

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 591**

51 Int. Cl.:

C12N 9/50 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A23J 3/34 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2008 E 08785459 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **14.04.2010 EP 2173868**

54 Título: **Preparación recombinante de fracciones de bromelaína seleccionadas**

30 Prioridad:

14.09.2007 EP 07018125

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

13.02.2013

73 Titular/es:

URSAPHARM ARZNEIMITTEL GMBH (100.0%)

POSTFACH 40 01 51

66057 SAARBRÜCKEN, DE

72 Inventor/es:

MÜLLER, ROLF;

LUNIAK, NORA y

ESCHMANN, KLAUS

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 395 591 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

Preparación recombinante de fracciones de Bromelaina seleccionadas

5 **[0001]** La presente invención se relaciona en general con la Bromelaina y particularmente con los diferentes compuestos activos contenidos en esta mezcla compleja de proteínas.

10 **[0002]** La Bromelaina se define bioquímicamente como un extracto en bruto del tallo de la piña y farmacológicamente como una mezcla de proteasas de cisteína. Su multitud de efectos positivos se originan al menos en parte de las propiedades proteolíticas y particularmente fibrinolíticas. También se conocen los efectos anti tumorales de la Bromelaina dependientes de efectos diferentes de la actividad proteolítica y aún de mecanismos desconocidos. La Bromelaina es el nombre colectivo para los enzimas proteolíticos encontrados en tejidos, particularmente del tallo y la fruta, de pantas de la familia de las Bromeliáceas. La forma más común de Bromelaina es una mezcla de varias fracciones derivadas del tallo de la planta de la piña (*Ananas comosus*). Se sabe que la Bromelaina del tallo (en lo sucesivo Bromelaina) contiene al menos cinco enzimas proteolíticos y también enzimas no proteolíticos, incluyendo una fosfatasa ácida y una peroxidasa; también puede contener amilasa y actividad de celulosa. Además están presentes otros varios componentes.

20 **[0003]** Se han descrito varios efectos positivos de la Bromelaina hasta ahora que comprenden propiedades de reducción de edemas, hemolíticas, fibrinolíticas, antiinflamatorias, anti metastásicas e inhibitoras de tumores. Además, también se le han a los efectos beneficiosos del mencionado cóctel de proteasa natural otorgado efectos estimulatorios en el sistema inmune, aceleración de la curación de heridas. Se ha demostrado por Mynott TL y otros (K. Immunol., 163:5 (1999) 2568-75) que la Bromelaina bloquea la activación de la ERK-2 en células Th0 estimuladas por la TCR. La Bromelaina también inhibió la IL-2 inducida por PMA, IFN-gamma, y la acumulación de ARNm IL-4, pero no tuvo efecto en la producción de ARNm de citoquina inducida por TCR. Esto sugiere que la mezcla compleja mencionada de proteasas es un inhibidor de la transducción de la señal de las células T.

30 **[0004]** Debido a la eficacia de la Bromelaina después de la administración oral, su seguridad y falta de efectos secundarios no deseados, la Bromelaina ha ganado aceptación y conformidad crecientes entre los pacientes como un fármaco fitoterapéutico. Se ha reclamado una amplia serie de beneficios terapéuticos para la Bromelaina, como la inhibición reversible de la agregación de plaquetas, angina de pecho, bronquitis, sinusitis, traumas quirúrgicos, tromboflebitis, pielonefritis, y absorción potenciada de fármacos, particularmente de antibióticos (cf. Orsini RA, Plast. Reconstr. Surg., 118(7) (2206) 1640-4; Brien S, Evid Based Complement Alternat. Med., 1(3) (2004) 251-7). Los experimentos bioquímicos indican que estas propiedades farmacológicas dependen de la actividad proteolítica solo en parte, sugiriendo la presencia de factores no proteínicos en la Bromelaina. Los resultados de los estudios preclínicos y farmacológicos recomiendan Bromelaina como un fármaco para la terapia de tumores complementaria. Se supone que la Bromelaina actúa como un inmunomodulador elevando la inmunocitotoxicidad afectada de los monocitos contra las células tumorales de pacientes e induciendo la producción de distintas citoquinas como el factor de necrosis tumoral y las interleucinas (véase. Maurer HR, Cell Mol. Sci., 58(9) (2001), 1234-45). También hay informes en experimentos animales, en los que se describe una eficacia antimetastásica y la inhibición de la agregación de plaquetas asociada con la metástasis así como la inhibición del crecimiento y la invasibilidad de las células tumorales. Aparentemente, la actividad anti-invasiva no depende de la actividad proteolítica. Esto es también verdad para los efectos de la Bromelaina en la modulación de las funciones inmunes, su potencial para eliminar desechos de quemados y para acelerar la curación de heridas.

45 **[0005]** Un proceso de extracción física para la Bromelaina se divulga por ejemplo en la CN118118. El proceso comprende entre otros pre-tratar la plata de piña con congelación, trituración, y exprimido para obtener zumo, filtrar para obtener líquido claro, concentración con película ultrafiltrante y película de osmosización inversa y secado al vacío por congelación para obtener el producto en la forma de una esponja. Se ha informado que controlar la temperatura, el tiempo y el valor de pH aumenta la actividad de los enzimas y los rendimientos.

50 **[0006]** La US3658651 se refiere a zumo que contiene Bromelaina extraído de tallos de plantas de piña que es purificado antes de la precipitación de los enzimas pasando el zumo en una relación de intercambio de iones con un intercambiador de aniones en la forma de bicarbonato, un intercambiador de cationes que tiene grupos funcionales ácidos suaves, y un segundo intercambiador de aniones en la forma de bicarbonato.

60 **[0007]** La US 4.286.064 divulga entre otros la preparación de un extracto bruto de Bromelaina. El zumo del tallo de la piña es primero ajustado a un pH de alrededor de 3 ó 4 con ácido fosfórico, y se añade sulfhidruro de sodio para proteger contra la oxidación del sulfhidrilo. El material inerte es precipitado en por ejemplo acetona y filtrado. El fluido clarificado es precipitado con acetona y el precipitado recogido por centrifugación y o redissuelto en agua que contiene sulfhidruro de sodio que ha sido acidificado con ácido fosfórico y precipitado, o secado en un horno de vacío directamente. Se puede realizar purificación adicional del extracto en bruto por filtración, diálisis o diafiltración para la retirada de moléculas y proteínas pequeñas, seguido por la concentración de la solución obtenida antes de la liofilización.

65

[0008] Carter E. y otros Biochemistry, 2000, 39, 11005-11013 divulga que la Ananaína puede ser expresada en la *E. coli*. Las diferentes regiones en la secuencia de aminoácidos de longitud completa, entre otras, están identificados 7 propéptidos C-terminales de aminoácido. Este documento además informa sobre Ananaína activada purificada de la inclusión de cuerpos a pH 4 y 55° C.

[0009] La WO 2005/096804 se refiere entre otras cosas a transformar plantas de maíz con constructos de Bromelaina y expresar los mismos en el endosperma del grano de maíz. en el ejemplo 51 la Bromelaina activa es aislada de la harina hecha del grano transformado. Dicho documento además se refiere a diferentes constructos de Bromelaina subrayados en la SEQ ID NOs: 73-78.

[0010] Para evitar la degradación y/o otras reacciones químicas no deseadas, como reacciones de oxidación, es ineluctable la selección de condiciones de tratamiento particulares, como la temperatura, el pH, solventes y reguladores, y/o aditivos, como estabilizantes y antioxidantes.

[0011] Aparte de las deficiencias anteriores, puede requerirse una purificación adicional de los extractos en bruto. Dicha purificación puede ser realizada por ejemplo por HPLC como se describe en la US 2002/188107.

[0012] Es por lo tanto altamente deseable proporcionar proteínas de Bromelaina químicamente estable así como pura, que pueda ser incluida en composiciones farmacéuticas, dermatológicas y nutricionales y no muestre las deficiencias anteriores de las las formulaciones que contienen Bromelaina del estado de la técnica.

[0013] Se puede proporcionar una proteína de Bromelaina expresada heterológamente o un fragmento de la misma en donde dicha proteína de Bromelaina o fragmento de la misma ha sido expresado en cantidades sustanciales en forma soluble y activa en un huésped heterólogo.

[0014] La presente invención se refiere a un método de expresar heterológamente la proteína de Pro-Bromelaina o un fragmento de la misma, dicho método comprendiendo los pasos de:

- a) introducir una secuencia de ADN que codifica la proteína de Pro-Bromelaina o el mencionado fragmento de la misma como está contenida en la secuencia como se muestra en las Figuras 6a, 6b, 6c, ó 6d y carece de la secuencia que codifica el propéptido C-terminal en la *Pichia pastoris* como un huésped; y
- b) expresar el mencionado constructo en el huésped, en donde el fragmento cubre el sitio activo de la proteína de Bromelaina y el propéptido N-terminal, y tiene actividad de proteasas de cisteína.

[0015] Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que por la expresión heteróloga de las proteínas de Bromelaina individuales o unos fragmentos de las mismas también que se pueden evitar problemas de estabilidad de las proteínas/fragmentos y la composición. Sin desear estar atados a ninguna teoría se asume actualmente que las múltiples proteasas contenidas en la Bromelaina ejercen una actividad degradante entre sí, que es sólo inhibida en parte por los inhibidores de la proteasa contenidos en la misma, llevando a la autodegradación. Además, se podría demostrar que las proteínas expresadas heterológamente individuales y/o fragmentos de las mismas ejercen al menos algunas de las propiedades ventajosas de la Bromelaina. Esto vuelve a las proteínas o a los fragmentos de las mismas adecuados como ingredientes activos de medicamentos. otro efecto positivo reside en un modo más específico de acción evitando efectos secundarios, que pueden tener lugar en el caso de que se apliquen mezclas complejas de Bromelaina o fracciones de Bromelaina.

[0016] En las figuras se muestra

figura 1, un alineamiento realizado con el programa vector NTI (Invitrogen) empleando el algoritmo Clustal W (Thompson y otros, 1994) de las proteasas de cisteína conocidas de la *A. comosus* y las encontradas secuenciando los péptidos de las fracciones F4, F5 y F9 (subrayadas) realizadas de acuerdo con Harrach y Mauser (1996). La Ananaína se puede encontrar en la fracción F9, mientras que la F4 y la F5 comprenden la Bromelaina del tallo y muestra la secuencia nueva;

figura 2 la expresión de la Bromelaina del tallo y la Ananaína. Se ha llevado a cabo un SDS-PAGE con aproximadamente 100 µl de sobrenadante de cultivos de expresión de la *Pichia pastoris*. A, clones 27 y 30 pPIC9/*stb3* (Bromelaina del tallo) precursor de la proteinasa de cisteína positivo, B control negativo (plásmido sin inserto) y clones pPIC9/*an1* positivos (Ananaína) 4 y 5 así como clon 30pPIC9/*stb3* positivo. Las flechas marcan la pre-pro-proteínas expresadas heterológamente. La línea derecha muestra el estándar de la proteína (PageRuler™, Fermentas, 10kDa-170kDa);

figura 3 un SDS-Page al 15% de la expresión de un constructo de pro-Ananaína (pPICZ/*factor-alfa::an1Δctpp*). Se eliminó la secuencia de ADN para el Propéptido C-terminal. la flecha superior marca la banda de 35 kDa (proenzima); la flecha inferior la banda de 25 kDa (forma activa); en el extremo derecho el control del tipo salvaje;

figura 4 un SDS-Page al 15% de un cultivo de expresión con un 0,5% de caseína. La figura 4 muestra una selección de clones con diferentes actividades promotoras. a) tipo salvaje KM71H, b) pPICZ-7/*factoralfa::an1Δctpp*, b) pPICZ-mini/*factoralfa::an1Δctpp*. En contraste con la figura 4a, pero par el promotor mínimo, las señales de caseína marcadas por flechas no son ya detectables con excepción de algunas muestras;

figura 5 las secuencias de proteína de dos Bromelainas de tallo STB4 y STB3 (figura 5a y 5b), Ananaína AN1 (figura 5c) y Bromelaina de fruta FB1 (figura 5d);

figura 6 las secuencias de nucleótidos correspondientes de dos Bromelainas de tallo stb4 y stb3 c d (figura 6a y 6b), Ananaína an1 (figura 6c) y Bromelaina de fruta f1b (figura 6d);

figura 7 el vector pPICZalfa comprendiendo an1;

figura 8 una comparación de constructos de expresión. La parte superior de la figura muestra el gen de Proananaína sin la extensión C-terminal dentro del vector pPICZA. La parte inferior de la figura ilustra el constructo pPIC9 con el gen de Preproananaína y etiqueta His N-terminal. La extensión C-terminal está marcada;

figura 9 el propéptido C-terminal de las proteasas de cisteína. Se ha realizado un alineamiento usando Clustal W (www.ebi.ac.uk), en el que se muestran los terminales C respectivos de algunas de las proteasas de cisteína presentes así como una proteasa de cisteína de arroz (AAM34401), la procatepsina L humana (1CJL GI:2392232) 1CJL), la propapaína (P00784), la procatepsina L murina (P06797), la bromelaina de fruta (BAA21848) y la proteasa de cisteína que muestran una señal de localización vacuola definida de la *Vigna mungo* (1910332A). Negrita- todos los residuos de aminoácidos idénticos en una posición dada; cursiva- la mayoría de los aminoácidos idénticos o conservativos en una posición dada; subrayado- bloque de aminoácidos idénticos en una posición dada.

figura 10 Ananaína recombinante expresada en *Pichia pastoris*. Sobrenadante del cultivo de expresión de la *Pichia pastoris* KM71H con Ananaína activada (flecha 25 kDa) del Proenzima expresado (flecha 35 kDa) en un rendimiento de 12,5 mg/l (la flecha 45 kDa muestra una proteína de levadura secretada); y

figura 11 un esquema para la amplificación de las proteasas de cisteína de la biblioteca de ADNc; PCR con cebadores degenerados incluyendo todas las 9 variantes de cebador con productos PCR esperados (en bp), amplificación de 3' a 5' final por cebadores específicos; que son complementarios a una sección de ADN idéntico de la alineación subyacente, con "PCR" anidado" y fragmento interno; amplificación de genes completos y amplificación de la secuencia stb4 usando ADNc como plantilla cortado por *EcoRI*.

