectadas y/o transducidas mediante, entre otros, vectores virales o plasmídicos. Una vez que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención se ha obtenido, el propio anticuerpo o el ADN que le codifica puede secuenciarse proporcionando la información para producir de forma recombinante el anticuerpo de la invención a pequeña o gran escala. Los métodos de producción de un anticuerpo recombinante son conocidos por el especialista en la técnica.

La expresión “se une específicamente”, usada de forma intercambiable con “interactúa específicamente con”, de acuerdo con la presente invención, significa que el anticuerpo no reacciona o esencialmente no reacciona de forma cruzada con un epítipo de estructura similar. La reactividad cruzada de un panel de anticuerpos en investigación puede ensayarse, por ejemplo, evaluando la unión de dicho panel de anticuerpos en condiciones convencionales para el epítipo de interés así como a una serie de epítopos más o menos estrechamente relacionados (estructural y/o funcionalmente). Solamente aquellos anticuerpos que se unen al epítipo de interés en su contexto relevante (por ejemplo un motivo específico en la estructura de una proteína) pero no se unen o esencialmente no se unen a ninguno de los otros epítopos, se consideran específicos para el epítipo de interés y, por lo tanto, que son anticuerpos de acuerdo con esta invención. Métodos correspondientes se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane, 1988 y 1999, *loc cit.*

La invención se describe en este documento, a modo de ejemplo solamente, en referencia a los dibujos adjuntos con fines de descripción ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención.

Las figuras muestran:

Figura 1: Ensayo de difusión en agar que contiene caseína que muestra una zona de aclaramiento alrededor de un clon de *E. coli* que secreta desbrilasa.

Figura 2: Ensayo de actividad en agar que contiene fibrina que muestra una zona de aclaramiento alrededor de la muestra activa de desbrilasa A) clon positivo para desbrilasa que crece sobre sustrato que contiene fibrina, B) ensayo de difusión en agar con extractos en bruto de un clon de *E. coli* recombinante positivo para desbrilasa; (a) extracto en bruto sin diluir b) dilución 1:10 en PBS c) dilución 1:50 en PBS.

Figura 3: A) ensayo enzimático para identificar el perfil de actividad de desbrilasa recombinante mediante el uso de inhibidores de serina proteasa (PMSF) y de serina proteasa similar a tripsina (APMSF); B) ensayo de actividad con desbrilasa en tampones de diferentes valores de pH para identificar el perfil de pH de desbrilasa recombinante.

Figura 4: Activación de PAR 2 en un ensayo de receptor de base celular con células HEK232 con flujo de Ca^{2+} como lectura.

Figura 5: Alineamiento de los aminoácidos del pre-propéptido de desbrilasa (A) y la secuencia de nucleótidos de ADNc (B) con la secuencia vecina más próxima siendo la proteína similar a tripsina de *Sarcophaga bullata* que muestra el 76% de identidad para la secuencia de nucleótido y de proteína usando el algoritmo NCBI BLAST. (A) El péptido señal de desbrilasa está constituido por los aminoácidos 1 a 16 (el péptido señal se muestra en negrita), el propéptido está constituido por los aminoácidos 17 a 254 (los aminoácidos propeptídicos 17 a 26 están subrayados) y el polipéptido maduro procesado proteolíticamente de desbrilasa está constituido por los aminoácidos 27 a 254.

Figura 6: (A) SDS PAGE del sobrenadante del cultivo: 1) después del centrifugado; 2) pre-filtración [0,45 μ m]; 3) filtración estéril [0,22 μ m], peso molecular del propéptido 25,7 kDa. (B) Visualización de desbrilasa madura activada: 5) después de diálisis y el posterior desplazamiento de pH de 5,5 a 8; 6) flujo a través de la columna de cromatografía de afinidad (proteína no unida); 7) flujo de lavado a través de, (8 a 12) elución fraccionada 1 a 5, respectivamente (peso molecular de la proteína madura 24,6 kDa).

Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

Métodos y materiales generales

Aislamiento de ARNm de diferentes fases larvarias de *Lucilia sericata*

Gusanos de 2 días de edad de la mosca verde (*Lucilia sericata*) se adquirieron de BioMonde (BioMonde, 22885 Barsbüttel, Alemania). El aislamiento del ARN total se realizó después de alimentar durante 24 horas (fase del segundo estadio) en agar-sangre (1,5% (p/v) de agar que contenía el 10% de sangre bovina) para potenciar la producción de proteasas y después de 3 días cuando la producción de enzima se reduce marcadamente en la fase de tercer estadio (Chambers et al. 2000, Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds, Brit J Dermatol. 148:

14-23). Para el aislamiento de ARN total, 3 larvas (aproximadamente 30 mg) se congelaron súbitamente con nitrógeno líquido y se pulverizaron mecánicamente. El ARN se aisló usando el kit "Total RNA Isolation, NucleoSpin RNA II" (adquirido de Macherey-Nagel, 52313 Düren, Alemania) produciendo 47 µg de ARN total.

5 Generación de una biblioteca de ADNc de *E. coli* a partir del ARN total aislado de larvas de *Lucilia sericata*

La generación de una biblioteca de ADNc a partir de dicho ARN de *Lucilia sericata* se consiguió de acuerdo con el manual de instrucciones "SMART cDNA Library Construction Kit User Manual" (CLONTECH Laboratories, Inc.). El envasado in vitro de la reacción de ligamiento final y la posterior transformación en *E. coli* XL-1 Blue dio como resultado $1,5 \times 10^6$ unidades formadoras de placa primarias.

Los fagos primarios se recogieron y se almacenaron en tampón de estabilización de fagos que contenía el 7% de DMSO a -80°C para la posterior infección y extirpación de masa en *E. coli*.

15 La conversión de la biblioteca del fago lambda en la biblioteca de plásmidos correspondiente se realizó mediante extirpación de masa mediada por recombinasa "Cre" de los plásmidos embebidos en el fago de acuerdo con el manual "SMART cDNA Library Construction Kit User Manual" (CLONTECH Laboratories, Inc.).

La heterogeneidad y la calidad de la biblioteca se ensayaron mediante análisis de restricción

20

Identificación de proteasas a partir de la biblioteca de ADNc de *Lucilia sericata*

Unidades formadoras de colonias resultantes de la extirpación de masa descrita anteriormente se cribaron en medio agar que contenía el 2% de leche desnatada en condiciones selectivas. La expresión de proteasas heterólogas fue impulsada por el vector que comprende el promotor P_{lac} inducible. Las colonias que expresaban proteasas heterólogas se detectaron mediante la formación de zonas de aclaramiento en el turbio medio de leche desnatada alrededor de las colonias.

25

Aislamiento y purificación de la proteína desbrilasa a partir de cultivo de expresión de *E. coli*

30

Para obtener muestras de enzima de la desbrilasa que contengan suficiente actividad enzimática para una caracterización de la enzima se usaron el clon de ADNc que expresa la proteasa correspondiente o una construcción de expresión más adecuada preparada en un vector de expresión típico como por ejemplo el vector pET26b (Novagen) y un huésped de expresión adecuado como por ejemplo *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen). Para construir las construcciones de expresión, los genes de desbrilasa correspondientes se amplificaron por PCR para introducir secuencias de reconocimiento de enzima de restricción únicas cadena arriba y cadena abajo del marco abierto de lectura (ORF) lo que permitió ligar los genes que codifican la proteasa con el vector de expresión, por ejemplo pET26b, de manera definitiva. Las secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción se seleccionaron en base a su ausencia en la región codificante del gen de desbrilasa y podían ser, por ejemplo, NdeI, HindIII, EcoRI, XhoI. La ausencia de mutaciones de segundo sitio no deseadas debido a amplificación errónea por la polimerasa se confirmó mediante secuenciación del amplicón clonado.

