

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 215**

51 Int. Cl.:

A61P 17/00 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2009 PCT/IB2009/000089**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2009 WO09093119**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2009 E 09703640 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2244728**

54 Título: **Uso de inhibidores de serina proteasas en el tratamiento de enfermedades de la piel**

30 Prioridad:

21.01.2008 US 22386

22.01.2008 US 6576

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

03.03.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (50.0%)**

101 Rue de Tolbiac

75013 Paris, FR y

DERMADIS (50.0%)

72 Inventor/es:

DEPERTHES, DAVID;

KUNDIG, CHRISTOPH;

HOVNANIAN, ALAIN y

DERAISON, CÉLINE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 604 215 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

Uso de inhibidores de serina proteasas en el tratamiento de enfermedades de la piel

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos terapéuticos que son inhibidores de serina proteasas, a composiciones farmacéuticas de los mismos y a su uso en el tratamiento del cuerpo de seres humanos o de animales. Más específicamente, la presente invención se refiere a un inhibidor de serina proteasas para su uso en un método para el tratamiento, el diagnóstico o el pronóstico de enfermedades de la piel, que comprende la administración, a un sujeto que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de serina proteasas.

15 Antecedentes de la invención

Las proteasas o enzimas proteolíticas son esenciales en los organismos, desde las bacterias y los virus a los mamíferos. Las proteasas digieren y degradan las proteínas mediante enlaces peptídicos hidrolizantes. Las serina proteasas (EC. 3.4.21) tienen características comunes en el sitio activo, principalmente en el resto de serina activo. Hay dos tipos principales de serina proteasas; las similares a quimotripsina/tripsina/elastasa y las similares a subtilisina, que tienen una disposición espacial idéntica de His, Asp y Ser catalíticos pero en armazones de proteína muy diferentes. Sin embargo, se han identificado más de veinte familias (S1-S27) de serina proteasas que, en función de la similitud estructural y de otras pruebas funcionales, se agrupan en 6 clanes SA, SB, SC, SE, SF y SG. La familia de las serina proteasas similares a quimotripsina/tripsina elastasa se han subdividido en dos clases. La clase "grande" (de aprox. 230 restos) incluye principalmente enzimas de mamífero, tales como tripsina, quimotripsina, elastasa, calicreína y trombina. La clase "pequeña" (de aprox. 190 restos) incluye las enzimas bacterianas.

Los aminoácidos His, Asp y Ser catalíticos están flanqueados por bolsillos de unión a restos de la cadena lateral de aminoácidos sustrato, denominados S1', S2', S3', etc. en el lado C terminal o lado 'prima' del sustrato y S1, S2, S3, etc. en el lado N terminal. Esta nomenclatura es como se describe en Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding, Alan Fersht, 1999 (W. H. Freeman y Company) páginas 40-43 y Brik *et al*, Org. Biomol. Chem., 2003, 1, 5-14. Las serina proteasas similares a quimotripsina/tripsina/elastasa pueden subdividirse además por los restos presentes en el bolsillo S1 como se describe en la introducción de Protein Structure, Carl Branden y John Tooze, 1991 (Garland Publishing Inc) páginas 231-241. Las subdivisiones son similares a quimotripsina (Gly-226, Ser-189 y Gly-216 en el bolsillo S1), similar a tripsina (Gly-226, Asp-189 y Gly-216 en S1) y similar a elastasa (Val-226 y Thr-216 en S1) tomándose la numeración de los restos de la numeración convencional de la quimotripsina. Las serina proteasas similares a tripsina prefieren sustratos que sitúan la Lys o la Arg en el bolsillo S1.