[0017] De acuerdo con una primera realización de la presente invención un método para expresar heterológamente proteína de Pro-Bromelaina o un fragmento de la misma, dicho método comprendiendo los pasos de:

a) introducir una secuencia de ADN que codifica la proteína de Pro-Bromelaina o el mencionado fragmento de la misma como se contiene en una secuencia como se muestra en la Figura 6a, 6b, 6c ó 6d y que carece de la secuencia que codifica el propéptido C-terminal en la *Pichia pastoris* como un huésped; y
b) expresar el mencionado constructo en el huésped; en donde el fragmento cubre el sitio activo de la proteína de Bromelaina y el propéptido N-terminal, y tiene actividad de proteasas de cisteína.

[0018] La proteína de Bromelaina como se usa en la presente se refiere a una proteasa individual contenida en cualquiera de las fracciones del extracto en bruto de Bromelaina, que se distingue de otras proteasas contenidas en la Bromelaina por su secuencia de aminoácidos. un fragmento es un polipéptido de longitud suficiente para mostrar esencialmente la(s) misma(s) función(es) que la misma proteasa. Para asegurar esto, el fragmento tiene suficiente longitud para cubrir el sitio activo de la proteína de la proteasa. En general, la actividad de una proteína es preliminarmente dependiente del sitio activo y sus alrededores cercanos que afectan a la estructura tridimensional particular requerida para la reactividad, mientras tramos más distantes de aminoácidos, como bucles y láminas, influyen la afinidad del sustrato de la proteína y, en la superficie de las proteínas, el acceso al sustrato y solubilidad del agua de la proteína. Por lo tanto, un fragmento de Bromelaina que abarca el sitio activo, puede mostrar una actividad de proteasa hacia diferentes sustratos y/o diferentes preferencias de sustratos. Un fragmento de una proteína de bromelaina puede o ser derivada "naturalmente", es decir permitiendo la auto-digestión de la proteína de Bromelaina, o artificialmente por ejemplo escisión de la proteína de Bromelaina con cualquier otra proteasa. Se apreciará que el tamaño del fragmento derivado por auto-digestión puede ser fácilmente ajustado por medio de parámetros ambientales, como la concentración (en agua como solvente), reguladores, temperatura y otros parámetros. La proteína de Bromelaina expresada heterológamente o fragmento de la misma como se usa en la presente comprende tanto la proteína de Bromelaina activa como el proenzima de Bromelaina que requiere activación por, por ejemplo, aplicación de un sistema regulador ácido que proporciona un cambio a pH 4. El mismo problema se aplica a los fragmentos de proteínas de Bromelaina.

[0019] El término "cantidades sustanciales" como se usa en la presente se refiere a proteína de Bromelaina activa o un fragmento de la misma expresado heterológamente en una cantidad de ≥ 1 mg/l, preferiblemente ≥ 2 mg/l, ≥ 4 mg/l, ≥ 6 mg/l, ≥ 8 mg/l o ≥ 10 mg/l, y más preferiblemente en una cantidad de ≥ 12 mg/l.

[0020] El término "soluble" como se usa en la presente se refiere a una proteína o fragmento de la misma que muestra esencialmente las mismas tres estructuras dimensionales que la proteasa del tipo salvaje, nativa correspondiente. Esto asegura que la proteína el fragmento de la misma muestra la actividad de proteasa de cisteína deseada y que la adición de otras sustancias para, por ejemplo, propósitos de renaturalización se pueden evitar, lo que asegura por un lado una tolerancia mejorada a la ingestión y evita por otro lado modificaciones no deseadas del polipéptido. La proteína plegada o fragmento de la misma muestra además a los alrededores suficientes aminoácidos hidrofílicos, es decir experimentando enlaces de hidrógeno con moléculas de agua, en los que la proteína o fragmentos de la misma tiene una biodisponibilidad volviéndola adecuada para su uso en propósitos médicos. El término biodisponibilidad describe la tasa y extensión a la que el ingrediente activo o la fracción activa es absorbida de un producto farmacéutico y se vuelve disponible en el sitio de acción. la biodisponibilidad de fármacos ingeridos oralmente es determinada por factores, que incluyen la naturaleza de la molécula, su estabilidad, y la formulación administrada -y en el paciente- como un área de superficie intestinal reducida como resultado de enfermedad cólica o resección intestinal y si el fármaco es tomado con una comida o no. Los factores que influyen la biodisponibilidad pueden incluir, pero no están limitados a una absorción pobre del tracto gastrointestinal, efecto del primer paso hepático y una degradación parcial del fármaco antes de llegar al sistema circulatorio. El presente sistema de expresión permite inesperadamente altos rendimientos y una solubilidad alta inesperada de las proteínas o fragmentos de las mismas pero también lleva a cantidades más altas de proteínas de Bromelaina activas o fragmentos de las mismas ya que se evita la digestión por otras proteasas.

[0021] Las proteínas de Bromelaina pueden ser obtenidas, por ejemplo, por medio de aislamiento del ARN de material vegetal en un primer paso, por ejemplo aplicando el Sistema de Purificación de ARN TRIzol plus (Invitrogen). El ADN así como las proteínas pueden ser aisladas por medio de Trizol (Invitrogen). Como el almidón destruye el gradiente se necesita algo adicional para la separación del ARN de las proteínas. Cantidades más grandes de ARN de órganos ricos en almidón como el tallo pueden ser aislados usando el RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) después de eso. en un paso siguiente se puede generar una biblioteca de ADNc. Esto se puede realizar por cualquier método conocido por las personas expertas, por ejemplo empleando el SMARTTM cDNA Library Construction Kit (Clontech). El ADNc puede estar ligado en un plásmido o vector adecuado seguido por la transformación en por ejemplo *E. coli*. Se apreciará que esto se puede realizar por cualquier método bien conocido por la persona experta. Los insertos pueden ser secuenciados por medio de técnicas de secuenciación de ADN estándares. Para la expresión de las secuencias de ADN pueden estar ligadas en un vector de expresión adecuado bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. Un sistema de expresión adecuado es por ejemplo pPICZalpha (Invitrogen), que puede ser transformado por cualquier técnica adecuada, como electroporación, en un huésped adecuado, como la *Saccharomyces cerevisiae*, la *Candida albicans* o preferiblemente la *Pichia pastoris*. La *Pichia pastoris* como huésped para la expresión heteróloga muestra la ventaja particular que el patrón de glicosilación se corresponde esencialmente a los de los eucariotas superiores, ya que los homólogos de la α -1,3-Manosil-transferasa no están presentes en dicho organismo.

[0022] La transformación y posterior expresión de la proteína puede ser realizada de acuerdo con los protocolos disponibles en el estado de la técnica. La actividad de la proteína expresada puede ser probada fácilmente empleando caseína como sustrato, que es degradada a hidrolizado de caseína. Esta conversión puede ser, por ejemplo, determinada cuantitativamente por medio de espectrofotómetro trabajando a una longitud de onda en el espectro visible de, por ejemplo, 600 nm. Alternativamente, la caseína puede ser incluida en el medio de agar usado para la expresión. La degradación de la caseína resulta en la aparición de halos claros que se forman alrededor de las colonias. El conocimiento requerido de técnicas de ADN recombinante se puede derivar de Maniatis y otros; Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2^a ed., (1989).

[0023] Se ha descubierto sorprendentemente que retirando el propéptido C-terminal, un elemento cuya función todavía no ha sido dilucidada, los rendimientos de las presentes proteínas de bromelaina fueron significativamente ampliados por un factor 2, preferiblemente factor 3, 4, 5, ó 6, más preferiblemente por un factor 10 o más en comparación con la expresión heteróloga de una proteína de bromelaina que todavía llevaba el propéptido C-terminal. En particular, se puede demostrar que retirando el propéptido C-terminal se obtuvieron rendimientos de 12,5 mg/l de Ananaína y en el caso de la Papaína de 1-2 mg/l.

[0024] Se pueden proporcionar la proteína de Bromelaina expresada heterológamente o un fragmento de la misma en donde el ADN que codifica el propéptido C-terminal de la proteína de Bromelaina correspondiente o un fragmento de la misma ha sido eliminado. Ejemplos de ADNs que codifican los propéptidos C-terminales se enumeran en la Figura 9. Se apreciará que la determinación de las secuencias de ADN de los propéptidos C-terminales que se originan de otras proteínas de Bromelaina puede ser determinada de acuerdo con el conocimiento de la persona experta.

[0025] El propéptido N-terminal actúa en la prevención de la autólisis de la proteasa de la cisteína. Por consiguiente, se contemplan la modificación y también la omisión de las secuencias del propéptido N-terminal. Se

apreciará que la persona experta puede determinar fácilmente las secuencias respectivas y alterarlas en consecuencia.

[0026] Se puede proporcionar la proteína de Bromelaina expresada heterológamente o fragmento de la misma. La proteína o fragmento de la misma tiene una modificación postraducciona l diferente de la conferida por el género Ananas dependiendo del sistema de expresión usado.

[0027] usando un organismo diferente del género Ananas, se puede asegurar una modificación postraducciona l distinta (PTM) referida en general a una modificación química de una proteína después de su traducción, en donde el ARN mensajero es decodificado para generar una proteína o polipéptido específico. Las PTMs pueden ser clasificadas de acuerdo con sus acciones en las proteínas traducidas. Pueden conferir adición de grupos funcionales u otras proteínas/péptidos, que resultan en el cambio de la naturaleza química de los aminoácidos que forman la proteína y dan como resultado cambios estructurales. Un ejemplo de una modificación postraducciona l es la glicosilación durante la que los sacáridos son añadidos a la proteína. En particular una glicosilación diferente puede resultar en una solubilidad al agua diferente, que puede a su vez afectar positivamente la biodisponibilidad de la proteína o el péptido.

[0028] También se apreciará por aquellos expertos en la técnica que las funciones de la proteína de Bromelaina o fragmentos de la misma se pueden conseguir por una variedad de secuencias de aminoácidos diferentes en las que la proteína de Bromelaina expresada heterológamente o fragmentos de la misma pueden mostrar una similitud de secuencia a la proteína de Bromelaina de al menos un 99%. Preferiblemente la similitud de secuencias es al menos de un 99,5% y más preferiblemente de al menos un 99,8%. En otras palabras, las secuencias de proteína o fragmentos de la misma se distinguen de sus contrapartidas del tipo salvaje por 1 aminoácido por cada 100 aminoácidos y preferiblemente por 2 aminoácidos por cada 100 aminoácidos.

[0029] Dicha proteína o fragmento de la misma es un polipéptido que contiene cambios en los residuos de aminoácidos que no son esenciales para la actividad, es decir, difieren en la secuencia de aminoácidos de la proteína de Bromelaina original o fragmento de la misma, conservando todavía función o actividad biológica. por ejemplo, los aminoácidos pueden ser sustituidos en residuos de aminoácidos "no esenciales". Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede ser alterado de la secuencia del tipo salvaje de una proteasa de Bromelaina particular sin alterar la función biológica o los pliegues estructurales, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" se requiere para la función biológica. Funciones similares son a menudo cumplidas por aminoácidos con propiedades químicas o estructurales similares, por ejemplo, el reemplazo de la leucina con isoleucina. Con menos frecuencia, una variante puede tener cambios "no conservativos", por ejemplo, el reemplazo de la glicina con triptófano. Lo mismo es cierto no sólo para residuos de aminoácidos individuales, sino también para secuencias enteras de aminoácidos que pueden ser añadidas u omitidas sin alterar la función biológica de la proteína. Por lo tanto, variaciones menores similares pueden también incluir delecciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Muy a menudo, una secuencia de aminoácidos corta dentro de un polipéptido mucho más grande es principalmente responsable de la actividad o función biológica de una proteína.