35

40

Los clones de ADNc o las construcciones de expresión se usaron para inocular, por ejemplo, 200 ml de medio de cultivo complementado con el antibiótico apropiado en un matraz Erlenmayer de 1 l. Se usaron medio LB y antibióticos en las siguientes concentraciones: 100 µg/ml de ampicilina, 25 µg/ml de kanamicina, cloranfenicol 12,5 µg/ml. La densidad óptica inicial (DO_{580}) se ajustó a 0,05 y las células se cultivaron a una temperatura de 28°C en un agitador giratorio. Cuando la densidad óptica alcanzó el valor de aproximadamente 1 la expresión a partir del promotor lac de pTriplEx2 (Clontech) o a partir del promotor T7 de vectores de la serie de vector pET por ejemplo pET26 se indujo mediante adición de IPTG a la concentración de 20 µM - 500 µM. Las células se recogieron de 4 a 20 h después de la inducción por centrifugado. El sedimento celular se resuspendió en 5 ml de 1 x PBS, pH 7,0 y las células se rompieron mediante ultrasonificación.

45

50

El peso molecular de la desbrilasa es de 27,4 kD para la proteína completa que incluye la secuencia señal, 25,7 para el hipotético pro-peptido y 24,6 para la proteína madura.

55

Ensayo de actividad en fase sólida para actividad fibrinolítica

Para identificar actividad fibrinolítica en extractos de clones que degradan caseína se usó un ensayo en agar sólido. Para esto, una solución A que contenía 200 mg de agarosa, 87 mg de NaCl y 3 mg de $CaCl_2$ se añadió a 10 ml de Tris 0,1 M pH 7,4 y se incubó a 50°C. A una segunda solución B que contenía 10 ml de NaCl al 0,9% y 100 mg de Fibrina (Sigma F3879), se le añadieron 20 µl de Plasminógeno (2 unidades/mg, Sigma P7397) y se preincubaron a 50°C. Ambas soluciones se combinaron con 12 µl de Trombina (175-350 unidades de NIH, Sigma T4265) y se extendieron sobre placas de agar usando dispositivos de formación de micropocillos. En el caso de una actividad fibrinolítica aparece una zona clara en el medio opaco alrededor de las cavidades que contienen el extracto.

60

65

Para identificar la actividad fibrinolítica en clones que degradan caseína se usó un ensayo en agar sólido. Por lo

tanto, un medio A que estaba constituido por 10 ml 2x de Luria Bertani que contenía 200 mg de agarosa, 87 mg de NaCl y 3 mg de CaCl₂ se incubó a 50°C. A una solución B que contenía 10 ml de NaCl al 0,9% y 100 mg de Fibrina (Sigma F3879), se le añadieron 20 µl de plasminógeno (2 unidades/mg, Sigma P7397) y se pre-incubaron a 50°C. Ambas soluciones se combinaron con 12 µl de trombina (175-350 unidades de NIH, Sigma T4265) y antibióticos apropiados para la selección y se vertieron en placas de agar en condiciones estériles formando un medio de agar opaco. En el caso de actividad fibrinolítica expresada mediante clones heterólogos una zona clara aparece alrededor de la colonia después de incubación durante una noche.

Ensayo de actividad en fase líquida y perfiles inhibidores

La cuantificación de la actividad proteolítica se realizó mediante un ensayo de fluorescencia en placas de 96 pocillos con BODIPY-FL-Casein (Molecular Probes) usado como sustrato. Por la presente, en el sustrato no digerido, caseína, las moléculas de marcado están en contacto estrecho entre sí y, por lo tanto, la fluorescencia se suprime mediante un mecanismo de extinción. En el caso de hidrólisis, estas moléculas se separan entre sí y la fluorescencia puede excitarse a 485 nm y medirse a 520 nm.

Un ensayo convencional contenía 5 µg/ml de BODIPY-FL-Casein en 100 µl de tampón PBS y una serie de diluciones de extracto de proteasa. Las muestras se incubaron durante 60 minutos a 37°C y la fluorescencia se midió usando un espectrofotómetro (NovoStar, BMG LABTECH, Offenburg, Alemania), aplicando los siguientes parámetros: excitación 485 nm, emisión 520 nm, ganancia 5, un ciclo, 10 fogonazos. Se usaron inhibidores de serina proteasa APMSF (fluoruro de 4-amidinofenilmetanosulfonilo) y PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo) para ensayar la especificidad de la proteasa aislada. Se usaron las siguientes concentraciones de ensayo:

PMSF = inhibidor de serina proteasa 5 mmol/l

APMSF = inhibidor de serina proteasa similar a tripsina 1 mmol/l

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitan el alcance de la presente invención. Pueden realizarse variaciones razonables, tales como las que se le ocurran al especialista en la técnica, en este documento sin alejarse del alcance de la presente invención.

Cultivo de expresión de *Pichia pastoris*

La expresión heteróloga de la serina proteasa de la invención, es decir desbrilasa, se realizó en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, que está clasificada como organismo GRAS por la *Food and Drug Administration* y está establecida, por lo tanto, para procesos de producción farmacéutica. Para la expresión se usó un sistema de vector integrativo, proporcionando un promotor inducible por metanol. El péptido señal nativo de desbrilasa ("MFRFVALFAFVSCALA") se sustituyó por la secuencia señal del factor codificado por el vector de *Saccharomyces cerevisiae* para facilitar la eficiente secreción en *Pichia*. La fermentación se realizó en medio mineral con glicerol como única fuente de carbono en la fase del primer lote, el modo de lote alimentado se inició después del consumo del lote inicial de glicerol. La inducción de la expresión heteróloga se inició mediante suplementación de metanol con inductor /fuente de carbono y sorbitol como alimentación no inhibidora adicional durante la expresión génica.

El crecimiento estacionario del cultivo se alcanzó después de la fase de lote/lote alimentado (FB) que conduce a una Densidad Óptica de aproximadamente 600. La inducción se inició añadiendo MeOH. Para prevenir que la enzima heteróloga se active de forma autocatalítica en este punto, la temperatura del proceso se redujo de 30°C a 20°C. La expresión de desbrilasa estuvo soportada en la fase final del proceso mediante alimentación. La activación autocatalítica del propéptido se consiguió aumentando el pH del medio de cultivo de 5,5 a 6,8, durante el procedimiento de purificación (véase a continuación).

Purificación de la proteína desbrilasa a partir del cultivo de expresión del cultivo de *Pichia pastoris*

La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad usando el inhibidor de serina proteasa benzamidina acoplado a material portador de sepharose (GE Healthcare). Después de la retirada de la proteína no unida purificada, la serina proteasa de la invención se recogió mediante elución competitiva usando tampón con adición de benzamidina libre. La SDS PAGE del procedimiento cadena abajo se visualiza en la figura 6. Después de la posterior diálisis contra tampón de almacenamiento citrato, la proteína purificada se liofilizó y se visualizó como un polvo seco blanco.

Secuenciación N-terminal de desbrilasa expresada de forma recombinante

Para la secuenciación de Edman, la transferencia se colocó en el cartucho de preparación de la muestra. Para la determinación de la secuencia de aminoácidos, se usó el secuenciador de proteínas Procise 492 (Applied Biosystems). Los reactivos y protocolos se aplicaron según lo recomendado por el fabricante. Los cromatogramas resultantes se analizaron usando el software apropiado (Applied Biosystems). Antes de cada muestra se hicieron pasar una muestra convencional y un blanco.