Las serina proteasas tienen un mecanismo catalítico común caracterizado por un resto de Ser particularmente reactivo en la posición 195, utilizando el sistema de numeración de la quimotripsina. Como ejemplos de serina proteasas se incluyen tripsina, triptasa, quimotripsina, elastasa, trombina, plasmina, calicreína, Complemento C1, proteasa acrosómica, proteasa lisosómica, cocoonasa, proteasa α -lítica, proteasa A, proteasa B, serina carboxipeptidasa π , subtilisina, uroquinasa (uPA), Factor Vila, Factor IXa y Factor Xa. Las serina proteasas se han investigado ampliamente durante muchos años y son centro principal de investigación como una diana farmacológica debido a su función en la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos.

Los procesos en los que intervienen las serina proteasas incluyen coagulación, fibrinólisis, fertilización, desarrollo, neoplasia, modelado neuromuscular e inflamación. Se sabe bien que estos compuestos inhiben una variedad de proteasas en circulación, así como proteasas que están activadas o liberadas en los tejidos. También se sabe que los inhibidores de las serina proteasas inhiben procesos celulares críticos, tales como adhesión, migración, producción de radicales libres y apoptosis. Además, experimentos realizados en animales indican que los inhibidores de las serina proteasas, variantes o células que expresan inhibidores de serina proteasas, administrados por vía intravenosa, proporcionan protección contra el daño tisular.

Las serina proteasas calicreínas (KLK) muestran que desempeñan una función esencial en la fisiología normal de la piel. La KLK5 y 7 se aislaron y clonaron originalmente del estrato córneo (Hansson *et al.*, 1994; Brattsand y Egelrud, 1999) y se mostró que intervenían en la descamación de la piel a través del procesamiento de proteínas adhesivas extracelulares de los corneodesmosomas, es decir, la corneodesmosina (CDSN), desmogleina 1 (DSG1) y desmocolina 1 (DSC1) (Caubet *et al.*, 2004; Descargues *et al.*, 2005). Se mostró que la KLK5 escindía los tres componentes, mientras que la KLK7 solo podía digerir la CDSN y la DSC1 (Caubet *et al.*, 2004). Otros estudios de IHC confirmaron la función propuesta de la KLK7 en la descamación (Sondell *et al.*, 1995). Estudios *in vitro* demostraron un posible mecanismo de activación de la KLK7 a través de una cascada proteolítica, en la que intervenía la KLK5 y la KLK 14 (Brattsand *et al.*, 2005). Además, en el SC se han descrito varios niveles de las KLK 1, 6, 8, 10, 11 y 13 (Komatsu *et al.*, 2005, Borgono *et al.*, 2006) y se piensa que la KLK 1, 5, 6 y 14 intervienen en la descamación de la piel a través del procesamiento de la DSG1 (Borgono *et al.*, 2006). Se piensa que la KLK14

desempeña una función principal en el remodelado de la piel, ya que contribuye a aproximadamente la mitad de la actividad proteolítica total similar a la tripsina en la capa del SC (Stefansson *et al.*, 2006). Se sugiere que la KLK8 desempeña una función solapante en el procesamiento de la descamación de la piel procesando DSG1 y CDSN (Kishibe *et al.*, 2006). Se observó una función antimicrobiana adicional de las KLK en la piel a través de la regulación de péptidos de catelicidina, tanto *in vitro* como *in vivo* (Yamasaki *et al.*, 2006).

Se describen desequilibrios en la actividad proteolítica de las KLK, a través de una sobreexpresión génica o una mala regulación de la actividad en una gran cantidad de trastornos de la piel, incluyendo dermatitis irritativa crónica, síndrome de descamación de la piel, soriasis, dermatitis atópica y síndrome de Netherton (Komatsu *et al.*, 2005b; Descargues *et al.*, 2005; Hachmen *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006; Hansson *et al.*, 2002; Ekholm y Egelrud, 1999). La expresión de KLK múltiples está regulada positivamente de manera significativa en la soriasis, dermatitis atópica, síndrome de descamación de la piel de tipo B, y lesiones crónicas de dermatitis atópica (Komatsu *et al.*, 2005b; Komatsu *et al.*, 2006; Hansson *et al.*, 2002). Los pacientes con síndrome de Netherton, un trastorno de la piel recesivo autosómico, han mostrado cambios de fase y mutaciones sin sentido en el gen SPINK5 que codifica a LEKTI (Chavanas *et al.*, 2000; Komatsu *et al.*, 2002; Chavanas *et al.*, 2000; Sprecher *et al.*, 2001), que es un inhibidor de serina proteasa con actividad contra diversas KLK, incluyendo KLK5, 6, 7, 13 y 14 (Borgono *et al.*, 2006; Egelrud *et al.*, 2006; Deraison *et al.*, 2007). Dichos defectos genéticos conducen a una pérdida de dominios inhibidores (Chavanas *et al.*, 2000; Sprecher *et al.*, 2001).