[0030] La homología o similitud de secuencias o identidad de secuencias de secuencias de proteínas puede ser fácilmente determinada de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, usando software o programas de ordenador establecidos, por ejemplo el programa BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool) basado en el trabajo de Altschul, S.F. y otros (j. Mol. Biol.; 215 (1990) 403-410 y Nucleic Acids Res.; 25 (1997) 3389-3402) ofreciendo un conjunto de programas de búsqueda de similitudes diseñados para explorar todas las bases de datos de secuencias disponibles sin tener en cuenta si la búsqueda es de proteína o de ADN. los programas BLAST han sido diseñados para la velocidad, con un sacrificio mínimo de la sensibilidad a relaciones de secuencias distantes. los valores asignados en una búsqueda BLAST tienen una interpretación estadística bien definida, haciendo más fácil distinguir las coincidencias reales de los éxitos de antecedentes aleatorios. El BLAST usa un algoritmo heurístico que busca de forma local en oposición a alineaciones globales y es por lo tanto capaz de detectar relaciones entre secuencias que comparten sólo regiones aisladas de similitud. Dicho programa está basado en los algoritmos modificados de Smith y Waterman (J. Mol. biol.; 147 (1981) 195-197) y Sellers (Bull. Math. biol.; 46 (1984) 501-514) para encontrar el mejor segmento de identidad o similitud entre dos secuencias. Cuando se usa una programa de alineaciones de secuencias como el BLAST, para determinar el grado de homología, similitud o identidad de la secuencia, se puede usar el ajuste por defecto, o se puede seleccionar una matriz de puntuación apropiada, como la BLOSUM o la PAM, para optimizar las puntuaciones de identidad, similitud u homología.

[0031] Las proteínas de Bromelaina producidas recombinantemente se pueden usar para elucidar la actividad biológica y el papel de las mismas en la planta.

[0032] Con el fin de explicar modificaciones artificiales de secuencia de aminoácidos que se pueden introducir por una variedad de razones, también se pueden abarcar secuencias que nos son homólogas pero que comparten al menos una similitud de secuencias como se ha definido anteriormente o la estructura tridimensional o la función de una proteína de Bromelaina. se apreciará que particularmente se pueden obtener por intercambio de aminoácidos individuales o por intercambio de los patrones de glicosilación diferentes propiedades de la proteína de Bromelaina o fragmento de la misma. Un efecto de dicho intercambio puede residir en, por ejemplo, una biodisponibilidad

mejorada, por ejemplo, obteniendo una solubilidad más alta en comparación con una proteína o fragmento de la misma, que no lleva el intercambio particular.

[0033] la Bromelaina expresada heterológamente puede mostrar cualquiera de las SEQ ID. No. 1-4. Lo mismo se aplica para los presentes fragmentos que cubren una región particular de dichas proteínas. Las SEQ ID No. 1 y 2 representan en la presente dos secuencias de proteína de Bromelaina del tallo; la SEQ ID. No. 3 la de la Ananaina; y la SEQ IF No.4 la secuencia de aminoácidos de la Bromelaina de fruta (véase Figura 5a-d). Otras proteínas de Bromelaina expresadas heterológamente son las enumeradas en la tabla 1. Los rendimientos de la proteína activa que muestra las SEQ ID. No. 1-4 y las enumeradas en la tabla 1 son preferiblemente ampliadas por omisión del propéptido C-terminal en la extensión que se ha indicado anteriormente. Las secuencias de ADN correspondientes a las proteínas de las SEQ ID. No. 1-4 se indican por las SEQ ID. No. 5-8 (véase Figura 6a-d).

[0034] Se ha descubierto que la secuencia de ADN de la Ananaina con la Seq. Id. No. 7(correspondiente a la proteína con la Seq. ID. No. 3, que representa a la proteína con el contenido más alto en Bromelaina) difiere de las secuencias del estado de la técnica, que son incorrectas.

[0035] De acuerdo con otra realización de la presente invención un fragmento de la proteína de Bromelaina expresada heterológamente comprende al menos 50 aminoácidos, preferiblemente al menos 60, 70, 90, 100, 110, 120 y más preferiblemente al menos 130 aminoácidos. Como se ha indicado anteriormente, el fragmento cubrirá la región de la proteína en la que el sitio activo de la proteína de Bromelaina en cuestión está localizada. La actividad de dichos fragmentos puede ensayada por medios de técnicas conocidas por la persona experta, para seleccionar fragmentos que tienen la actividad de la proteasa.

[0036] Los fragmentos de proteína de Bromelaina se pueden generar clonando y expresando las secuencias de nucleótidos respectivas. Una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las SEQ ID. No. 1-4, es decir SEQ ID No. 5-8, o una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las proteínas subrayadas en la tabla 1 puede ser sometida, por ejemplo, a digestión con ADNs bajo condiciones adecuadas para obtener fragmentos de nucleótido de las longitudes deseadas. Los fragmentos de nucleótido respectivos son entonces clonados en un plásmido de expresión en un huésped adecuado, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*. Los microorganismos recombinantes obtenidos pueden ser puestos en placas de agar que comprenden medio de crecimiento para la levadura y la trioleína lípida que otorga una apariencia lechosa las placas de agar. en el momento de la expresión, que puede ser afectada bajo control de un promotor constitutivo o inducible, los fragmentos de nucleótido que llevan el sitio activo pueden ser expresados en forma de fragmentos de proteína de Bromelaina activos. Como los fragmentos activos comprenden la misma actividad que la proteína de Bromelaina de longitud completa, la digestión de la trioleína puede tener lugar resultando en la aparición de halos claros alrededor de la colonia. La secuencia de aminoácidos puede ser aislada de dicha colonia para determinar la secuencia de ADN y la secuencia péptida respectiva. Otros ensayos adecuados comprenden la conversión del sustrato de caseína lechoso para limpiar productos de la hidrólisis o la escisión de péptidos acoplados con nitroanilida, en donde en el caso de presencia de un grupo de nitroanilida de proteasa adecuado el grupo es escindido y puede ser detectado espectrofotométricamente a 405 nm. Dichos péptidos acoplados con nitro-anilida comprenden, por ejemplo, Arg-Arg-nitroanilida para la Bromelaina de Tallo o Phe-Val-Arg-nitroanilida para la Ananaina.

[0037] Estos y otros ensayos adecuados para la detección de actividad de proteasas o hidrolasas de cisteína en común se pueden encontrar en Bornscheuer U.T., Kazlauskas, R.J., Hydrolases in Organic Synthesis, Wiley-VCH, Weinheim (Germany), 1999). El conocimiento requerido de técnicas de ADN recombinante puede ser, por ejemplo, derivado de Maniatis y otros; Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed., (1989).Estará claro que en caso de que las cepas heterólogas muestren una actividad de proteasa alta, se puede emplear un inhibidor de la proteasa de cisteína específico, como el E64 (Merck).

[0038] La mencionada modificación postraduccional puede distinguir la proteína expresada heterológamente o fragmento de la misma de los resultados de la proteína del tipo salvaje en un patrón de glicosilación diferente. Es bien conocido para la persona experta que organismos diferentes usados para la expresión heteróloga de un polipéptido pueden conferir un patrón de glicosilación diferente que afecta entre otros a una biodisponibilidad del polipéptido.

[0039] La modificación postraduccional de la proteína de Bromelaina expresada heterológamente o fragmentos de la misma puede ser conferida por un organismo huésped seleccionado del grupo consistente de levaduras, células de insectos y células vegetales. La selección de dicho huésped de expresión reside en el conocimiento de la persona experta y comprende la adaptación preliminar del uso del codón de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de Bromelaina o fragmentos de la misma para asegurar una expresión alta. El uso del codón se refiere al fenómeno de preferencias de diferentes organismos para uno o varios codones, es decir, triplete de nucleótidos especificando un residuo de aminoácidos en un polipéptido, que codifica el mismo aminoácido dado. Para evitar dicha preferencia puede ser necesario, por ejemplo, sintetizar químicamente el ADN que codifica la cadena de Bromelaina o el fragmento de la misma, en la que el uso del codón está adaptado al huésped de expresión elegido. Esto está dentro del conocimiento de la persona experta. La expresión de la proteína heteróloga o fragmento de la misma puede ser realizado, por ejemplo, de acuerdo con Brömme D y otros (Methods 32 (2004) 199-206). Se

apreciará que las condiciones para la expresión, que comprenden entre otras temperatura, medio, tipo de recipiente, aireación etc., están dentro del conocimiento de la persona experta.

[0040] La *Pichia pastoris* ha sido aprobada como huésped de expresión. Dichas cepas producen cantidades bajas de proteasas, que se ha descubierto que no perturban la expresión de las proteínas de Bromelaina y fragmentos de las mismas así como los ensayos respectivos en la actividad de la proteasa. Las cepas de *P. pastoris* preferidas son la KM71 o la KM71 H, que permiten la integración en el Locus AOX2 y la metabolización del metanol lenta. Sea sume que debido al consumo de metanol lento y la correspondiente tasa de producción lenta de proteína o fragmentos, se hace posible el plegado correcto y la secreción de la misma. La expresión en la *Pichia pastoris* usando un plásmido adecuado, como el pPIC9 o pPICalpha (ambos de Invitrogen), aseguró altas tasas de transcripción y de traducción. Además, la proteína de Bromelaina o fragmento de la misma mantuvo la solubilidad y la degradación adicional del péptido activo fue reducida o incluso eliminada. La presente proteína de Bromelaina o fragmento de la misma no mostró además una toxicidad significativa al organismo huésped. Otra ventaja de usar levadura, como la *Pichia pastoris*, como huésped de expresión reside en la posibilidad de realizar reducción a escala de experimentos de crecimiento, es decir, usando placas de microtitulación con, por ejemplo, 96 pocillos en lugar de matraces. Esto asegura un rendimiento alto para probar las propiedades, como la capacidad de degradar la caseína. La capacidad de degradar la caseína ejerciendo una actividad de proteasa de la cisteína es a su vez indicativa de una actividad médica subyacente, lo que corresponde al menos en parte con la de la Bromelaina.

[0041] De acuerdo todavía con otra realización de la presente invención, la proteína de Bromelaina expresada heterológamente o fragmentos de la misma lleva medios que permiten la purificación de la proteína de bromelaina o fragmentos de la misma. Dichas técnicas son bien conocidas para la persona experta y pueden ser realizadas por ejemplo generando y expresando un péptido de fusión de la proteína de Bromelaina o fragmento de la misma con una secuencia de aminoácidos particular, que puede ser enlazada reversiblemente a la matriz del material de la columna. La secuencia de aminoácidos puede ser por ejemplo una secuencia etiquetada con polihistidina fusionada con el término N- o C- del péptido a ser purificado. Después de la expresión de la proteína la etiqueta enlaza con el material de afinidad y es liberada por medio de un gradiente de imidazol, separando de este modo la proteína de fusión o el péptido de fusión de otras proteínas y fragmentos. Si se requiere, la etiqueta puede ser eliminada. Dichas técnicas son bien conocidas por la persona experta. Se apreciará que se puede usar cualquier tipo de etiqueta en la presente invención.

[0042] Se ha descubierto por los presentes inventores que es particularmente ventajoso la fusión de la etiqueta en el sitio N-terminal de la proteína de Bromelaina o fragmento de la misma ya que en este caso no sólo el propéptido sino también la secuencia etiquetada es eliminada después de la acidificación. Esto ofrece la posibilidad de evitar la eliminación de la etiqueta por cualquier otro medio, como una endoproteasa.

[0043] Se puede prever la inclusión de la proteína de Bromelaina expresada heterológamente o fragmentos de la misma en una composición farmacéutica, dermatológica o nutricional.

[0044] La composición puede ser formulada de cualquier manera adecuada para la ingestión. La composición nutricional puede ser preparada directamente antes de la ingestión o alternativamente durante el proceso de fabricación. Se prefiere, sin embargo, la composición nutricional en la forma utilizable directamente. La expresión "portador nutricional o farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo, para el uso nutricional o farmacéutico, que administra el componente activo a su sitio de acción y no causará daño significativo al recipiente humano o animal. La forma real del portador, no es, sin embargo, crítica.

[0045] la cantidad total del portador varía preferiblemente de alrededor del 10 a alrededor del 99,9%, más preferiblemente de alrededor del 50 a alrededor del 90% y todavía más preferiblemente de alrededor del 70 a alrededor del 85% por peso de la formulación.