Ejemplos 1Cribado para proteasas en una biblioteca de expresión generada a partir de *Lucilia sericata*

- 5 Una biblioteca de fagos de 8×10^6 clones primarios se cribó en busca de la expresión de proteasas. Con este fin, la biblioteca de fagos se transfirió a una biblioteca de plásmidos mediante co-infección de *E. coli* con un fago ayudante de tipo f1 de acuerdo con el manual "SMART cDNA Library Construction Kit User Manual" (CLONTECH Laboratories, Inc.). Las colonias resultantes albergan los plásmido intrínsecos escindidos del vector de fago.
- 10 La heterogeneidad de la biblioteca de plásmidos se ensayó mediante aislamiento de cuarenta plásmidos de clones representativos. De hecho, cada plásmido albergaba un inserto y estos insertos mostraban una completa diversidad de tamaño. En total, 3×10^5 ufc se cribaron en medios sólidos que contenían el 2% de leche desnatada en condiciones selectivas.
- 15 Mediante el aislamiento y la secuenciación de ADN plasmídico de dieciséis de estas colonias formadoras de halo, se identificó una secuencia de pre-propéptido de una proteasa con el 76% de identidad a nivel de aminoácidos con una enzima similar a tripsina de *Sarcophaga bullata* (SEQ ID No. 2).

Ejemplo 2

20

Caracterización de una proteasa fibrinolítica

La identificación de actividad fibrinolítica se realizó en ensayos en placa de agar descritos anteriormente. Las colonias que expresaban actividad fibrinolítica se identificaron sembrando en estrías células recombinantes en agar nutriente que contenía sustrato de fibrina turbio. Las células que albergan plásmidos con la proteasa identificada mostraban zonas claras alrededor de la colonia después de incubación durante una noche a 37°C.

La actividad fibrinolítica en extractos en bruto libres de células se determinó usando medio agar tamponado que contenía fibrina. Las placas contenían pocillos con una capacidad de hasta 200 μ l que se formaron usando dispositivos de microplaca durante la solidificación del medio agar. Las células recombinantes se sonicaron y el extracto resultante se centrifugó, se colocó en los pocillos de agar y se incubó durante una noche a 37°C. El extracto en bruto con actividad fibrinolítica se detectó mediante una zona clara alrededor de micropocillos del clon recombinante que alberga el gen de proteasa de la SEQ ID No. 1.

Ejemplo 3Perfil de una proteasa fibrinolítica

El tipo de la proteasa recombinante se identificó en un ensayo líquido en una placa de 96 pocillos usando inhibidores específicos para diferentes tipos de proteasas. En este documento, se midieron inhibidores específicos para tripsina (fluoruro de 4-amidinofenilmetilsulfonilo, APMSF), serina (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF), proteasas de tipo aspartil (pepstatina A) y metalo (1,10-fenantrolina). Tal como se muestra en la figura 3 A, el perfil inhibitor del clon recombinante sugiere una actividad de tipo tripsina, que corresponde a datos de alineamiento de la secuencia de aminoácidos comparativa de la SEQ ID No. 2 con la base de datos BLAST, que muestra que la homología más cercana es el 76% con respecto a una enzima de *Sarcophaga bullata* (Figura 5).

Ejemplo 4Estabilidad a diferentes valores de pH

La actividad de la desbrilasa se midió en ensayo líquido usando sistemas tampón apropiados en el intervalo de 3-10 (tampón de ácido cítrico de 0,1 a 0,2 M, pH 3-7; tampón tris 0,05 M, pH 8; tampón carbonato 0,1 M, pH 9-10) y el sustrato fluorógeno Z-Gly-Gly-Arg-AMC. La liberación de 7-amino-4-metilcoumarina (AMC) se midió con un fluorímetro BMC Novostar Fluorometer ($\lambda_{excitación}$ 365 nm, $\lambda_{emisión}$ 440 nm). Los resultados se muestran en la figura 3 B. La desbrilasa muestra actividad enzimática en un intervalo de pH de 5-10 que corresponde al intervalo de pH análogamente amplio del medio de la herida.

Ejemplo 5Activación de PAR 2 (Formación de imágenes del calcio)

La actividad de desbrilasa como agonista de PAR 2 se monitorizó en el tiempo en un ensayo de fluorescencia a base de células mediante el uso de una línea celular HEK293 de tipo silvestre expresada de forma endógena que expresa PAR2 humano. En resumen, 1 día antes de realizar en ensayo, células HEK293 que expresan PAR2 humano se sembraron en placas de ensayo de paredes negras de 96 pocillos, a una densidad de 45.000 células por pocillo. Usando un lector de microplacas de 96 pocillos (FlexStation®, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), el cambio

de la concentración de calcio celular se monitorizó mediante el uso del colorante fluorescente sensible a calcio, fluo-4 (excitación 494 nm, emisión 516 nm). El agonista de PAR 2 tripsina (8 nM) se usó como control positivo. Las células cargadas de colorante en placas se colocaron en el lector de microplacas de fluorescencia para monitorizar el cambio de fluorescencia (excitación 488 nm, emisión 520 nm) después de la adición de 50 μ l de tampón de ensayo (NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; MgSO₄ 1,2 mM KH₂PO₄ 1,2 mM NaHCO₃ 4,2 mM; CaCl₂ 1,3 mM; HEPES 10 mM (pH: 7,4)) suplementado con un agonista. La movilización de calcio se cuantificó como el cambio de la fluorescencia máxima (ΔF) respecto al nivel inicial (F). Los datos se expresaron como el error estándar de la media del valor $\Delta F/F$ (= UFR, unidades de fluorescencia relativa) de muestras independientes replicadas. El análisis se realizó con el software de FlexStation®.

Ejemplo 6

La secuencia de los primeros 10 aminoácidos de la desbrilasa madura

El objetivo del ejemplo es determinar la secuencia de los primeros 10 aminoácidos mediante secuenciación de Edman N-terminal. La muestra (proteína de la figura 6 B, pista 5) se secuenció con éxito desde el extremo N-terminal. Se detectó la siguiente secuencia principal:

IVNGVDTTIQ

que corresponde a la proteína madura propuesta mediante análisis de la secuencia primaria (Figura 5A).

Ejemplo 7

Propiedades moleculares y enzimáticas de Desbrilasa

Tabla 1: Resumen de las propiedades moleculares y enzimáticas de Desbrilasa

Peso molecular:	27,4 kDa (pre-pro-péptido), 25,7 kDa (pro-péptido), 24,6 kDa (proteína madura)
K _m :	0,07 mM*
K _{cat} :	37,5•s ⁻¹
actividad específica:	90 μ mol•min ⁻¹ •mg ⁻¹ enzima
pH _{opt} :	8
T _{opt} :	37°C
*medido en ensato fluorimétrico usando Z-Gly-Gly-Arg-AMC como sustrato	

LISTA DE SECUENCIAS

<110> B.R.A.I.N. AG

5 <120> Nueva proteasa para el acondicionamiento de heridas y el cuidado de la piel

<130> R1375 PCT

<150> EP 09 00 3063.6

10 <151> 03-03-2009

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1

<211> 765

<212> ADN

<213> Lucilia sericata

20 <400> 1

```

atgttccggt ttgtagctct attcgctttc gttagctgtg ccttggcggg cgctattccc      60
aatgatttgg atggccgcat tgtcaatggt gtggatacca ccattcaggc ccatccctat      120
caggtttctt tgcaaaccaa caatggtttc catttctgcg gtggttccat catcagcgaa      180
gacattattg taactgctgc tcattgcatg caatcctaca aggcctacca attcaaagta      240
cgtttggggt cactgaata cgataatggt ggtgaattgg ttgccgtaa gtctttcaaa      300
taccacgaag gttacaatcc cgaaaccatg gttaatgatg ttgccgttat caaattagcc      360
actccagtgc gtgaatcttc caaggtagct tatgttaaat tggctgagaa gacacctgct      420
actggcacc cagctgtcgt tactggttgg gtttctaagt gcttcttggt ctgccaaact      480
gccctaaag ttttgcaaaa gggtgaggtc gatattgttg atgagaagac ctgcgcttcc      540
agcgaataca aatatggtga tgacatcaag gaaactatgt tgtgtgctta tgctgtaag      600
aaggatgctt gccaaagtga ttctggtggt ccttgggtg ccaacaaca attggtcgg      660
gttgtttctt ggggtaaagg ttgtgccctt gctggctatc ccggtgtata ctgcatggt      720
gctactgtcc gcagctggat tgaaaagact gccaaagatt tgtaa                          765