También es de interés la posible intervención de las calicreínas en cuanto al aspecto de trastornos de tipo descamación con la inflamación de la piel, a través de la activación de receptores activados por proteasa (PAR, *protease activated receptors*). Los PAR 1-4 son receptores acoplados a proteína G, activados por diversas proteasas incluyendo las calicreínas. PAR2 es de especial interés, ya que se activa mediante la escisión de tripsina y se co-localiza con calicreínas tisulares en el tejido de la piel. En las lesiones de la piel de pacientes con dermatitis atópica y con síndrome de Netherton, se descubrió que los receptores PAR2 se sobreexpresaban y se co-localizaban con calicreínas de tejido humano (Descargues *et al.*, 2006). Esto condujo a la hipótesis de que dicha ruta KLK-PAR interviene en la patogénesis de estas enfermedades y que las KLK inducen inflamación en estos trastornos de la piel mediante la activación de PAR2.

Recientes trabajos de Oikonomopoulou *et al.* (2006), realizados *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que la actividad de PAR puede estar dirigida por las KLK5, 6 y 14 activas. Se observó que la KLK5 y la KLK6 activaban a PAR2, mientras que se describió que la KLK14 inactivaba a PAR1 y activaba a PAR2 y a PAR4. Otros informes mostraron activación de PAR1 o de PAR2 mediante la KLK1, 2, 4, 5, 6 y 14 en diferentes tipos de células (Mize *et al.*, 2006; Stefansson *et al.*, 2008; Vandell *et al.*, 2008).

Los receptores PAR2 son dianas de investigación atractivas para dermatólogos y cosmetólogos debido a su implicación en la inflamación de la piel, proliferación celular, supresión tumoral y pigmentación e hidratación de la piel. Como activadores de receptores PAR2, las calicreínas tienen un gran interés para los investigadores que estudian los procesos de la piel anteriormente mencionados. Los inhibidores naturales de tripsina derivados de semilla de soja no desnaturalizada se usan como ingredientes de productos cosméticos que se dirigen a la pigmentación de la piel, exposición UV e hidratación de la piel. Las semillas de soja y leche de soja derivadas de soja contienen inhibidor de tripsina de soja (STI, *soybean trypsin inhibitor*) e inhibidor de Bowman-Birk (BBI), respectivamente (Paine *et al.*, 2001). Los efectos deseados de estos productos se atribuyen a la inhibición de tripsina, lo que conduce al bloqueo de la activación de PAR2. Se ha observado que la KLK5 y la KLK7 se sobreexpresan bajo radiación UVB simultáneamente a una disminución de la expresión de LEKTI, lo que sugiere una contribución de estas calicreínas de la piel en la descamación del estrato córneo bajo estrés por UVB (Nin M *et al.*, 2008).

Se ha sugerido que el STI (inhibidor de tripsina de soja) reduce el cáncer de piel inducido por luz UV, ya que la aplicación tópica de STI detiene el avance del tumor en ratones expuestos a UVB (ultravioleta B) durante largos periodos de tiempo (Huang *et al.*, 2004). Esto sugiere que los productos que contienen extractos de soja natural bloquean la activación de PAR2 por inhibición de calicreína. Se ha demostrado que el STI inhibe la KLK5 y 14 similar a tripsina con alta eficacia (Brattsand *et al.*, 2005). Se ha descrito expresión reducida de KLK5 y K7 en el SC superior de piel seca y una elevada actividad de KLK después de radiación UV (Voegeli *et al.*, 2007).