[0046] El portador o medicamento farmacéuticamente aceptable puede estar en la forma de un líquido, gel, cápsula de gel, polvo, pastilla sólida (recubierta o no recubierta), suplemento oral seco, suplemento oral húmedo, alimentación con sonda seca, alimentación con sonda húmeda o similares. El portador está preferiblemente en la forma de una pastilla o cápsula y más preferiblemente en la forma de una cápsula de gelatina dura. Los excipientes y/o portadores adecuados incluyen la maltodextrina, carbonato cálcico, fosfato dicálcico, fosfato tricálcico, celulosa microcristalina, dextrosa, harina de arroz, estearato de magnesio, ácido esteárico, croscarmelosa de sodio, glicolato de almidón sódico, crospovidona, sacarosa, gomas vegetales, lactosa, metilcelulosa, povidona, carboximetilcelulosa, almidón de maíz, y similares (incluyendo mezclas de los mismos).

[0047] Los portadores preferidos incluyen el carbonato cálcico, estearato de magnesio, maltodextrina, y mezclas de los mismos. Los varios ingredientes y el excipiente y/o portador se mezclan y se forman en la forma deseada usando técnicas convencionales. La pastilla o cápsula de la presente invención puede ser recubierto con un recubrimiento entérico que se disuelve a un pH de alrededor de 6,0 a 8,0, preferiblemente a un pH de alrededor de 6,0 a 7,0. Un recubrimiento entérico adecuado que se disuelve en el intestino delgado pero no en el estómago es el ftalato acetato de celulosa. Detalles adicionales de técnicas para la formulación y para la administración se pueden encontrar en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

[0048] Otros portadores aceptables farmacéuticamente adecuados incluyen, pero no están limitados a, agua, aceite mineral, etilenglicol, propilenglicol, lanolina, estearato de clicerilo, estearato de sorbitán, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, acetona, glicerol, fosfatidilcolina, coalto de sodio, o etanol.

[0049] La composición también puede comprende al menos un co- emulsificador, que incluye, pero no está restringido a, monoestearato de sorbitán oxietilenado, alcoholes grasos como el alcohol estearílico o el alcohol cetílico, o ésteres de ácidos grasos y polioles como el estearato de glicerilo.

[0050] Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas están estabilizadas. En general, las metodologías y técnicas de estabilización que se pueden usar incluyen cualquiera de los métodos para la estabilización de material químico o biológico conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, metodologías basadas en la adición de agentes químicos, modulación de la temperatura; metodologías basadas en la radiación o combinaciones de las mismas. Los agentes químicos que se pueden usar incluyen entre otros agentes conservantes; ácidos; bases, sales; antioxidantes; agentes modificadores de la viscosidad; emulsificadores; agentes gelificantes; y mezclas de los mismos.

[0051] Se puede usar una amplia variedad de emulsificadores para proporcionar un efecto beneficioso en las composiciones, y los niveles particulares de uso en conexión con cada tipo o clase de emulsificador se pueden determinar fácilmente. En general un emulsificador o sistema emulsificador seleccionado debería ser capaz de mantener diferentes componentes de la composición nutricional en una dispersión estable, cuando la base está dispersa en un medio acuoso. En la mayoría de los casos cuando la base está dispersa en agua, el emulsificador debería ser capaz de formar emulsiones de aceite en agua estables. En particular, el emulsificador es seleccionado preferiblemente del grupo que consiste de: ácidos estearil-n-lácticos, donde n va desde alrededor de 1 a 5, y las sales sódicas, potásicas y cálcicas de los mismos, mono- y diglicéridos succinilados de ácidos grasos C12-C24 y las sales sódicas y potásicas de los mismos, ésteres de ácido diacetil tartárico de mono- y diglicéridos de ácidos grasos C12-C24 comestibles, y las sales sódicas y potásicas de los mismos, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos C12-C24 comestibles, variando de 3 a 10 unidades de glicerol y uno a diez ácidos grasos por molécula, mono-, di- y triésteres de polioxietileno (20) de sorbitán de ácidos grasos comestibles C12-C24, mono- y diglicéridos etoxilados de ácidos grasos C12-C24 comestibles, citrato monoglicérido estearil, y las sales sódicas y potásicas de los mismos, ésteres de ácidos grasos de mono- y diglicéridos de ácidos grasos C12-C24 comestibles, y las sales sódicas y potásicas de los mismos, mono- y diésteres de propilen glicol de ácidos grasos C12-C24 comestibles, mono- y diésteres de glicerol de ácidos grasos C12-C24 comestibles, propilen glicol lactilado t mono- y diésteres de glicerol de ácidos grasos C12-C24 comestibles, propilen glicol acetilado y mono- y diésteres de glicerol de ácidos grasos C12-C24 comestibles, monoestearato de sorbitán, lecitina, ésteres de sacarosa de ácidos grasos C12-C24 comestibles, mono- y diglicéridos fosfatados de ácidos grasos C12-C24 comestibles, y mezclas de los mismos. Más preferiblemente, el emulsificador es aniónico y es seleccionado del grupo que consiste de estearil-2-lactilato sódico, mono- y diglicéridos succinilados de ácidos grasos C12-C24 comestibles, ésteres de ácido diacetil tartárico de mono- y diglicéridos de ésteres de ácidos grasos C12-C24 en su forma de ácido o de sal, y mezclas de los mismos.

[0052] El suplemento puede ser proporcionado como un polvo o líquido para ser añadido por el consumidor a una comida o bebida. Por ejemplo, el suplemento dietético puede ser administrado a un individuo en la forma de un polvo, por ejemplo para ser usado mezclándolo en una bebida, o agitando en una comida semi-sólida como un pudding, un topping, salsa, puré, cereal cocinado, o aderezo para ensalada, por ejemplo, o añadiéndolo de otra manera a una comida.

[0053] Las composiciones o suplementos nutricionales (por ejemplo, barras energéticas o barras o bebidas de reemplazo de comidas se pueden proporcionar comprendiendo 5-D-fructosa deshidrogenasa como ingrediente activo. El suplemento nutricional puede servir como un reemplazo de comida o tentempié y generalmente proporciona calorías nutrientes. Preferiblemente, los suplementos nutricionales proporcionan carbohidratos, proteínas, y grasas en cantidades equilibradas. El suplemento nutricional puede además comprender carbohidratos, de longitud de cadena media, simple, o polisacáridos adecuados, o una combinación de los mismos.

[0054] Se pueden añadir azúcares. debe estar claro que los azúcares que forman fructosa ya sea por degradación o conversión química/enzimática tienen sólo una aplicación limitada y pueden ser incorporadas sólo en case de una indicación particular. Sin embargo, un azúcar simple puede ser elegido por las propiedades organolépticas deseables. La maicena sin cocinar es un ejemplo de carbohidrato complejo. Si se desea que debería mantener su estructura de peso molecular alto, debería incluirse sólo en formulaciones de comida o porciones de la misma que no están cocinadas o procesadas por calor ya que el calor descompondrá el carbohidrato complejo en carbohidratos simples, en donde los carbohidratos simples son mono- o disacáridos. El suplemento nutricional puede contener combinaciones de fuentes de carbohidratos de tres niveles de longitud de la cadena (simple, media y compleja; por ejemplo, sacarosa, maltodextrinas y maicena sin cocinar).

[0055] Las fuentes de proteínas a ser incorporadas en el suplemento nutricional de la invención pueden ser cualquier proteína adecuada utilizada en formulaciones nutricionales y pueden incluir proteína de suero, concentrado de proteína de suero, polvo de suero, huevo, harina de soja, leche de soja proteína de soja, aislado de proteína de soja, caseinato (por ejemplo, caseinato sódico, caseinato cálcico sódico, caseinato cálcico, caseinato potásico),

proteínas animales y vegetales y mezclas de los mismos. Cuando se elige una fuente de proteínas, se debe considerar primero el valor biológico de la proteína, con los valores biológicos más altos siendo encontrados en el caseinato, suero, lactalbúmina, albúmina de huevo y proteínas de huevo completo. La proteína puede ser una combinación de concentrado de proteína de suero y caseinato cálcico. Estas proteínas tienen alto valor biológico, es decir, tienen una alta proporción de los aminoácidos esenciales. Ver Modern Nutrition in Health and Disease, octava edición, Lea & Febiger, editores, 1986, especialmente el Volumen 1, páginas 30-32. Ejemplo de proteínas de suero incluyen el polvo obtenido concentrando y secando suero, el concentrado de proteína de suero (WPC) obtenida concentrando el suero por ultrafiltración (UF) y secando después, WPC desgrasada (baja en grasas y alto contenido de proteínas) obtenida eliminando la grasa del suero, seguido por concentración por UF, WPI obtenida aislando selectivamente sólo la proteína del suero, suero desalado obtenido por concentración por nanofiltración, y suero concentrado mineral en el que los componentes minerales derivados del suero se han concentrado.

[0056] El suplemento nutricional puede también contener otros ingredientes, como una o una combinación de otras vitaminas, minerales, antioxidantes, fibra y otros suplementos dietéticos (por ejemplo, proteínas, aminoácidos, colina, lecitina, ácidos grasos omega 3). La selección de uno o varios de estos ingredientes es un problema de formulación, diseño, preferencia del consumidor y usuario final. Las cantidades de estos ingredientes añadidos a los suplementos dietéticos de esta invención son conocidos fácilmente por la persona experta. Vitaminas y minerales adicionales que se pueden añadir incluyen, pero no están limitados a, fosfato o acetato cálcico, tribásico; fosfato potásico, dibásico; sulfato u óxido de magnesio; sal (cloruro sódico); cloruro o acetato potásico; ácido ascórbico; ortofosfato férrico; niacinamida; sulfato u óxido de zinc; pantoato cálcico; gluconato de cobre; riboflavina, beta-caroteno; hidrocloreto de piridoxina, mononitrato de tiamina; ácido fólico; biotina; cloruro o picolonato de cromo; yoduro potásico; selenato sódico; molibdato sódico; filoquinona; vitamina D3; cianocobalamina; selenita sódica; sulfato de cobre; vitamina A; vitamina C; inositol; yoduro potásico.

[0057] Se pueden incorporar en el producto aromas, agentes colorantes, especias, frutos secos y similares. Los condimentos pueden estar en la forma de extractos aromatizados, aceites volátiles, aromas de chocolate, aromas de mantequilla de cacahuete, migas de galletas, arroz tostado, vainilla o cualquier aromatizante comercialmente disponible. Ejemplos de aromatizantes útiles incluyen, pero no están limitados a, extracto de anís puro, extracto de imitación al plátano, extracto de imitación a la cereza, extracto de chocolate, extracto de limón puro, extracto de naranja puro, extracto de menta puro, extracto de imitación de piña, extracto de imitación de ron, extracto de imitación de fresa, o extracto de vainilla puro; o aceites volátiles, como aceite de melisa, aceite de laurel, aceite de bergamota, aceite de madera de cedro, aceite de nuez, aceite de cereza, aceite de canela, aceite de clavo, o aceite de menta; mantequilla de cacahuete, aromatizante de chocolate, migas de galleta de vainilla, mantequilla o tofe. El suplemento dietético puede contener coco o chocolate.

[0058] Se pueden añadir emulsificadores para estabilizar el producto final. Ejemplos de emulsificadores adecuados incluyen, pero no están limitados a, lecitina (por ejemplo de huevo o soja), y/o mono- y diglicéridos. Otros emulsificadores serán fácilmente evidentes para el experto en la materia y la elección de los emulsificadores adecuados dependerá, en parte, de la formulación y el producto final. También se pueden añadir conservantes al suplemento nutricional para extender la vida útil del producto. Preferiblemente, se usan conservantes como el sorbato potásico, sorbato sódico, benzoato potásico, benzoato sódico o EDTA cálcico disódico.

[0059] El suplemento nutricional puede contener, dependiendo de los conocimientos del experto en la materia y la aplicación respectiva, edulcorantes naturales o artificiales (preferiblemente bajos en calorías), por ejemplo sacáridos particulares, ciclamatos, aspartamina, aspartamo, acesulfamo K, y/o sorbitol que se consideran que lo son. Dichos edulcorantes artificiales pueden ser deseables si el suplemento nutricional se pretende que sea consumido por un individuo con sobrepeso u obeso, o un individuo con diabetes del tipo II que es propenso a la hiperglucemia.