```

<210> 2

25 <211> 254

<212> PRT

<213> Lucilia sericata

<400> 2

ES 2 386 766 T3

Met Phe Arg Phe Val Ala Leu Phe Ala Phe Val Ser Cys Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Gly Ala Ile Pro Asn Asp Leu Asp Gly Arg Ile Val Asn Gly Val Asp
 20 25 30
 Thr Thr Ile Gln Ala His Pro Tyr Gln Val Ser Leu Gln Thr Asn Asn
 35 40 45
 Gly Phe His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Ser Glu Asp Ile Ile Val
 50 55 60
 Thr Ala Ala His Cys Met Gln Ser Tyr Lys Ala Tyr Gln Phe Lys Val
 65 70 75 80
 Arg Leu Gly Ser Thr Glu Tyr Asp Asn Gly Gly Glu Leu Val Ala Val
 85 90 95
 Lys Ser Phe Lys Tyr His Glu Gly Tyr Asn Pro Glu Thr Met Val Asn
 100 105 110
 Asp Val Ala Val Ile Lys Leu Ala Thr Pro Val Arg Glu Ser Ser Lys
 115 120 125
 Val Arg Tyr Val Lys Leu Ala Glu Lys Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro
 130 135 140
 Ala Val Val Thr Gly Trp Gly Ser Lys Cys Phe Leu Phe Cys Gln Thr
 145 150 155 160
 Ala Pro Lys Val Leu Gln Lys Val Glu Val Asp Ile Val Asp Glu Lys
 165 170 175
 Thr Cys Ala Ser Ser Glu Tyr Lys Tyr Gly Asp Asp Ile Lys Glu Thr
 180 185 190
 Met Leu Cys Ala Tyr Ala Val Lys Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser
 195 200 205
 Gly Gly Pro Leu Val Ala Asn Asn Lys Leu Val Gly Val Val Ser Trp
 210 215 220
 Gly Lys Gly Cys Ala Leu Ala Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Cys Asp Val
 225 230 235 240
 Ala Thr Val Arg Ser Trp Ile Glu Lys Thr Ala Lys Ser Leu
 245 250

5 <210> 3
 <211> 687
 <212> ADN

ES 2 386 766 T3

<213> *Lucilia sericata*

<400> 3

```
attgtcaatg gtgtggatac caccattcag gcccatccct atcaggtttc ttgcaaacc 60
aacaatggtt tccatttctg cgggtggtcc atcatcagcg aagacattat tgtaactgct 120
gctcattgca tgcaatccta caaggcctac caattcaaag tacgtttggg ttccactgaa 180
tacgataatg gtgggtgaatt gggtgccgtc aagtctttca aataccacga aggttacaat 240
cccgaaacca tggttaatga tgttgccgtt atcaaattag cactccagt gcgtgaatct 300
tccaaggtac gttatgtaa attggctgag aagacacctg ctactggcac cccagctgct 360

gttactgggt ggggttctaa gtgcttcttg ttctgcaaaa ctgcccctaa agttttgcaa 420
aaggttgagg tcgatattgt tgatgagaag acctgcgctt ccagcgaata caaatatggt 480
gatgacatca aggaaactat gttgtgtgct tatgctgtta agaaggatgc ttgccaaggt 540
gattctgggt gtcctttggt tgccaacaac aaattggctg gtgttgtttc ctggggtaaa 600
ggttgtgccc ttgctggcta tcccgggtga tactgcatg ttgctactgt cgcagctgg 660
attgaaaaga ctgccaagag tttgtaa 687
```

5

<210> 4

<211> 228

<212> PRT

<213> *Lucilia sericata*

10

<400> 4

ES 2 386 766 T3

Ile Val Asn Gly Val Asp Thr Thr Ile Gln Ala His Pro Tyr Gln Val
1 5 10 15

Ser Leu Gln Thr Asn Asn Gly Phe His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile
20 25 30

Ser Glu Asp Ile Ile Val Thr Ala Ala His Cys Met Gln Ser Tyr Lys
35 40 45

Ala Tyr Gln Phe Lys Val Arg Leu Gly Ser Thr Glu Tyr Asp Asn Gly
50 55 60

Gly Glu Leu Val Ala Val Lys Ser Phe Lys Tyr His Glu Gly Tyr Asn
65 70 75 80

Pro Glu Thr Met Val Asn Asp Val Ala Val Ile Lys Leu Ala Thr Pro
85 90 95

Val Arg Glu Ser Ser Lys Val Arg Tyr Val Lys Leu Ala Glu Lys Thr
100 105 110

Pro Ala Thr Gly Thr Pro Ala Val Val Thr Gly Trp Gly Ser Lys Cys
115 120 125

Phe Leu Phe Cys Gln Thr Ala Pro Lys Val Leu Gln Lys Val Glu Val
130 135 140

Asp Ile Val Asp Glu Lys Thr Cys Ala Ser Ser Glu Tyr Lys Tyr Gly
145 150 155 160

Asp Asp Ile Lys Glu Thr Met Leu Cys Ala Tyr Ala Val Lys Lys Asp
165 170 175

Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Ala Asn Asn Lys Leu
180 185 190

Val Gly Val Val Ser Trp Gly Lys Gly Cys Ala Leu Ala Gly Tyr Pro
195 200 205

Gly Val Tyr Cys Asp Val Ala Thr Val Arg Ser Trp Ile Glu Lys Thr
210 215 220

Ala Lys Ser Leu
225

<210> 5
<211> 717
5 <212> ADN
<213> Lucilia sericata

<400> 5

ES 2 386 766 T3

```

ggcgcatttc ccaatgattt ggatggccgc attgtcaatg gtgtggatac caccattcag      60
gcccacccct atcaggtttc tttgcaaacc aacaatgggt tccatttctg cgggtggttcc    120
atcatcagcg aagacattat tgtaactgct gctcattgca tgcaatccta caaggcctac     180
caattcaaag tacgtttggg ttccactgaa tacgataatg gtggtgaatt ggttgccgct     240
aagtctttca aataccacga aggttacaat cccgaaacca tggttaatga tgttgccggt     300
atcaaattag cactccagt gcgtgaatct tccaaggtag gttatgttaa attggctgag     360
aagacacctg ctactggcac cccagctgct gttactgggt ggggttctaa gtgcttcttg     420
ttctgccaaa ctgcccctaa agttttgcaa aaggttgagg tcgatattgt tgatgagaag     480
acctgcgctt ccagcgaata caaatatggt gatgacatca aggaaactat gttgtgtgct     540
tatgctgtta agaaggatgc ttgccaaggt gattctgggt gtcctttggt tgccaacaac     600
aaattggctg gtgttgtttc ctggggtaaa ggttgtgccc ttgctggcta tcccgggtgta    660
tactgcatg  ttgctactgt cgcagctgg  attgaaaaga ctgccaagag tttgtaa      717