También se ha previsto que los inhibidores de serina proteasas tienen posibles usos que son beneficiosos en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades de áreas clínicas, tales como oncología, neurología, hematología, medicina pulmonar, inmunología, inflamación y enfermedades infecciosas. Los inhibidores de serina proteasas también pueden ser beneficiosos en el tratamiento de enfermedades tromboticas, asma, enfisema, cirrosis, artritis, carcinoma, melanoma, restenosis, ateroma, traumatismo, choque y lesión por reperfusión. En Expert Opin. Ther. Patents (2002), 12(8) se encuentra una revisión útil. Los inhibidores de serina proteasas se desvelan en las solicitudes de patente publicadas de Estados Unidos US 2003/010089 y 2004/0180371 y en las patentes de Estados Unidos 6.78.182, 6.656.911, 6.656.910, 6.608.175, 6.534.495 y 6.472.393.

Las enfermedades de la piel tales como hipersensibilidad por contacto, dermatitis atópica, enfermedades de la piel genéticas poco comunes (por ejemplo, síndrome de Netherton) y soriasis, se caracterizan por reacciones

hiperproliferativas e inflamatorias de la piel. Una gran población padece estas enfermedades. Por ejemplo, la dermatitis atópica, una enfermedad crónica hereditaria de la piel, afecta a aproximadamente 8 millones de adultos y niños en los Estados Unidos. Se piensa que una combinación de factores múltiples, incluyendo factores genéticos, ambientales e inmunológicos, pueden causar enfermedades de la piel. Aunque la mayoría de las enfermedades de la piel no son letales, afectan significativamente a la calidad de vida de las personas que padecen estas enfermedades.

Las pomadas que contienen esteroides o los agentes antihistamínicos habitualmente utilizados para el tratamiento de las enfermedades de la piel frecuentemente causan efectos secundarios considerables. Por ejemplo, los esteroides de aplicación externa o bucal debilitan la capa de la piel, causan osteoporosis e inhiben el crecimiento en niños tras su uso prolongado. También se observa que, después de dejar de aplicar los esteroides, a menudo se produce una reaparición de las lesiones.

Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar agentes no esteroideos mejorados para estrategias terapéuticas, profilácticas o de diagnóstico, para el tratamiento de las enfermedades de la piel. La presente invención proporciona un método mejorado y fiable para el tratamiento, diagnóstico o profilaxis de enfermedades de la piel, que comprende la administración, a un sujeto que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de serina proteasa.

Como se pondrá de manifiesto a partir de lo expuesto anteriormente, la invención ha logrado estos y otros objetos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un inhibidor de serina proteasa como se define en las reivindicaciones para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad de la piel que comprende administrar a un mamífero una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de serina proteasa recombinante.

También se desvela el uso de un inhibidor de serina proteasa en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de la piel.

Otro objeto de la invención se refiere a un kit para el tratamiento o prevención de una enfermedad de la piel, que comprende una composición farmacéutica de un inhibidor de serina proteasa recombinante.

Otros objetos y ventajas se pondrán de manifiesto para los expertos en la materia a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada, que se lleva a cabo con referencia a los siguientes dibujos ilustrativos y a las reivindicaciones acompañantes.