[0060] La composición nutricional puede comprender uno o más ingredientes inertes, especialmente si es deseable limitar el número de calorías añadidas a la dieta por el suplemento dietético. Por ejemplo, el suplemento dietético de la presente invención puede también contener ingredientes opcionales incluyendo, por ejemplo, hierbas, vitaminas, minerales, potenciadores, colorantes, edulcorantes, aromatizantes, ingredientes inertes, y similares. Por ejemplo, la composición nutricional puede contener uno o más de los siguientes: ascorbatos (ácido ascórbico, sales de ascorbato minerales, escaramujo, acerola, y similares), dehidroepiandrosterona (DHEA), Fo-Ti o Ho Shu Wu (hierba común en los tratamientos Asiáticos tradicionales), Uña de gato (antiguo ingrediente herbario), te verde (polifenoles), inositol, algas, dulce, bioflavonoides, maltodextrina, ortigas, niacina, niacinamida, romero, selenio, sílice (dióxido de silicio, gel de silicio, cola de caballo, shavegrass y similares), espirulina, zinc, y similares. dichos ingredientes opcionales pueden ser de origen natural o formas concentradas.

[0061] El suplemento nutricional puede ser proporcionado en una variedad de formas, y por una variedad de métodos de producción. Para fabricar una barra alimenticia, los ingredientes líquidos son cocinados, los ingredientes secos se añaden con los ingredientes líquidos en un mezclador y se mezclan hasta que se llega a la fase de masa, la masa se pone en un extrusor y se extrude, la masa extruida se corta en las longitudes apropiadas; y se enfría el producto. Las barras pueden contener otros nutrientes y rellenos para mejorar el sabor, además de los ingredientes específicamente mencionados en la presente. La presente invención proporciona además productos alimenticios, productos alimenticios preparados, o alimentos que comprenden 5-D-fructosa deshidrogenasa. Por

ejemplo, se proporcionan bebidas y alimentos sólidos o semisólidos que comprenden 5-D-fructosa deshidrogenasa. Estas formas pueden incluir bebidas (por ejemplo, refrescos, leche y otras bebidas lácteas, y bebidas de dieta), productos horneados, pudines, productos lácteos, dulces, aperitivos, o dulces o novedades congelados (por ejemplo, helados, batidos de leche), comidas congeladas preparadas, caramelos, productos de aperitivos (por ejemplo, patatas fritas), sopas, pastas, salsas, aliños para ensaladas, productos de charcutería, queso, yogurt, chocolate, leche, yogur, cuajada, queso, leches fermentadas, productos fermentados basados en la leche, helados, productos basados en cereales fermentados, polvos basados en leche, preparados para lactantes o alimentos para mascotas y cualquier otra grasa o aceite que contienen los alimentos, y los ingredientes de alimentos (por ejemplo, harina de trigo).

[0062] En muchas formas es necesario o deseable añadir ingredientes opcionales para impartir las propiedades organolépticas o nutricionales al producto. Dichos agentes son bien conocidos para los expertos en la técnica y pueden incluir los seleccionados del grupo consistente de vitaminas, minerales, agentes aromatizantes, edulcorantes (por ejemplo, sacarosa u otros azúcares), agentes colorantes, sal, agentes de ajuste del pH, reguladores, estabilizadores, aminoácidos esenciales, agentes antiaglomerantes, agentes antiespumantes, y mezclas de los mismos. De nuevo, estos ingredientes opcionales pueden ser usados en cantidades menores que las necesarias para crear propiedades deseables en los productos finales.

[0063] Las composiciones nutricionales pueden además contener una fibra alimenticia. La fibra alimenticia puede ser o fibra alimenticia soluble al agua o fibra alimenticia no soluble al agua. Ejemplos de fibra alimenticia soluble al agua incluye dextrina escasamente digerible, pectina, glucomanano, ácido algínico, hidrolizado de ácido algínico, goma guar, producto de goma guar obtenido por enzimolisis, y galactomanano. Se prefiere la dextrina escasamente digestible porque puede ser fácilmente añadida a la comida y no altera el procesamiento de la comida. Ejemplos de fibra alimenticia no soluble al agua incluye celulosa cristalina, fibra alimenticia de haba de soja, salvado de trigo, fibra de maíz y fibra de remolacha.

[0064] Otros compuestos adecuados para el uso con 5-D-fructosa deshidrogenasa en la preparación de un portador respectivo incluyen uno o más de los activos vitamínicos, incluyendo pero no restringido a, vitamina A y derivados, incluyendo ácido retinoico, aldehído retinol, retin A, palmitato retinol, adapaleno, y beta-caroteno; vitamina B (pantenol, provitamina B5, ácido panténico, factor complejo de la vitamina B); vitamina C (ácido ascórbico y sales del mismo) y derivados como palmitato de ascorbilo; vitamina D incluyendo calcipotriol (un análogo de la vitamina D3) vitamina E incluyendo sus constituyentes individuales alfa-, beta-, gamma, delta-tocoferol y cotrienoles y mezclas de los mismos y derivados de la vitamina E incluyendo palmitato de vitamina E, linolato de vitamina E y acetato de vitamina E; vitamina K y sus derivados, vitamina Q (ubiquinona) y mezclas de los mismos. Preferiblemente, las composiciones están estabilizadas. En general, las metodologías y técnicas de estabilización que pueden ser usadas de acuerdo con la presente invención incluyen cualquiera y todos los métodos para la estabilización de material químico y biológico conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la adición de agentes químicos, metodologías basadas en la modulación de la temperatura; metodologías basadas en la radiación o combinaciones de las mismas. Los agentes químicos que se pueden usar incluyen entre otros agentes conservantes; ácidos; bases; sales; antioxidantes; agentes modificadores de la viscosidad; emulsificadores; agentes gelificantes; y mezclas de los mismos.

[0065] Las composiciones pueden también incluir modificadores de la viscosidad, preferiblemente en cantidades de alrededor del 0,01 a alrededor del 105 por peso de la composición. Los modificadores de la viscosidad como el alcohol cetílico, el glicerol, el polietilenglicol (PEG), PEG-estearato, o el Keltrol pueden también ser usados para mejorar la estabilidad de la formulación. Los espesantes pueden mejorar la estabilidad incluyendo los agentes gelificantes como la celulosa y derivados., el Carbopol y derivados, la algarroba, carregeninas y derivados, goma xantana, goma sclerane, alcanolamidas de cadena larga, bentona y derivados, Kaolin USO, Veegum Ultra. Arcilla verde, NFBC Bentonita, silicato de aluminio de magnesio (Veegum®), gomas guar (como la JaguarHP-120 ®), goma xantana, celulosa de caroximetil sódica, celulosas de hidroxialquilo y alquilo, polímeros de ácido acrílico reticulados, y mezclas de los mismos. Como es conocido por la persona experta, la cantidad precisa de espesantes puede variar dependiendo de la consistencia y espesor de la composición que se desea.

[0066] Las composiciones nutricionales y farmacéuticas pueden ser administradas en una cantidad para ser efectiva para la aplicación pretendida y el sujeto a ser tratado. Con este fin, la dosificación de la composición y otros constituyentes pueden variar dependiendo de la edad, peso, y condición del sujeto. En general, el agente activo es administrado preferiblemente a una concentración que proporcionará resultados efectivos sin causar ningún efecto secundario dañino o perjudicial, y puede ser administrada o como una dosis de unidad individual, o si se desea en subunidades convenientes administradas en plazos adecuados a lo largo del día.

[0067] La composición nutricional o farmacéutica puede ser administrada múltiples veces en un día, por ejemplo de dos a cinco veces sumando la cantidad necesaria para un día, o continuamente para un plazo necesario.

[0068] Una composición farmacéutica puede ser preparada, por ejemplo, por un proceso de granulación húmedo, en el que los componentes activos en forma de polvo se presentan en un granulador adecuado y posteriormente humedecidos o rociados con material derretido. Las fuerzas de cizallamiento aplicadas llevan a un mezclado

intensivo del polvo y, con la adición de soluciones aglutinantes, a la formación rápida de granulados de alta densidad. La granulación se requiere para mejorar el flujo de mezclas de polvo y las propiedades mecánicas de las pastillas. Los gránulos son habitualmente obtenidos añadiendo líquidos (soluciones aglutinantes o solventes). Cantidades más grandes del proceso de granulación del líquido producen un intervalo de tamaño de partículas más estrecho y gránulos más duros y más gruesos, es decir, la proporción de partículas de granulado fino disminuye. La cantidad óptima de líquido necesario para conseguir un tamaño de partícula dado debería ser conocida para mantener unas variaciones lote a lote al mínimo. La granulación húmeda mejora el flujo, la compresibilidad, la biodisponibilidad, la homogeneidad, las propiedades electroestáticas, y la estabilidad de las formas de dosificación sólidas.

[0069] La composición farmacéutica puede ser una forma de dosificación sólida. Las formas de dosificación sólida ejemplares incluyen pastillas, cápsulas, sobres, grageas, polvos, píldoras o gránulos. La forma de dosificación sólida puede ser, por ejemplo, una forma de dosificación de liberación inmediata, una forma de dosificación de fusión rápida, una forma de dosificación de liberación controlada, una forma de dosificación liofilizada, una forma de dosificación de liberación retardada, una forma de dosificación de liberación extendida, una forma de dosificación de liberación pulsátil, una forma de dosificación de liberación controlada y liberación inmediata mixta, o una combinación de las mismas. Se prefiere una formulación de pastilla de dosis sólida. La forma de dosificación sólida es preferiblemente una forma de dosificación de liberación inmediata ofreciendo ventajas respecto a la biodisponibilidad de los compuestos activos.

[0070] Si se elige la forma de dosificación de liberación inmediata, estará claro para la persona experta que la cantidad de agente(s) que controlan la liberación a ser usados en la formación de la parte exterior será determinada en base a varios parámetros como las propiedades de administración deseadas, incluyendo la cantidad de ingrediente o sustancia activa a ser administrada, la tasa deseada de liberación del ingrediente o sustancia activa, y el tamaño de las partículas de la micro matriz.

[0071] La forma de dosificación de liberación inmediata puede también incluir un material que mejora el procesamiento de los agentes que controlan la liberación. A dichos materiales se hace referencia de forma general como plastificantes. Los plastificantes preferidos incluyen monoglicéridos acetilados, butil ftalil butil glicolato, dibutil tartrato, dietil ftalato, dimetil ftalato, etil ftalil etil glicolato, glicerina, etilenglicol, propilenglicol, trietil citrato, triacetina, tripropinoína, diacetina, dibutil ftalato, monoglicérido de acetilo, glicoles de polietileno, aceite de ricino, trietil acetato, alcoholes polihídricos, ésteres de acetato, triacetato de glicerol, citrato de acetil trietilo, dibenzil ftalato, dihexil ftalato, butil octil ftalato, diisononil ftalato, butil octil ftalato, azelato de dioctilo, talato epoxidizado, trimelitato de triisocetil, dietilhexil ftalato, di-n-octil ftalato, dioctil ftalato, di-i-decil ftalato, di-n-undecil ftalato, di-n-tridecil ftalato, tri-2-etilexil trimelitato, di-2-etilexil adipato, di-2-etilexil sebacato, di-2-etilexil azelato, dibutil sebacato, monocaprilato de glicerilo, deistarato de glicerilo y monocaprato de glicerilo.

[0072] La forma de dosificación puede ser fabricada de acuerdo con el procedimiento siguiente: las partículas del núcleo pueden ser producidas de acuerdo con las técnicas habituales en las que el ingrediente o sustancia activo y uno o más de los agentes de control de la liberación son mezclados y granulados añadiendo solvente en un mezclador de corte bajo o alto o por granulador de lecho fluidizado. El granulado se seca, por ejemplo, en un secador de lecho fluidizado. el granulado secado es calibrado.. El calibrado de las partículas de la micromatriz puede ser realizado usando un granulador oscilante, un molino de trituración o cualquier otro método convencional. El tamiz usado para el calibrado puede tener aperturas de 0,25 mm a 5 mm. Alternativamente, las partículas del núcleo se pueden hacer por extrusión, esferonización, granulación por fusión o por compactación por rodillo. Las partículas del núcleo se pueden recubrir por una solución de uno más agentes controladores de la liberación por cualquier método conocido, incluyendo aplicación por pulverización. La pulverización se puede llevar a cabo usando un recubridor de lecho fluidizado (preferiblemente recubrimiento Wurster), o en un sistema de recubrimiento de bandeja. Alternativamente el recubrimiento de las partículas del núcleo con uno o más agentes controladores de la velocidad se puede hacer por un proceso de fusión caliente usando un granulador o un recubridor de lecho fluidizado (preferiblemente recubrimiento Wurster), o en un sistema de recubrimiento de bandeja. La compresión de las micro pastillas se lleva a cabo en máquinas de compresión habituales (por ejemplo, máquinas de Manesty, Cadmach o Kilian). Las micro pastillas se pueden hacer de varios tamaños y formas como redondas, ovaladas, oblongas, en forma de cápsula, triangulares, cuadradas, etc. La forma preferida de una micro pastilla es redonda, biconvexa y el diámetro preferido de la micro pastilla es de 1,5 mm a 9,5 mm.

[0073] Las micro pastillas pueden ser recubiertas con una solución de uno o más agentes controladores de la liberación por cualquier método conocido, incluyendo aplicación por pulverización. la pulverización se puede llevar a cabo usando un recubrimiento de lecho fluidizado (preferiblemente recubrimiento Wurster), o en un sistema de recubrimiento de bandeja.