```

<210> 6

<211> 238

5 <212> PRT

<213> *Lucilia sericata*

<400> 6

Gly Ala Ile Pro Asn Asp Leu Asp Gly Arg Ile Val Asn Gly Val Asp
1 5 10 15

Thr Thr Ile Gln Ala His Pro Tyr Gln Val Ser Leu Gln Thr Asn Asn
20 25 30

Gly Phe His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Ser Glu Asp Ile Ile Val
35 40 45

Thr Ala Ala His Cys Met Gln Ser Tyr Lys Ala Tyr Gln Phe Lys Val
50 55 60

Arg Leu Gly Ser Thr Glu Tyr Asp Asn Gly Gly Glu Leu Val Ala Val

ES 2 386 766 T3

65					70						75					80
Lys	Ser	Phe	Lys	Tyr 85	His	Glu	Gly	Tyr	Asn 90	Pro	Glu	Thr	Met	Val 95	Asn	
Asp	Val	Ala	Val 100	Ile	Lys	Leu	Ala	Thr 105	Pro	Val	Arg	Glu	Ser 110	Ser	Lys	
Val	Arg	Tyr 115	Val	Lys	Leu	Ala	Glu 120	Lys	Thr	Pro	Ala	Thr 125	Gly	Thr	Pro	
Ala	Val 130	Val	Thr	Gly	Trp	Gly 135	Ser	Lys	Cys	Phe	Leu 140	Phe	Cys	Gln	Thr	
Ala 145	Pro	Lys	Val	Leu	Gln 150	Lys	Val	Glu	Val	Asp 155	Ile	Val	Asp	Glu	Lys 160	
Thr	Cys	Ala	Ser	Ser 165	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Gly 170	Asp	Asp	Ile	Lys	Glu 175	Thr	
Met	Leu	Cys	Ala 180	Tyr	Ala	Val	Lys	Lys 185	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly 190	Asp	Ser	
Gly	Gly	Pro 195	Leu	Val	Ala	Asn	Asn 200	Lys	Leu	Val	Gly	Val 205	Val	Ser	Trp	
Gly	Lys 210	Gly	Cys	Ala	Leu	Ala 215	Gly	Tyr	Pro	Gly	Val 220	Tyr	Cys	Asp	Val	
Ala 225	Thr	Val	Arg	Ser	Trp 230	Ile	Glu	Lys	Thr	Ala 235	Lys	Ser	Leu			

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que codifica

- 5 (i) una serina proteasa que tiene la capacidad de escindir fibrina y caseína, que es
- (a) una molécula de ácido nucleico que codifica la serina proteasa que comprende o está constituida por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 4;
- 10 (b) una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 3;
- (c) una molécula de ácido nucleico que codifica una serina proteasa cuya secuencia de aminoácidos es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a); preferiblemente al menos un 85% idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, y siendo la forma más preferida al menos un 95% idéntica;
- 15 (d) una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de nucleótidos de (b), preferiblemente al menos un 85% idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, y siendo la forma más preferida al menos un 95% idéntica;
- (e) una molécula de ácido nucleico que está degenerada con respecto a la molécula de ácido nucleico de (d); o
- 20 (f) una molécula de ácido nucleico correspondiente a la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de (a) a (d) en la que T es sustituida por U;

(ii) un fragmento de la serina proteasa de (i) con la misma actividad de la serina proteasa de (i);

- 25 (iii) un propéptido de la serina proteasa de (i) que es escindido a su forma activa inmediatamente antes o durante el tratamiento de una herida, en el que el propéptido es codificado por una molécula de ácido nucleico seleccionada entre

- (a) una molécula de ácido nucleico que codifica el propéptido de serina proteasa que comprende o está constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 6;
- 30 (b) una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 5;
- (c) una molécula de ácido nucleico que codifica un propéptido de serina proteasa cuya secuencia de aminoácidos es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a); preferiblemente al menos un 85% idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, y siendo la forma más preferida al menos un 95% idéntica;
- 35 (d) una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de nucleótidos de (b), preferiblemente al menos un 85% idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, y siendo la forma más preferida al menos un 95% idéntica;
- 40 (e) una molécula de ácido nucleico que está degenerada con respecto a la molécula de ácido nucleico de (d); o
- (f) una molécula de ácido nucleico correspondiente a la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de (a) a (d) en la que T es sustituida por U; o

- 45 (iv) un pre-propéptido de la serina proteasa de (i), en el que el pre-propéptido es codificado por una molécula de ácido nucleico seleccionada entre

- (a) una molécula de ácido nucleico que codifica el pre-propéptido de serina proteasa que comprende o está constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2;
- 50 (b) una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1;
- (c) una molécula de ácido nucleico que codifica un pre-propéptido de serina proteasa cuya secuencia de aminoácidos es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a); preferiblemente al menos un 85% idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, y siendo la forma más preferida al menos un 95% idéntica;
- 55 (d) una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de nucleótidos de (b), preferiblemente al menos un 85% idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, y siendo la forma más preferida al menos un 95% idéntica;
- 60 (e) una molécula de ácido nucleico que está degenerada con respecto a la molécula de ácido nucleico de (d); o
- (f) una molécula de ácido nucleico correspondiente a la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de (a) a (d) en la que T es sustituida por U.

- 65 2. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.

3. Una célula huésped transformada, transducida o transfectada con el vector de la reivindicación 2.
4. Un método de producción de una serina proteasa, un fragmento, propéptido o pre-propéptido de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 3 y aislar la serina proteasa, el fragmento, el propéptido o el pre-propéptido producido.
5. Un/a
- 10 (i) serina proteasa o fragmento de la misma que tiene la capacidad de escindir fibrina y caseína; o
(ii) propéptido o pre-propéptido que es escindido a su forma activa inmediatamente antes o durante el tratamiento de una herida
- codificado/a por la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
- 15 6. Una proteína de fusión que comprende la serina proteasa, el fragmento, el propéptido, o el pre-propéptido de la reivindicación 5.
7. Una composición que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1, el vector de la reivindicación 2, la célula huésped de la reivindicación 3, la serina proteasa, el fragmento, el propéptido o el pre-propéptido de la reivindicación 5, o la proteína de fusión de la reivindicación 6, o combinaciones de las mismas.
- 20 8. La composición de la reivindicación 7, que es una composición cosmética.
9. La composición de la reivindicación 7, que es una composición farmacéutica.
- 25 10. El ácido nucleico de la reivindicación 1, el vector de la reivindicación 2, la célula huésped de la reivindicación 3, la serina proteasa, el fragmento, el propéptido o el pre-propéptido de la reivindicación 5, o la proteína de fusión de la reivindicación 6 para la preparación de una composición cosmética para exfoliación de la piel, alisado de la piel o la intervención con la formación de cicatrices.
- 30 11. El ácido nucleico de la reivindicación 1, el vector de la reivindicación 2, la célula huésped de la reivindicación 3, la serina proteasa, el fragmento, el propéptido o el pre-propéptido de la reivindicación 5, o la proteína de fusión de la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de heridas.
- 35 12. El ácido nucleico, el vector, la célula huésped, serina proteasa, fragmento, propéptido, pre-propéptido o proteína de fusión de la reivindicación 11, en el que las heridas son heridas crónicas o de cicatrización lenta.
13. El ácido nucleico de la reivindicación 1, el vector de la reivindicación 2, la célula huésped de la reivindicación 3, la serina proteasa, el fragmento, el propéptido o el pre-propéptido de la reivindicación 5, o la proteína de fusión de la reivindicación 6 para el tratamiento de enfermedades cutáneas acompañadas por cicatrización alterada de heridas.
- 40 14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende adicionalmente al menos un componente seleccionado entre el grupo de una proteasa adicional, nucleasa, excipiente, agente anti-microbiano y agente que alivia el dolor.
- 45 15. Un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo que se une específicamente a la serina proteasa, el fragmento, el propéptido o el pre-propéptido de la reivindicación 5.