- La Figura 1 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK2 MD 820
- La Figura 2 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK2 MD 62
- La Figura 3 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK2 MD 83
- La Figura 4 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK2 MD 67
- La Figura 5 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK2 MD 61
- La Figura 6 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK2 MD 518
- La Figura 7 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK2 MD CI
- La Figura 8 representa las secuencias de ADN y de proteína ACT de tipo silvestre
- La Figura 9 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 ACT-G1
- La Figura 10 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 ACT-G1G
- La Figura 11 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 ACT-C11
- La Figura 12 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 ACT-C 11G
- La Figura 13 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 ACT-E5
- La Figura 14 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 ACT-E8
- La Figura 15 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 ACT-F11
- La Figura 16 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 ACT-F3
- La Figura 17 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 ACT-G9
- La Figura 18 representa las secuencias de ADN y de proteína AAT de tipo silvestre
- La Figura 19 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 AAT -G1
- La Figura 20 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 AAT -G1G
- La Figura 21 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 AAT -C11
- La Figura 22 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 AAT -C11G
- La Figura 23 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 AAT -E5
- La Figura 24 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 AAT -E8
- La Figura 25 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 AAT -F11
- La Figura 26 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 AAT -F3
- La Figura 27 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 AAT -G9
- La Figura 28 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 AAT -G1V
- La Figura 29 representa las secuencias de ADN y de proteína del inhibidor de proteasa hK14 AAT -C11D

La Figura 30 muestra el sistema de gradiente para lesiones de la piel en el modelo de Netherton de ratón hKLLK5 transgénico.

La Figura 31 muestra el desarrollo del tamaño de la lesión de la piel en el modelo de ratón del Síndrome de Netherton. Monitorización de tamaños de las lesiones y del grado de las lesiones después 1, 15 y 28 días de aplicación tópica de Natrosol al 2 % (grupo 1, control) o de MDPK67b en Natrosol al 2 % (grupo 2).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de un inhibidor de serina proteasa en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de la piel como se define en las reivindicaciones. Los segmentos biológicamente activos de un inhibidor de serina proteasa son también útiles en la preparación de dicho medicamento.

Algunas de las serina proteasas de la superfamilia de la quimotripsina, incluyendo el t-PA, la plasmina, la u-PA y las proteasas de la cascada de la coagulación sanguínea son moléculas grandes que contienen, además del dominio catalítico de serina proteasa, otros dominios estructurales responsables en parte de la regulación de su actividad (Barrett, 1986; Gerard *et al.*, 1986; Blasi *et al.*, 1986). Entre las serina proteasas importantes se encuentran las enzimas similares a tripsina, tales como tripsina, triptasa, trombina, calicreína y factor Xa. Las dianas de serina proteasa están asociadas a procesos tales como la coagulación sanguínea; la lisis mediada por complemento, la respuesta inmunitaria, la glomerulonefritis, sensibilización al dolor, inflamación, pancreatitis, cáncer, regulación de la fertilización, infección bacteriana y maduración de virus. Al inhibir las serina proteasas que tienen una alta especificidad por una diana particular, se pueden inhibir numerosos procesos biológicos *in vivo*, que pueden tener efectos drásticos en un hospedador.

Los inhibidores de serina proteasa (serpinas) comprenden un grupo diverso de proteínas que forman una superfamilia que ya incluye más de 100 miembros, de diversos organismos tales como virus, plantas y seres humanos. Las serpinas han evolucionado durante 500 millones de años y divergen filogenéticamente en proteínas con función inhibidora y función no inhibidora (Hunt y Dayhoff, 1980). Las serpinas no inhibidoras, tales como la ovoalbúmina, carecen de actividad inhibidora de proteasa (Remold-O'Donnell, 1993). La función principal de los miembros de la familia de las serpinas parece ser una actividad de serina proteasa sobreexpresada neutralizante (Potempa *et al.*, 1994). Las serpinas desempeñan una función en el remodelado de la matriz extracelular, en la modulación de la respuesta inflamatoria y en la migración celular (Potempa *et al.*, 1994).