[0074] Alternativamente el recubrimiento de las micro pastillas con uno o más agentes controladores de la velocidad se puede hacer por proceso de fundición en caliente usando un recubridor de lecho fluidizado preferiblemetne recubrimiento Wurster), o en un sistema de recubrimiento de bandeja. Las micro pastillas pueden ser llenadas en la cubierta usando una máquina de llenado de cápsulas de funcionamiento manual, semiautomático o automático.

[0075] La composición puede también estar presente en una forma de dosificación particular para mejorar al biodisponibilidad de las presentes proteínas o fragmentos de las mismas. El término biodisponibilidad describe la velocidad y extensión a la que el ingrediente activo o fracción activa es absorbida de un producto farmacéutico y se vuelve disponible en el sitio de acción. La biodisponibilidad de los fármacos ingeridos oralmente se determina por factores, que incluyen la naturaleza de la molécula, su estabilidad, y la formulación administrada - y en el paciente - como un área de superficie intestinal reducida como resultado de una enfermedad cólica o resección intestinal y si el fármaco se toma con una comida o no. Factores que influyen en la biodisponibilidad pueden incluir, pero no están limitados a una pobre absorción del tracto gastrointestinal, el efecto del primer paso hepático y la degradación del fármaco antes de llegar al sistema circulatorio.

[0076] Se pueden usar diferentes fracciones de tamaños de partículas de la presente proteína o fragmento de la misma. El tamaño preferido de partícula de d_{90} es menos de 100 μm , más preferiblemente menos de 50 μm , más preferiblemente menos de 10 μm .

[0077] La composición farmacéutica puede contener además de la proteína de Bromelaina o fragmentos de la misma uno o más diluyentes, agentes aglutinantes, disgregantes, lubricantes, edulcorantes, deslizantes, aromatizantes, agentes colorantes y otros excipientes, dependiendo de la forma de dosificación deseada.

[0078] Los diluyentes adecuados incluyen rellenos farmacéuticamente aceptables como la lactosa, celulosa microcristalina, fosfato cálcico dibásico, sacáridos y/o mezclas de los anteriores. Ejemplos de diluyentes incluyen la celulosa microcristalina, como la Avicel PH 101® y la Avicel® PH 102; lactosa como el monohidrato de lactosa, anhídrido de lactosa y Pharmatose® DCL 21; fosfato cálcico dibásico como el Emcompress®, manitol, almidón, sorbitol, sacarosa y glucosa. Los más preferidos son la celulosa microcristalina y la lactosa.

[0079] Los agentes aglutinantes son seleccionados preferiblemente de polivinilpirolidona, grados de almidón (pregelatinizados o planos), derivados de la celulosa como la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), la hidroxipropilcelulosa (HPC) y la carboximetilcelulosa (CMC) y sus sales y gelatina, la más preferida es la HPMC.

[0080] Los disgregantes adecuados incluyen la croscamelosa sódica, crospovidona, glicolato de almidón sódico, almidón de maíz, almidón de patata, almidón de maíz y silicatos cálcicos de almidón modificados, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución y similares. La más preferida es la croscamelosa sódica.

[0081] Los lubricantes son preferiblemente seleccionados del grupo consistente de estearato magnésico, lauril sulfato magnésico y fumarato estearilo magnésico, ésteres de sacarosa o ácidos grasos, polietilenglicol, ácido esteárico y similares.

[0082] Los edulcorantes son preferiblemente seleccionados del grupo consistente de aspartamo, sacarina sódica, glicirrizinato dipotásico, aspartamo, stevia, taumatina y similares.

[0083] Los deslizantes son seleccionados preferiblemente del grupo consistente de dióxido de silicio, talco y silicato de aluminio.

[0084] Como aromatizantes, agentes colorantes, o agentes opacificantes y pigmentos se pueden usar cualquier compuesto conocido por la persona experta.

[0085] Los presentes inventores han descubierto que los efectos positivos asignados a la Bromelaina también pueden ser conferidos a las proteínas particulares y fragmentos de las mismas. Debido a las ventajas inherentes de las técnicas recombinantes, las proteínas y fragmentos de las mismas se pueden obtener con una pureza más alta, evitando particularmente la presencia de otras proteínas o fragmentos de proteínas, llevando a unos efectos secundarios disminuidos. También se ha descubierto que las proteínas de Bromelaina o fragmentos de las mismas tienen, incluso en solución acuosa, una estabilidad de almacenamiento más alta sobre un periodo largo. Los efectos positivos de las proteínas de Bromelaina o fragmentos de las mismas comprenden propiedades de reducción de edemas, hemolíticas, fibrinolíticas, antiinflamatorias, anti-metástasis e inhibidoras de tumores. Adicionalmente, se pueden esperar efectos estimulatorios del sistema inmune, como la aceleración de la curación de heridas.

[0086] Por lo tanto, una proteína de bromelaina o un fragmento de la misma se puede usar para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento del cáncer, aterosclerosis, infecciones bacterianas, inflamaciones, trombosis y edemas. Particularmente, la Ananaína se puede usar para la prevención y/o tratamiento del cáncer así como para inhibir la formación de metástasis ya que la Ananaína se encuentra en la fracción F9, aislada de acuerdo con Harrach y Maurer (1996), lo que ya se ha probado que es efectivo en la inhibición de la activación de la ERK-2.

[0087] La presente invención se ilustra en los siguientes ejemplos sin limitarla.

Ejemplos

5 **[0088]** A menos que se indique lo contrario, las técnicas de ADN recombinante se han realizado de acuerdo con Maniatis y otros; Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª ed., El agua purificada fue obtenida empleando un PURELAB ultra (ELGA).

Aislamiento del ARN

10 **[0089]** El ARN y también el ADN y las proteínas fueron aisladas usando un Qiazol kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante: Mezclar 1 ml de Qiazol con material vegetal para 50-100 mg de peso fresco. Para retirar los polisacáridos, la mezcla fue centrifugada 10 minutos, 12.000 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante fue incubado 5 minutos a 30° C. Se añadió cloroformo en una cantidad de 0,2 ml por ml de Qiazol. La solución fue mezclada exhaustivamente durante 15 segundos. La mezcla fue incubada a 30° C durante minutos. Después la mezcla fue centrifugada durante 15 minutos, a 4° C, 2.000 x g. La fase superior, que contiene el ARN, fue retirada y

15 mezclada con 0,5 ml de isopropanol por ml de Qiazol. La mezcla fue centrifugada 10 minutos, a 4° C, 12.000 x g y se eliminó el sobrenadante. El pellet de ARN fue lavado con 1 ml de 75% de Etanol (hecho con agua DEPC) por ml de Qiazol, mezclado exhaustivamente y centrifugado a 7500 x g, 5 minutos, 4° C. Después de la retirada del sobrenadante, el pellet fue resuspendido en RNasa libre de agua.

20 **[0090]** Se obtuvieron mayores cantidades de ARN libre de ADN y proteínas del tallo de la piña usando el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) adicionalmente después de eso.

Preparación de una biblioteca de ADNc genómico

25 **[0091]** Para la preparación de la biblioteca de ADNc genómico se usó el SMART IV™ cDNA Library Construction Kit (Clontech). La primera y segunda síntesis de la cadena, la digestión proteínasa K, la digestión con *SfiI*, el fraccionamiento por exclusión del tamaño del ADNc, la ligación del corte *SfiI* ADNc en el corte *SfiI*, el vector p-DNR-LIB desfosforilado y la transformación del inserto obtenido que contiene el vector se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30

Preparación de productos PCR con cebadores degenerados

35 **[0092]** Las secuencias de cebadores degenerados fueron generadas usando el programa "Codehop" <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html> y el uso de codones de *Oryza sativa* como el arroz que tiene un contenido de GC similar como la *A. comosus* y que pertenece al mismo orden de Poales. Las secuencias subyacentes fueron aquellas de la bromelaina del tallo stb1 (Acnr¹: P14518), Ananaína an1 (Acnr¹: CAA05487), Bromelaina de fruta fb1 (Acnr¹: D14059) stb2 (Acnr¹: AC09829) y stb3 (Acnr¹: AC09830). La Tabla 2 muestra los cebadores empleados para el PCR (concentración 100 pmol/μl).

40 **[0093]** La reacción PCR para la colonia de PCR comprendió un único paso de 94° C durante 5 minutos y 30 ciclos de cada uno 94° C durante 1 minuto + 54° C durante 1 minuto + 72° C durante 1 minuto, seguidos por 72° C durante 7 minutos y almacenamiento a 4° C.

45 **[0094]** Las reacciones PCR para la amplificación de secuencias para propósitos de clonación comprendieron un único paso de 98° C durante 1 minuto y 25 ciclos de cada uno 98° C durante 8 segundos + 59° C durante 20 segundos + 72° C durante 25 segundos, seguido por 72° C durante 5 minutos y almacenamiento a 4° C.

50 **[0095]** La reacción PCR fue realizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante en regulador HF para alta fidelidad con Polimerasa Phusion™.

Polimerasa- Phusion; NEB

[0096]

55 10 μl 10 x regulador HF (NEB)
0,5 μl cebador A (100 pmol/μl)
0,5 μl cebador B (100 pmol/μl)
0,5 μl dNTP-Mix (10 mM, Fermentas)

60 x μl ddH₂O
0, 2 μl Phusion (2,0 U/μl) (NEB)
x ng ADN

65 50 μl ∑ agua estéril

[0097] Como plantilla se usó pDNR-LIB que contenía fragmentos de ADNc. Las secuencias amplificadas fueron pCRII subclonadas por TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante.

[0098] E PCR de colonia fue realizado usando taq-Polymerasa (Fermentas). Por lo tanto todos los componentes fueron puestos en pipetas y el material celular fue añadido a la reacción.

PCR de colonia

[0099]

5 µl 10X regulador
5 µl 25 mM MgCl ₂
1 µl 25 mM dNTPs
1 µl 5' AOX1 cebador (10 pmol/µl)
1 µl 3' AOX1 cebador (10 pmol/µl)
27 µl agua estéril
5 µl material celular
45 µl volumen total

[0100] Las reacciones del PCR, que fueron todas realizadas con recipientes de reacción de PCR estériles (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) en un Gradiente Mastercycler (Eppendorf, Alemania), fueron separadas por medio de un gel de agarosa SDS convencional extirpado y purificado por medio del NucleoSpin® Plasmid-DNA Kit (Macherey & Nagel, Düren, Alemania) o Columnas Microspin (Amersham Pharmacia) para la secuenciación. Los productos fueron clonados en pTOPO-PCRII (Invitrogen). Los geles fueron realizados por medio de un Mighty Small SE250/SE260 (Hoefer) empleando SUB-CELL® GT o MINI-SUB-CELL® GT (ambos de Biorad). Como centrifugos se usaron el centrifugo de enfriamientoAvanti JE (Beckmann Coulter), Biofuge pico o Biofuge fresco (ambos de Heraeus).

Secuenciación

[0101] Como las proteínas de Bromelaina muestran en general una alta similitud de secuencias del 95% o más entre sí, las secuencias que cumplían este criterio con respecto a las proteínas de Bromelaina ya conocidas (véase la Figura 1) se han usado para una evaluación adicional. La secuenciación el ADN ha sido realizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante con un secuenciador capilar (MWG).

Condiciones de clonación/crecimiento

[0102] Las secuencias de dos Bromelainas de tallo (figuras 6a y 6b), Ananaina (figura 6c) y Bromelaina de fruta (figura 6d) se han clonado en un marco en pPIC9 o pPICZA (ambos de Invitrogen) usando sitios de restricción *EcoRI* y *NotI*, que se muestran para la *stb3* (Acnr¹: AC09830) en la figura 7. La clonación fue realizada con un Gene pulser/Pulse Controller (ambos de Biorad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0103] A este respecto se ha descubierto que la expresión de la proteína llevada a cabo de acuerdo con el EasySelect™ PichiaExpression Kit no produjo ningún clon en las varias modificaciones que se han aplicado. El vector ha sido linealizado con *BglII* en lugar de *SacI* antes de la aplicación del *EcoRI* y el *NotI* ya que la linealización con *BglII* permite un regulador de sal alto más adecuado en caso de grandes cantidades de ADN. Se ha descubierto además que las células se pueden hacer crecer en placas de microtitulación de 96 pocillos estándares usando 250 µl de medio de crecimiento y antibiótico para la selección, permitiendo cribado de alta densidad para los clones activos. La inducción fue realizada en OD600 de aproximadamente 4 (4±0,2), que se obtiene para todos los pocillos después de 60 horas. En este punto la glicerina fue completamente consumida, en todos los pocillos que mostraron esencialmente la misma densidad óptica de 4.. Para la primera inducción se han empleado 250 µl de medio mínimo con una concentración e metanol de 2x, mientras que las inducciones posteriores fueron llevadas a cabo todas a 12 horas con 50 µl de medio mínimo con una concentración de metanol de 10x.