Figura 1

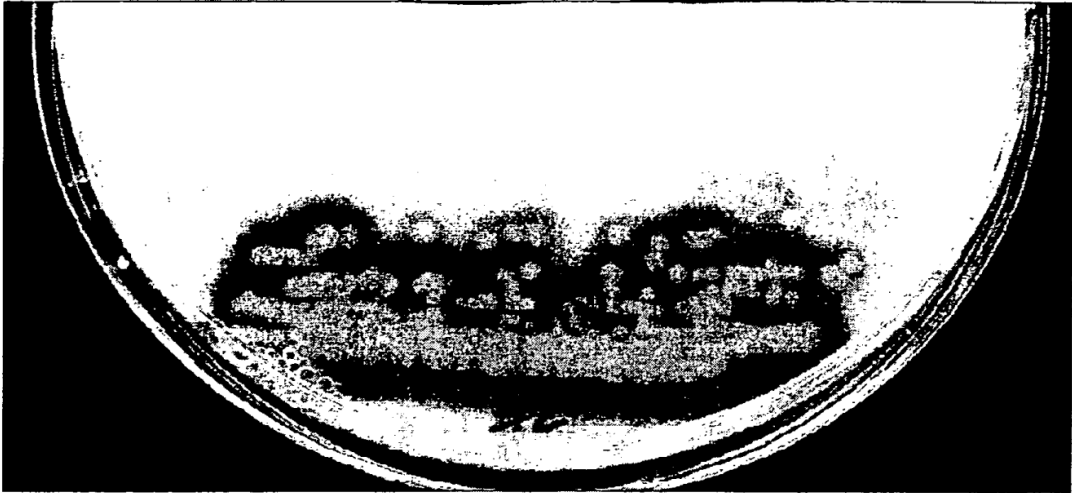
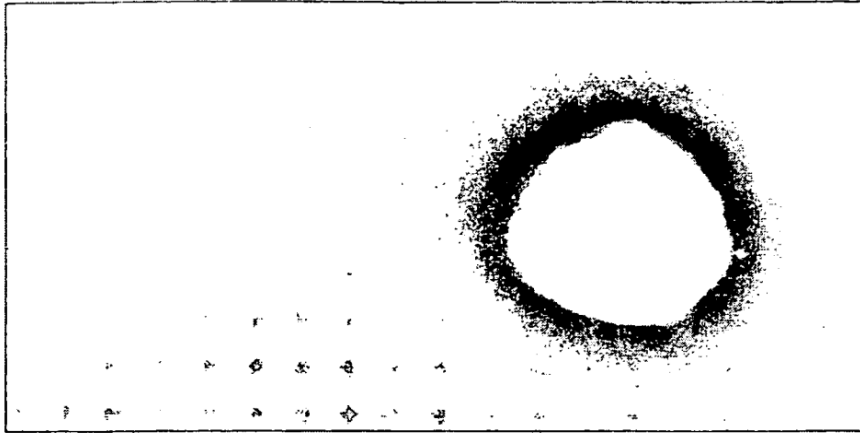


Figura 2

A



Clon de *E. coli* de control

Clon de *E. coli* que comprende el gen de desbrilasa

B

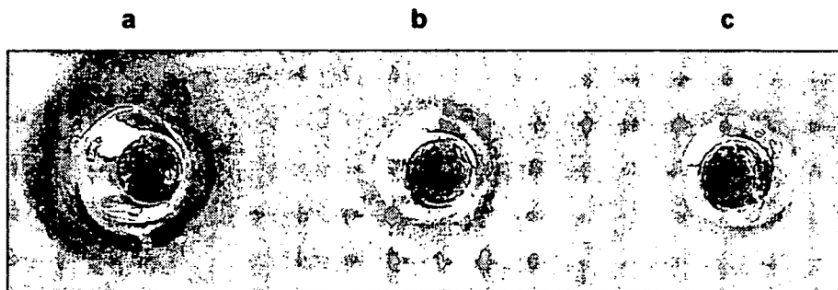
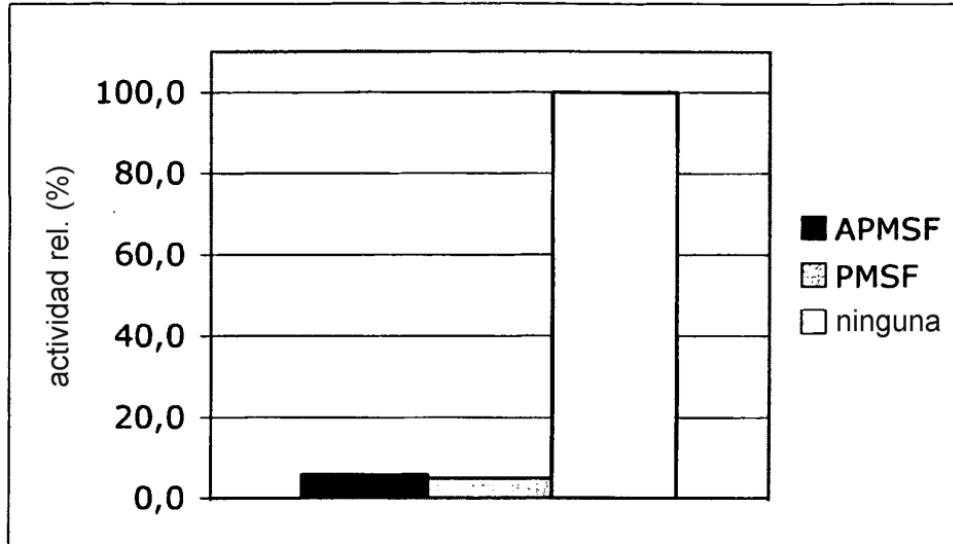


Figura 3

A)



B)

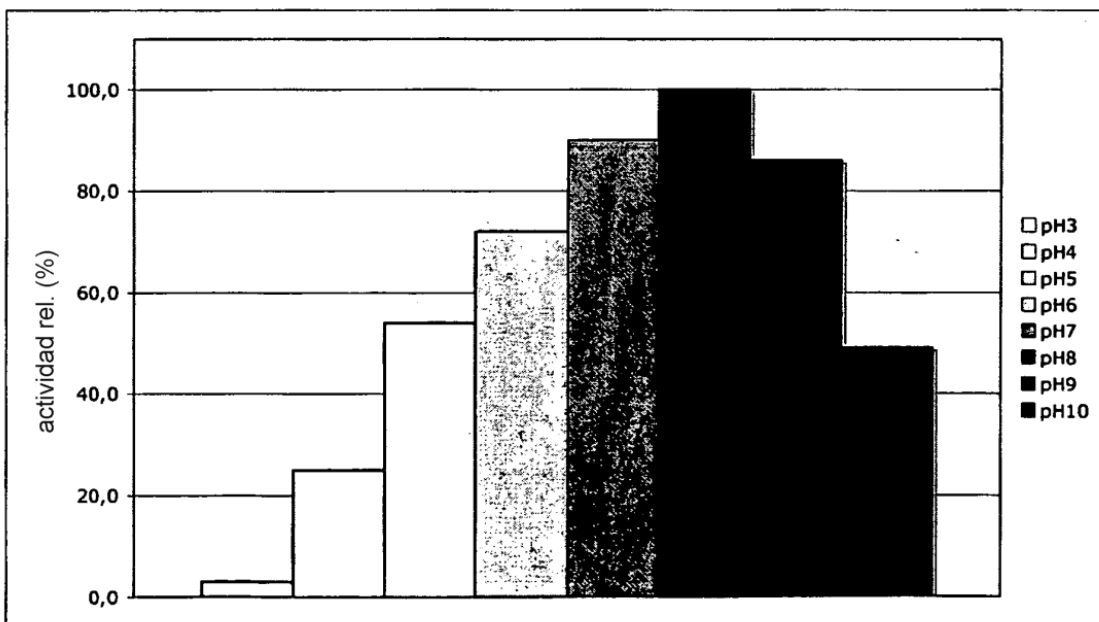


Figura 5A

Alineamiento de la secuencia de proteínas

>gi|1717788|sp|P51588.1|TRYP_SARBU RecName: Completa =Tripsina; Indicadores:
 Precursora
 gi|1177316|emb|CAA64354.1| enzima similar a tripsina [Sarcophaga bullata]
 Longitud =254