Los inhibidores de serina proteasa se dividen en las siguientes familias: la familia del inhibidor de tripsina pancreática bovina (Kunitz), también conocido como inhibidor de proteasa básico (Ketcham *et al.*, 1978); la familia Kazal; la familia de inhibidores de subtilisina de *Streptomyces*, la familia de serpinas; la familia de inhibidor de tripsina de soja (Kunitz); la familia de inhibidor de patata y la familia de Bowman-Birk (Laskowski *et al.*, 1980; Real *et al.*, 1986; Laskowski *et al.*, 1987). Los inhibidores de serina proteasa que pertenecen a la familia de serpinas incluyen los inhibidores de activadores de plasminógeno PAI-1, PAI-2 y PAI-3, inhibidor de esterasa C1, alfa-2-antiplasmina, contrapsina, alfa-1-antitripsina, antitrombina III, proteasa nexina I, alfa-1-antiquimotripsina, inhibidor de proteína C, cofactor II de heparina y proteína regulada por hormona del crecimiento (Carrell *et al.*, 1987; Sommer *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 1987; Stump *et al.*, 1986).

Muchos de los inhibidores de serina proteasa tienen una amplia especificidad y pueden inhibir tanto la superfamilia de proteasas de quimotripsina, incluyendo las serina proteasas de la coagulación sanguínea, como la superfamilia de la subtilisina de *Streptomyces* de las serina proteasas (Laskowski *et al.*, 1980). La inhibición de las serina proteasas por serpinas se ha revisado en Travis *et al.* (1983); Carrell *et al.* (1985) y Sprengers *et al.* (1987). Se dispone de datos cristalográficos de diversos inhibidores intactos, incluyendo miembros de las familias de inhibidores BPTI, Kazal, SSI, tripsina de soja y patata, y de una forma escindida de la serpinas alfa-1-antitripsina (Read *et al.*, 1986). A pesar de que estos inhibidores de serina proteasa son proteínas de diverso tamaño y secuencia, todos los inhibidores intactos estudiados hasta ahora tienen en común un bucle característico, denominado bucle de sitio reactivo, que se extiende desde la superficie de la molécula que contiene la secuencia de reconocimiento para el sitio activo de la serina proteasa afín (Levin *et al.*, 1983). La similitud estructural de los bucles en los diferentes inhibidores de serina proteasa es notable (Papamokos *et al.*, 1982). Se piensa que la especificidad de cada inhibidor está determinada principalmente por la identidad del aminoácido que está en la posición inmediatamente amino terminal al sitio de la posible escisión del inhibidor por la serina proteasa. Se piensa que este aminoácido, conocido como el resto de sitio Pi, forma un enlace acilo con la serina en el sitio activo de la serina proteasa (Laskowski *et al.*, 1980). Si la serpinas posee o no una función inhibidora depende en gran medida de la secuencia consenso localizada en la región bisagra del bucle de sitio reactivo cerca del extremo carboxilo de la región codificante. Fuera del bucle de sitio reactivo, los inhibidores de serina proteasa de diferentes familias no están generalmente relacionados estructuralmente, aunque la familia de inhibidores de Kazal y de subtilisina de *Streptomyces* presentan alguna similitud estructural y secuencial.

Como se usa en el presente documento, para facilitar el entendimiento de la presente se proporcionan las siguientes definiciones.

“Un”, “una” o “uno” significan “al menos un(o)”, “al menos una” o “uno(a) o más”.

El término “comprende” se usa generalmente en el sentido de incluir, es decir, permitir la presencia de una o más características o componentes.

5 Como se usa en el presente documento, los términos “proteína”, “polipéptido”, “polipeptídico(a)”, “péptido” y “peptídico” o “cadena peptídica”, se usan indistintamente en el presente documento para designar una serie de restos de aminoácido conectados entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxilo de restos adyacentes.

10 Preferentemente, el inhibidor de serina proteasa es un inhibidor de serina proteasa recombinante y se selecciona del grupo que comprende las SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 o un fragmento biológicamente activo del mismo que tiene una actividad inhibidora de serina proteasa.

15 Preferentemente, además, el inhibidor de serina proteasa recombinante se selecciona del grupo que comprende las SEQ ID NO 39 a 59 o un fragmento biológicamente activo del mismo que tiene una actividad inhibidora de serina proteasa.