[0104] Como control se usó pPICZ/*gfp*, que fue amablemente obtenido de Glieder, TU Graz. Dicho plásmido comprende *gfp* (Shimomura O. y otros, J. Cell. Comp. Physiol., 59 (1962), 223-239; Shimomura O., J. Microsc., 217 (2005), 1-15), empleando los mismos sitios de restricción y las mismas condiciones para el crecimiento y la inducción.

[0105] 100 µl de sobrenadante de cultivos de expresión de Pichia pastoris An1 (Acnr¹: CAA05487), que se obtiene de la misma manera que el STB3, y ha sido sometido a SDS-Page usando condiciones estándares (vease Figura 2).

Ensayo de la actividad de la proteasa

[0106] Se diluyeron 100 µl de sobrenadante de cultivos de expresión de *Pichia pastoris* en medio mínimo BMM o medio completo BMMY con regulador (pH 4) para escindir el proenzima. La solución fue posteriormente incubada durante 30 minutos a 55° C y se añadió caseína resultando en una concentración final del 1%. El OD600 fue determinado después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente usando un lector de placas de microtitulación estándar (véase Figura 4).

[0107] La *P. pastoris* que comprendía pPICZA con factor alfa, propéptido y Ananaína (An1) pero sin la secuencia de proteasa de cisteína C-terminal, mostró los mejores resultados. Se obtuvieron 12 mg/l de AN1 activo (caseína como sustrato) en 1 l de medio BMM (pH 6) cultivada durante hasta 48 h en matraces de agitación equipados con tres o cuatro deflectores a 230 rpm y 28° C, empleando una incubadora de agitación Unitron HT (Infors). la proananaína mostro después de 7 días de almacenamiento a 4° C un 90% de la actividad inicial hacia la caseína como sustrato.

Análisis MALDI-ToF de proteínas de Bromelaina

[0108] Las muestras de los sobrenadantes fueron tomadas después de 3 días de cultivo y se purificaron con Zip-Tips (Millipore) antes de someterlas a Análisis MALDI-ToF empleando un analizador de masa 4800 TOF/TOF (Applied Biosystems).

[0109] Se podría derivar que la señal de secreción fue escindida de una manera correcta. Las proteínas expresadas en la *P. pastoris* mostraron glicosilación como se verificó con la herramienta Glykomod (www.ExPASy.ch; resultados nos mostrados).

Tabla 1

Designación	Nº de Acceso	Referencia	Gen	Proteína
Ananaína	S46204	Napper, A.D. y otros.; Biochem. J.; 301 (1994) 727-735	-	AN1
PreproAnanaína	ACO9829	Lee, K.L. y otros.; Biochem. J.; 327 (1997) 199-202	an2	AN2
Bromelaina de Tallo	S03964	Ritonja, A. y otros.; FEBS Lett.; 247 (1989) 419-424	-	STB1
Prepro Bromelaina de tallo	CAA08860	Robertson, C.E.a.G.P.W.; Report (1998)	stb3	STB2
Prepro Bromelaina de tallo	D38532	Muta, E. y otros.; Report (1994)	stb2	STB3
Prepro Bromelaina de tallo	-	-	stb4	STB4
Bromelaina de Fruta	D14057	Muta, E.; Report (1993)	fb1	FB1
Bromelaina de Fruta CCX	-	Mynott, T.L.; WO 00/14253	fb	FB2

Tabla 2

SEQ ID No.	Nombre	Secuencia	Descripción
9	Cysprot_c_down	CCGTAGCCGATGATGGTGAYN GCRTGRTT	Amplificación de las proteasas de cisteína de la biblioteca de ADNc de <i>A. comosus</i>
10	Cysprot_d_down	CCNGGNACRCCGTGGAGGGAC TTGGT	Amplificación de las proteasas de cisteína del ADNc
11	Cysprot_1_up	CCNGGNACRCCGTGGAGGGAC TTGGT	Amplificación de las proteasas de cisteína del ADNc
12	Cysprot_3_up	GCCACCGTGGAGTCCATCTAY AARATHAA	Amplificación de las proteasas de cisteína del ADNc
13	Cysprot_a_down	CAGCGGGTCCATGGCDATNCC RCA	Amplificación de las proteasas de cisteína del ADNc
14	Cysprot_b_down	GAACACGCCGCGCTTRTARTR YTG	Amplificación de las proteasas de cisteína del ADNc

Referencias

[0110]

- 5
1. Cregg, J.M., J.L.Cereghino, J.Shi, y D.R.Higgins. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16:23-52.
2. Cregg, J.M., T.S.Vedvick, y W.C.Raschke. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N. Y.)* 11:905-910.
- 10
3. Thompson, J.D., D.G.Higgins, y T.J.Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de expresar heterológamente la proteína de Pro-Bromelaina o un fragmento de la misma, dicho método comprendiendo los pasos de:
 - a) introducir una secuencia de ADN que codifica a la proteína de Pro-bromelaina o el mencionado fragmento de la misma como está contenida en una secuencia como se muestra en las Figuras 6a, 6b, 6c ó 6d y que carece de la secuencia que codifica el propéptido C-terminal en la *Pichia pastoris* como un huésped; y
 - 10 b) expresar dicho constructo en el huésped; en donde el fragmento cubre el sitio activo de la proteína de Bromelaina y el propéptido N-terminal; y tiene actividad de proteasa de cisteína.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el huésped es la cepa KM71 o KM71H.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde se usa pPIC9, pPICZA o pPICZAalpha como vector de expresión.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la secuencia de ADN que codifica la proteína de Pro-Bromelaina o el fragmento de la misma ha sido clonada en el vector de expresión usando los sitios de restricción *EcoRI* y *NotI*.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el vector ha sido linealizado usando un sitio de restricción *BglII*.
- 25 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la proteína de Pro-Bromelaina expresada heterológamente o el fragmento de la misma lleva adicionalmente medios que permiten la purificación.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el mencionado medio que permite la purificación es una secuencia de aminoácidos fusionada con la secuencia que codifica la proteína de Pro-Bromelaina o el fragmento de la misma.
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el mencionado medio que permite la purificación es una secuencia etiquetada con polihistidina fusionada con el término N- o C- de la secuencia que codifica la proteína de Pro-Bromelaina o el fragmento de la misma.
- 35 9. El método de preparar una composición farmacéutica, dermatológica o nutricional que comprende el paso de expresar heterológamente la Pro-Bromelaina en *Pichia pastoris* como huésped, dicha Pro-Bromelaina consistiendo del propéptido N-terminal y la proteína de bromelaina como se muestra en cualquiera de las Figuras 5a a 5d o un fragmento de la misma, en donde el fragmento cubre el sitio activo de la proteína de Bromelaina y el propéptido N-terminal, y tiene actividad de proteasa de cisteína, y en donde la proteína de Pro-Bromelaina expresada
- 40 heterológamente o el fragmento de la misma no contiene el propéptido C-terminal

Fig. 1

		305	147	170	193	199
stem Brom.	STB2 (An8CAA08860)	<u>YWIVK</u>	<u>NONPCGACWAFAAIATVESIYKIK</u>	<u>GGWEFF</u>	<u>AFEFIISNK</u>	
	STB3 (BAA22544)	<u>YWIVK</u>	<u>NONPCGACWAFAAIATVESIYKIK</u>	<u>GGWEFF</u>	<u>AFEFIISNK</u>	
	STB4	<u>YWIVK</u>	<u>NONPCGACWAFAAIATVESIYKIK</u>	<u>GGWEFF</u>	<u>AFEFIISNK</u>	
	STB1 (S03964)	-I IYP	<u>NONPCGACWAFAAIATVESIYKIK</u>	<u>GGWEFF</u>	<u>AFEFIISNK</u>	
Ananain	AN1 (CAA05487)	<u>FWIVK</u>	<u>NQGRCGSCWAFASAIATVESIYKIK</u>	<u>GGWVNE</u>	<u>AYDFIISNK</u>	
	An11CAA08861	<u>FWIVK</u>	<u>NHPCGSCWAFAAIATVESIYKIK</u>	<u>GGWVNE</u>	<u>AYDFIISNK</u>	
fruit Brom.	BAA21848	<u>YWIVK</u>	<u>DQNPCGSCWAFSAIATVEGIYKIV</u>	<u>GGEVND</u>	<u>AYDFIISNN</u>	
	BAA21929	<u>YWIVK</u>	<u>DQNPCGSCWAFSAIATVEGIYKIV</u>	<u>GGEVND</u>	<u>AYDFIISNN</u>	
	BAA22543	<u>YWIVK</u>	<u>DQNPCGSCWAFSAIATVEGIYKIV</u>	<u>GGEVND</u>	<u>AYDFIISNN</u>	
	BAA22545	<u>YWIVK</u>	<u>DQNPCGSCWAFSAIATVEGIYKIV</u>	<u>GGEVND</u>	<u>AYDFIISNN</u>	
	BAA22546	<u>YWIVK</u>	<u>NONPCGSCWAFAAIATVEGIYKIK</u>	<u>GGWVNE</u>	<u>AYDFIISNN</u>	
	BAA21849	<u>YWIVK</u>	<u>NONPCGSCWAFSAIATVEGIYKIV</u>	<u>GGWVNE</u>	<u>AYDFIISNN</u>	
	FB1	<u>YWIVK</u>	<u>NONPCGSCWAFSAIATVEGIYKIK</u>	<u>GGWVNE</u>	<u>AYDFIISNN</u>	

Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4a

Fig. 4b

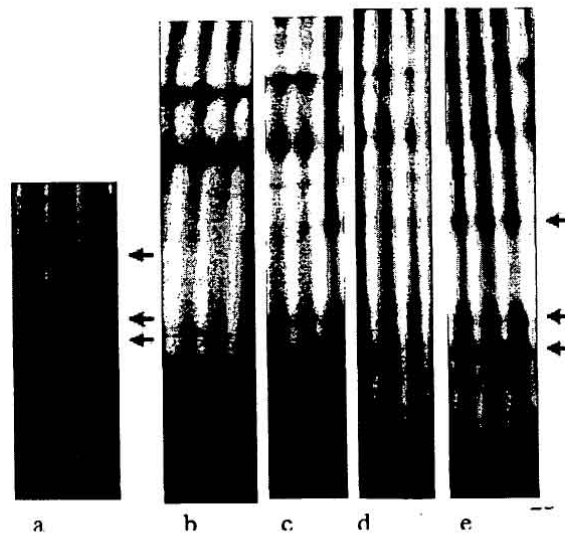


Fig. 5

Fig. 5a

MAWKVQLVFLFLCVMWASPSAASADEPSDPMMKRFEEWMVEYGRVYKDNDK
MRRFQIFKNNVNHIEFNSRNKNSYTLGINQFTDMTNNEFVAQYTGGISRPLNIEREP
VVSFDDVDISAVPQSIDWRDYGAVTSVKNQNPCGACWAFAAIATVESIYKIKKGILE
PLSEQQVLDCAKGYGCKGGWEFRAFEFIISNKGVASAAIYPYKAAKGTCKTNGVPN
SAYITGYARVPRNNESSMMYAVSKQPITVAVDANANFQYYKSGVFNGPCGTSLNHA
VTAIGYGQDSNGKKYWIVKNSWGARGWGEAGYIRMARDVSSSSGICGIAIDPLYPTLE
SGANVEAIKMOVSESRSSVCGR

Fig. 5b

MAWKVQVVFLFLFLCVMWASPSAASADEPSDPMMKRFEEWMVEYGRVYKDNDK
KMRRFQIFKNNVNHIEFNSRNENSYTLGINQFTDMTNNEFIAQYTGGISRPLNIEREP
VVSFDDVDISAVPQSIDWRDYGAVTSVKNQNPCGACWAFAAIATVESIYKIKKGILE
PLSEQQVLDCAKGYGCKGGWEFRAFEFIISNKGVASGAIYPYKAAKGTCKTNGVPN
SAYITGYARVPRNNESSMMYAVSKQPITVAVDANANFQYYKSGVFNGPCGTSLNHA
VTAIGYGQDSNGKKYWIVKNSWGARGWGEAGYIRMARDVSSSSGICGIAIDSLYPTLE
SRANVEAIKMOVSESRSSVCGRVD