Valor = 427 bits (1099), Esperado = 3e-118, Método: ajuste de matriz
 composicional
 Identities = 195/254 (76%), Positivas = 227/254 (89%), Huecos = 0/254 (0%)

Introducida	1	MFRFVALFAFVSCALAGAI <u>PNDLDGRIVNGVDTTIQ</u> AHPYQVSLQTNNGFHFCCGSIISE	60
Encontrada	1	M RF+A+FA V+CALAG +PNDLDGRIVNGVDTTI+AHPYQV LQ HFCGCSIISE	60
Introducida	61	DIIVTAAHCMQSYKAYQFKVRLGSTEYDNGGELVAVKSFKYHEGYNPETMVNDVAVIKLA	120
Encontrada	61	D++VTAHCMQSY A Q KVRLGST Y+ GGELV+VK+FK+HEGYNP+TMVNDVA+IKLA	120
Introducida	121	TPVRESSKVRYVKLAEKTPATGTPAVVTGWGSKCFLFCQTAPKVLQKVEVDIVDEKTCAS	180
Encontrada	121	TPVRESSKIRYIRLADRTPPGTGTPAVVTGWG+KCFL C + PK LQ+VEVDIVD+K CAS	180
Introducida	181	SEYKYGDDIKETMLCAYAVKKDACQGDSSGGLVANNKLVGVVSWGKGCALAGYPGVYCDV	240
Encontrada	181	NEFKYGSQIQDTMVCAYALKKDACQGDSSGGLVANNQLVGI VSWGSGCARVGYPGVFCDV	240
Introducida	241	ATVRSWIEKTAKSL 254	
Encontrada	241	+VRSWIEKTAK L 254	

Figura 5B

Alineamiento de la secuencia de ADNc

>gi|1177315|emb|X94691.1|NBTRYPSIN ARNm de *N. bullata* para proteína similar a tripsina
 Longitud = 836

Valor = 571 bits (632), Esperado = 2e-159
 Identities = 588/768 (76%), Huecos = 6/768 (0%)
 Cadena = Más/Más

```

Introducida 1  ATGTTCCGGTTTGTAGCTCTATTGCTTTCGTTAGCTGTGCCTTGGCGGGCGCTATTCCC 60
                ||||| ||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Encontrada 1   ATGTTGCGTTTCATAGCTGTATTGCTTTCAGTTAACTGTGCTTGGCCGGCACTCTGCC 60

Introducida 61  AATGATTTGGATGGCCGATTGTCAATGGTGTGGATACCACCATTAGGCCCATCCCTAT 120
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Encontrada 61  AACGATTTGGATGGTCGTATTGTTAACGGTGTGATACTACAATTGAGGCCCATCCCTAT 120

Introducida 121 CAGGTTTCTTTGCAAACCAACAATGGTTTC---CATTTCTGCGGTGGTTCCATCATCAGC 177
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Encontrada 121 CAGGTTCCATTGCAAAA---ATGCTGCTCTCAGTCATTTCTGTGGTGGATCCATTATCAGT 177

Introducida 178  GAAGACATTATTGTAAGTCTGCTCATTGCATGCAATCCTACAAGGCCACCAATTCAA 237
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Encontrada 178  GAAGATCTAGTTGTACTGCTGCTCATTGTATGCAATCCTATACGGCTTCTCAAATTA 237

Introducida 238  GTACGTTTGGGTCCACTGAATACGATAATGGTGGTGAATTGGTTGCCGTCAAGTCTTTC 297
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Encontrada 238  GTGCGTTTGGGCTCTACTATATACAATGAAGGAGGTGAATTGGTATCAGTAAAGGCTTTT 297

Introducida 298  AAATACCACGAAGGTTACAATCCCGAAACCATGGTTAATGATGTTGCCGTTATCAAATTA 357
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Encontrada 298  AAATTCACGAAGGTTACAATCCTAAGACAATGGTGAATGACGTTGCTCTTATAAATTG 357

Introducida 358  GCCACTCCAGTGCCTGAATCTTCCAAGGTACGTTATGTTAAATTGGCTGAGAAGACACCT 417
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Encontrada 358  GCAACTCCAGTACGTGAATCGTCCAAAATACGTTATATTCGTTGGCTGATCGTACTCCA 417

Introducida 418  GCTACTGGCAGCCAGCTGTCGTTACTGGTTGGGGTCTAAGTGCTTCTTGTCTGCCAA 477
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Encontrada 418  CCTACTGGTACGCCGGCTGTCGTTACTGGCTGGGGTACCAAGTGTCTTAACTGTGTT 477

Introducida 478  ACTGCCCTAAAGTTTGGCAAAGGTTGAGGTGATATTGTTGATGAGAAGACCTGCGCT 537
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Encontrada 478  AGTTTGCCAAAGACTTTGCAAGAAGTTGAAGTTGATATTGTTGATCAGAAAGCCTGTGCT 537

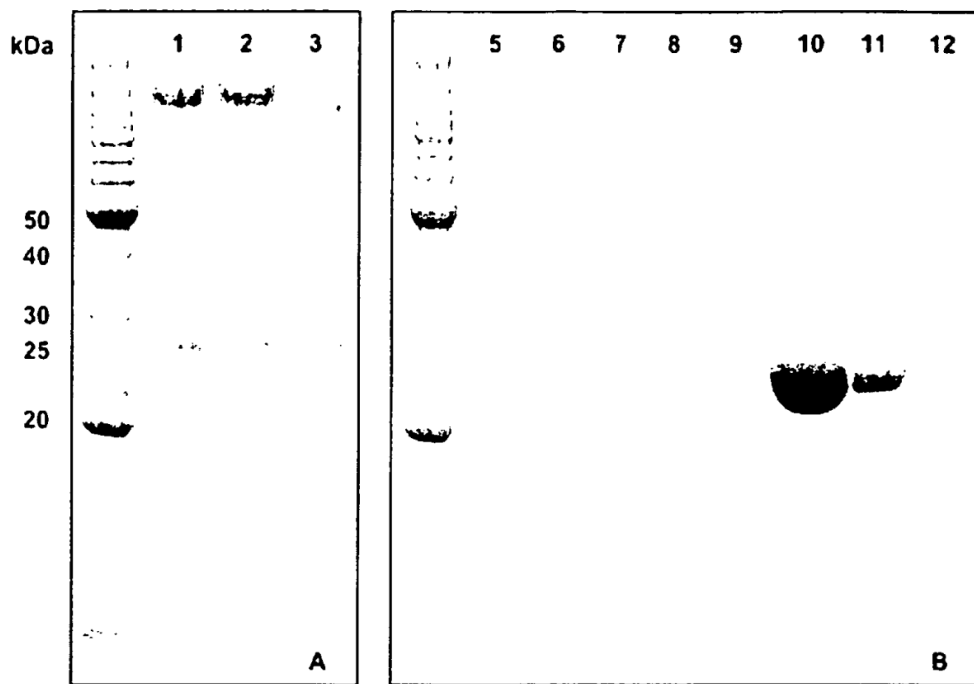
Introducida 538  TCCAGCGAATACAAATATGGTGATGACATCAAGGAAACTATGTTGTGTGCTTATGCTGTT 597
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Encontrada 538  TCCAATGAATTTAAATATGGCAGCCAAATACAAGACACTATGGTATGTGCTTACGCTTTA 597

Introducida 598  AAGAAGGATGCTTGCCAAGGTGATTCTGGTGGTCCCTTGGTTGCCAACAAATGGTTC 657
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Encontrada 598  AAAAAGGATGCTTGCCAAGGCGACTCTGGTGGCCATTAGTCGCTAATAATCAATTGGTTC 657

Introducida 658  GGTGTTGTTTCTGGGGTAAAGGTTGTGCCCTTGTGGCTATCCCGGTGTATACTGCGAT 717
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Encontrada 658  GGTATTGTGCTTGGGGTAGTGGTTGCGCTCGCGTCCGCTATCCTGGTGTATTCTGTGAT 717

Introducida 718  GTTGCTACTGTCCGAGCTGGATTGAAAAGACTGCCAAGAGTTGTAA 765
                ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Encontrada 718  GTGCCCTCTGTACGCTCATGGATCGAAAAGACTGCCAAGGAATTGTAA 765
    
```