Fig. 5c

MTSKVQLVFLFLFLCVMWASPSAASCDEPSDPMMKQFEEWMAEYGRVYKDNDK
MLRFQIFKNNVNHIEFNNRNGNSYTLGINQFTDMTNNEFVAQYTGLSLPLNIKREP
VVSFDDVDISSVPQSIDWRDSGAVTSVKNQGRCGSCWAFASIATVESIYKIKRGNLV
SLSEQQVLDCAVSYGCKGGWINKAYSFIISNKGVASAAIYPYKAAKGTCKTNGVPNS
AYITRYTYVQRNNERNMMYAVSNQPIAAALDASGNFQHYKRGVFTGPCGTRLNHA
IVIIGYGQDSSGKKFWIVRNSWGAGWGEGGYIRLARDVSSSFGLCGIAMDPLYPTLQ
SGPSVEVI

Fig. 5d

MASKVQLVFLFLFCAMWASPSAASRDEPNPMMKRFEWMAEYGRVYKDDDEK
MRRFQIFKNNVKHIETFNSRNENS YTLGINQFTDMTKSEFVAQYTGVS LPLNIEREPV
VSFDDVNISAVPQSIDWRDYGAVNEVKNNPCGSCWSFAAIATVEGIYKIKTG YLVS
LSEQEVLDCAVSYGCKGGWVNKAYDFIISNNGVTTEENYPYLA YQGTCSNANSFPNS
AYITGYSYVRRNDERSMMYAVSNQPIAALIDASENFQYYNGGVFSGPCGTSLNHAIT
IIGYGQDSSGTTYWIVRNSWGSSWGEGGYVRMARGVSSSSGVCGIAMAPLPTLQS
GANAIEVIKVMVSETSGRSY

Fig. 6

Fig. 6a

atggcttggaaggtcaactcgtgtttctttctgtttctctgtgtgatgtggccttcgccatcggcagcttctgctgacgaacccagtgatc
ccatgatgaagcgggttgaagaatggatggtggagtacggccgagtttacaaggacaacgatgagaagatcgccgggttcatgatt
caagaacaacgtgaaccatatcgaaacctttaacagtcgcaataaaaattcgtacactctcggcatcaatcagtttaccgatatgacaaa
taacgaatttgtgtcacaatatactggtgtatatctcgtccactaaatcgcagagagagccagtggtgtcgtttgatgacgtagacatct
ccgcggtgctc aaagtattgattggagagactacgggtccgtaacaagtgtaagaaccccccctgtggtgtgtctgggcatt
cgctgcaattgcgacggtagaatcaatctacaagatcaaaaaagggtatcttagaaccttatacggagcagcaagttctcgtatgtgctaa
aggctacgggtgcaaaggcggctgggagttcagggccttcgaatttatcatactcaacaaggcgctggcatcggcagctatctaccc
tacaagcagccaaaggcacctgcgaagaccaatggcgtgcccaattcagcttatattactggtatgcacgtgtgccgagggaacaacg
aaagcagcatgatgtacgctgtgtcgaacaaccaataactgttctgtcgtatgccaatgcaaaccttacaatattacaagagcgggtgtgt
taacgggacctgtgtgaactagctcattcacgtctgaccgctataggttacgggcaggatagcaackgawaaaaatattggatagt
aaagaactcatggggtgccagatgggggtgaggccgatacatccgtatggcaagagatgtgtcatcgtcatctggaatatgtggaatc
gccattgatcctctatccactctagaatcaggggccaatgtcgaagccattaaaatgtttctgaagtcgaagctcagtgggcgcc
cggtaa

Fig. 6b

atggcttggaagttcaagtcgtgtttctttctgtttctctgtgtgatgtggcctcgcacatcggcagcttcgtcgtacgaacccagtgatc
ccatgatgaagcggtttgaagaatggatgtgtgagtagccgagtttacaaggacaacgatgagaagatgcgcgggttcagatatt

caagaacaacgtgaaccatacgaacttttaacagtcgaacgaaaattcgtacactctcgcatcaatcagttaccgatagacaaa
 taacgaatttattgctcaatatactgggtgtatatctcggccactaaatacagagagagccagtggtgtcgtttgatgacgtagacatct
 ccgcggtgcctcaaagtattgattggagagactacgggtccgtaacaagtgcaagaacaaaaccctgtggtgcttgctgggcatt
 cgctgcaattgcgacgtagaatcaatctacaagatcaaaaagggaatcttagaacctttatcgagcagcaagttctcgattgtgctaa
 aggtacgggtgcaaggcggctgggagttcaggccctcgaattcatcatatctaacaaggcggtggcatcgggagctatctaccct
 tacaagcagccaaaggcacctgcaagaccaatggcgtgcccaattcagcttattactggttatgcacgtgctggaggaaacg
 aaagcagcatgatgtacgtgtgtcgaacaaccaataactgtgtcgtgatccaatgcaactttcaattacaagcgggtgtgtt
 taacggaccctgtggaactagtctcaatcacgccgtaccgctataggttacgggcaggatagcaacggaaaaaatattgtagta
 aagaactatgggtgccagatggggtgaggccgatacctcgatggcaagagatgtgtcatcgtcatctggaatatgtggaatcg
 ccattgattctctatccactctagaatcaaggccaatgtcgaagccattaaaaatggttctgaaagtcgaagctcagtggtcgccg
 cgtcgatcg

Fig. 6c

atgacttccaaagtcaactcgtgtttctttctgtgtgtatgtggccttcgccatcggcagcttctgtgacgaaccagtgatc
 ccatgatgaagcagttgaagaatggatggcggagtacggccgagttacaaggacaacgacgagaagatgctccggttcagatatt
 caagaacaacgtgaaccatacgaaccccttaacaatcgcaacggaaattcgtacactctcggtatcaatcaattaccgatagacaaa
 taacgaatttgttctcaatatactggtttatctctccactaaatacagagagagccagtggtgtcgtttgatgacgtagacatctcctc
 gggtcctcaaagtattgattggagagactctggtccgtaacaagtgcaagaaccaaggccgctgtggttctgtggttcattcgct
 caattgcgacgtagaatcaatctacaagatcaaaagagggaacttagtatctttatcgagcagcaagttctcgattgtgctgaagct
 acgggtgcaaggcggctggataaacaaggcctacagttcatcatatccaacaaggcggtggcatccgcagctatctacccttaca
 agcagccaaaggctacctgcaagaccaatggcgtgcccaattcagcttattactcgtatatacatgtgcagaggaaacgaacgc
 aacatgatgtacgtgtgtcgaatcaaccaatagctgtgtctcgtatgccagtggaactttcaacattacaagcgggtgtgtttacc
 ggacctgtggaactagactcaatcatccatcgtcattatagggttacgggcaggatagcagcgaaaaaattttgtagtaaggaa
 ctcatgggtgccggtgggtgagggtgatacatccgttgcaagagatgtgtcatcgtcatttgattatgtggaatgccatgg
 accctctctatccactctacaatcaggcccgatgtcgaagtatttgcggccg

Fig. 6d

atggcttccaaagtcaactcgtgtttctttctgtgtgtatgtggccttcgccatcggcagcttctgtgacgaaccatgatc
 ccatgatgaagcagttgaagaatggatggcggagtacggccgagttacaaggacgacgacgagaagatgcggcgggttcagat

tcaagaacaacgtgaagcatatcgaacctttaacagtcgcaacgaaaattcgtaactctcggtatcaatcagttaccgatagacaa
aaagcgaatttggtctcaatataccggcgtatctctcccactaaatcgcagagagagccagtggtgtcattgatgacgtaaacatctc
cgcggtgacctcaaagtattgattggagagactatggtgccgtaaacgaggtcaagaatcaaaacccctgtggttcttgctggtcattcg
ctgcaattgcgacggagggaatctacaagatcaaacagggtacttagtattatcgagcaagaagtctcgattgtgctgta
gtacgggtgcaaaggcggctgggtgaacaaggcctacgatttcatacttaaacgggtgtgaccaccgaagaaaactatccta
tctagcataccaaggcacttgcaacccaatagcttcttaattcagcttacattactggttattcatatgtgcgaaggaacgacgaacgc
agcatgatgtacgctgtgtcgaatcaaccaatagctgctctatcgatgccagtgaacacittcaatattacaatggcgggtgtttagcg
gacctgtggaactagtctcaatcatgccattaccattataggttacgggcaggatagcagtggaacaaaattggatagtaaggaaact
cgtggggcagctcatgggtgaggggtgatacgtccgtatggcaagaggtgtgtcatcgtcatctggagtatgtggaatgccatgg
ctcctctcttcccactctacaatcaggggctaataccgaagtatttaagatggtttctgaaactccggccgcagctacgt

Fig. 7

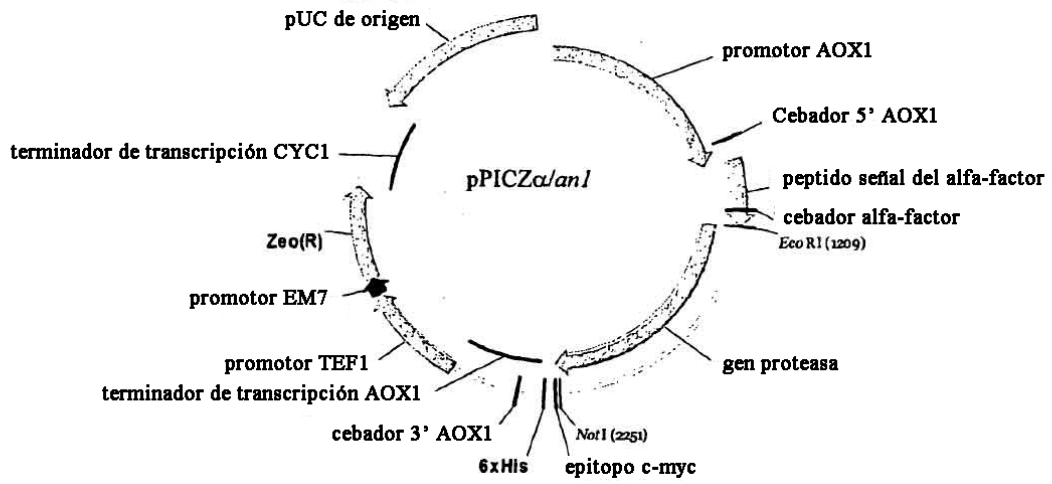


Fig. 8

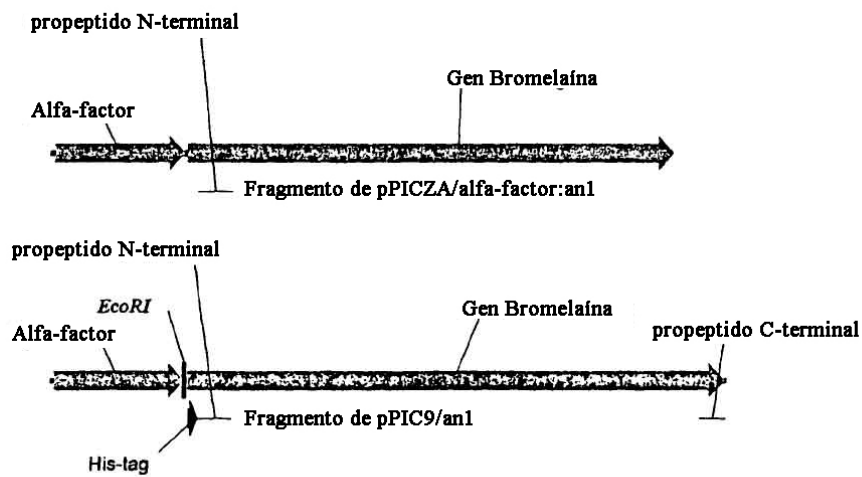


Fig. 9

351		384
	Proteasa (<i>O. sativum</i>) (301)	CGIAQMASYPV -----
	Procatepsina L (<i>H. sapiens</i>) (301)	CGIASAASYPTV -----
	Propapaina (<i>C. papaya</i>) (330)	CGLYTSSFYPVKN -----
	Procatepsina L (<i>M. musculus</i>) (322)	CGLATAASYPVVN -----
	AN1 (<i>A. comosus</i>) (322)	CGIAMDPLYPTLQSGPSVEVI -----
	STB4 (<i>A. comosus</i>) (323)	CGIAIDPLYPTLESGANVEAIKMVSESRSV
	STB3 (<i>A. comosus</i>) (323)	CGIAIDSLYPTLESANVEAIKMVSESRSV
	Bromelaina de fruta (<i>A. comosus</i>) (324)	CGIAMDPLYPTLQSGANVAVIKMVSKT ----
	FB1 (<i>A. comosus</i>) (322)	CGIAMAFLFPTLQSGANAEV IKMVSET ----
	Procisteinaproteasa (<i>V. mungo</i>) (331)	CGIAMMASYP IKNSSDNPTGSLSSPKDEL --

Fig. 10

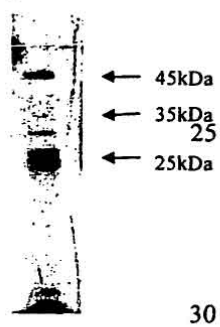


Fig. 11