Figura 6



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 6548556 B [0009]
- EP 0194647 B1 [0009]
- US 5106621 A [0009]
- US 5145881 A [0009]
- WO 03088993 A1 [0009]
- US 20030198632 A1 [0009]
- US 6846485 B [0009]
- US 5112608 A [0009]
- US 6262020 B [0009]
- US 4524136 A [0010]
- US 5439935 A [0010]
- US 5441740 A [0010]
- US 5554366 A [0010]
- US 5853705 A [0010]
- US 6780444 A [0010]
- WO 2007074454 A2 [0011]
- US 7368128 B [0014]
- US 7144721 B1 [0024]
- US 20080108551 A1 [0024]
- WO 2007122424 A2 [0024]
- US 20050053597 A1 [0024]
- EP 0307148 W [0053]
- WO 2006053613 A, Bushell [0093]
- EP 09003063 A [0140]

Literatura no patente citada en la descripción

- **Lobmann et al.** Proteases and the diabetic foot syndrome: Mechanisms and therapeutic Implications. *Diabetes Care*, 2005, vol. 28, 461-471 [0010]
- **Bott et al.** A silicone-based controlled-release device for accelerated proteolytic debridement of wounds. *Wound Repair Regen.*, 2007, vol. 15, 227-35 [0014]
- **Child FS ; Roberts EF.** The treatment of chronic osteomyelitis with live maggots. *New York State J Med*, 1931, vol. 31, 937-43 [0015]
- **Teich S ; Myers RAM.** Maggot therapy for severe skin infections. *South Med J*, 1986, vol. 79, 1153-5 [0015]
- **Church JCT.** Larvae therapy in modern wound care: A review. *Primary Intention*, May 1989, 63-8 [0015]
- **Sherman RA ; Hall MJR ; Thomas S.** Medicinal maggots: An ancient remedy for some contemporary afflictions. *Ann Rev Entomol*, 2000, vol. 45, 55-81 [0015]
- **Courtenay, M. et al.** Larva therapy in wound management. *J. R. Soc. Med.*, 2000, vol. 93, 72-74 [0015]
- **Sherman RA.** Maggot debridement in modern medicine. *Infect Med*, 1998, vol. 15, 651-6 [0016]
- **Sherman RA ; Hall MJR ; Thomas S.** Medicinal maggots: An ancient remedy for some contemporary afflictions. *Ann Rev Entomol*, 2000, vol. 45, 55-81 [0016]
- **Horobin et al.** Promotion of human dermal fibroblast migration, matrix remodelling and modification of fibroblast morphology within a novel 3D model by *Lucilia sericata* larval secretions. *J Invest Dermatol.*, 2003, vol. 126, 1410-1418 [0018]
- **Horobin et al.** Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon interactions between human dermal fibroblasts and extracellular matrix components. *Br. J. Dermatol.*, 2003, vol. 148, 923-933 [0018]
- **Daeschlein, G. et al.** In vitro antibacterial activity of *Lucilia sericata* maggot secretions. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 2007, vol. 20, 112-115 [0019]
- **Chambers et al.** Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *Brit J Dermatol.*, 2000, vol. 148, 14-23 [0020] [0113]
- **Elvin et al.** An estimate of the number of serine protease genes expressed in sheep blowfly larvae (*Lucilia cuprina*). *Insect Molecular Biol*, 1994, vol. 3, 105-115 [0021]
- **Casu et al.** Excretory/secretory chymotrypsin from *Lucilia cuprina*: purification, enzymatic specificity and amino acid sequence deduced from mRNA. *Insect Molecular Biol*, 1994, vol. 3, 201-211 [0021]
- **Casu et al.** Isolation of a trypsin-like serine protease gene family from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Insect Molecular Biol*, 1994, vol. 3, 159-170 [0021]
- **Borovsky et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1996, vol. 237, 279-287 [0021]
- **Chambers et al.** Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *British J. Dermatol*, 2003, vol. 148, 14-23 [0022]

- **Chambers et al.** Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the green bottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *Brit J Dermatol.*, 2000, vol. 148, 14-23 [0023]
- **Braasch ; Corey.** *Chem Biol*, 2001, vol. 8, 1 [0027]
- **Rawlings, N.D. ; Barrett, A.J.** Families of serine peptidases. *Meth. Enzymol.*, 1994, vol. 244, 19-61 [0028]
- **Stephen F. Altschul ; Thomas L. Madden ; Alejandro A. Schäffer ; Jinghui Zhang ; Zheng Zhang ; Webb Miller ; David J. Lipman.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0035] [0043]
- **Greener B et al.** Proteases and pH in chronic wounds. *J Wound Care*, 2005, vol. 14 (2) [0044]
- **Dissemond, J. et al.** pH-Wert des Milieus chronischer Wunden, Untersuchungen im Rahmen einer modernen Wundtherapie. *Der Hautarzt*, 2003, vol. 54 (12), 959-965 [0044]
- **Asano-Kato et al.** Tryptase increases proliferative activity of human conjunctival fibroblasts through protease-activated receptor-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2005, vol. 46 (12), 4622-6 [0045]
- **Borensztajn K. et al.** Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation. *Am J Pathol.*, 2008, vol. 172 (2), 309-20 [0045]
- **Studier, W.F. ; Rosenberg A.H. ; Dunn J.J. ; Dubendorff J.W.** Use of the T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 185, 61-89 [0050] [0056]
- **Glover, D.M.** DNA cloning: a practical approach. IRL Press Ltd, 1985, vol. I-III [0050]
- **Goedeel, D.V.** Systems for heterologous gene expression. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 185, 3-7 [0050]
- **Sambrook, J. ; Russell, D. W.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0050]
- **Sambrook, J. ; Fritsch, E.F. ; Maniatis, T.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0056] [0062]
- **Cantrell, SA.** Vectors for the expression of recombinant proteins in *E. coli*. *Methods in Molecular biology*, 2003, vol. 235, 257-275 [0056]
- **Sawers, G ; Jarsch, M.** Alternative principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, vol. 46 (1), 1-9 [0056]
- **Harlow ; Lane.** Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 [0107]
- **Harlow ; Lane.** Using Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998 [0107]
- **Köhler ; Milstein.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0108]
- **Kozbor.** *Immunology Today*, 1983, vol. 4, 72 [0108]
- **Cole et al.** Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R. Liss, Inc, 1985, 77-96 [0108]
- **Schier.** *Human Antibodies Hybridomas*, 1996, vol. 7, 97-105 [0108]
- **Malmborg.** *J. Immunol. Methods*, 1995, vol. 183, 7-13 [0108]