20 “Resto de aminoácido” significa cualquier resto de aminoácido conocido por el experto en la materia. Esto incluye los aminoácidos de origen natural (incluyendo, por ejemplo, el uso del código de tres letras Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val) así como los aminoácidos poco frecuentes y/o sintéticos y derivados de los mismos (incluyendo, por ejemplo, Aad, Abu, Acp, Ahe, Aib, Apm, Dbu, Des, Dpm, Hyl, McLys, McVal, Nva y similares).

25 Dicho resto de aminoácido o derivado del mismo puede ser cualquier isómero, especialmente cualquier isómero quiral, por ejemplo, la isoforma L o D.

30 Por derivado de aminoácido, se entiende que es, en el presente documento, cualquier derivado de aminoácido conocido en la materia. Por ejemplo, derivados de aminoácido que incluyen restos derivables de aminoácidos naturales portadores de cadenas laterales adicionales, por ejemplo, cadenas laterales de alquilo, y/o sustituciones de heteroátomo.

35 “Fragmentos biológicamente activos” se refiere a secuencias que comparten una longitud de al menos 40 % de aminoácidos con la secuencia respectiva del sitio activo del sustrato. Estas secuencias pueden usarse siempre que presenten las mismas propiedades que las de la secuencia nativa de la que procede. Preferentemente estas secuencias comparten una longitud de más del 70 %, preferentemente de más del 80 %, en particular de más del 90 % de aminoácidos con la secuencia respectiva del sitio activo del sustrato.

40 La presente invención también incluye variantes de una secuencia de inhibidor de serina proteasa. El término “variantes” se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren hasta cierto grado de un polipéptido de secuencia nativa, es decir, secuencias de aminoácidos que varían de la secuencia nativa por sustituciones de aminoácidos conservativas, mediante lo cual uno o más aminoácidos se sustituyen por otros con las mismas características y funciones conformacionales. Las variantes de secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa. En el presente documento las sustituciones de aminoácidos conservativas se definen como cambios dentro de uno o más de los cinco grupos siguientes:

- 45
- I. Restos pequeños, alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
 - II. Restos polares, cargados positivamente: His, Arg, Lys
 - III. Restos polares, cargados negativamente y sus amidas: Asp, Asn, Glu, gln
 - 50 IV. Restos grandes, aromáticos: Phe, Tyr, Trp
 - V. Restos grandes, alifáticos, no polares: Met, Leu, He, Val, Cys.

“Administración”, como se aplica en la presente invención, se refiere a poner en contacto a un sujeto, preferentemente un ser humano, con un agente o una composición farmacéutica, terapéutica, de diagnóstico.

55 El término “calicreína”, se refiere a calicreínas glandulares o tisulares. Las calicreínas glandulares o tisulares son una subfamilia de serina proteasas, con un alto grado de especificidad por el sustrato y expresión diversa en varios tejidos y fluidos biológicos. El término “calicreína” apareció en la bibliografía por primera vez en 1930, cuando grandes cantidades de enzimas proteasas se encontraron en aislados de páncreas (el páncreas es “Kallikreas” en griego) (Kraut *et al.* 1930, Werle 1934). En la actualidad, las enzimas calicreína se dividen en dos grupos, calicreínas plasmáticas y tisulares, que difieren significativamente en su peso molecular, especificidad por sustrato, características inmunológicas, estructura génica y tipo de cinina liberada.

60

Las calicreínas comprenden una familia de 15 serina endopeptidasas homólogas, de cadena simple, secretadas de ~25-30 kDa, con ortólogos presentes en especies de al menos seis órdenes de mamífero. Estas calicreínas son hK2, hK3, Hk2, hK5, hK6, hK7, hK8, hK9, hK10, hK11, hK22, hK23, hK14 y hK15. Preferentemente, las calicreínas a inhibir se seleccionan del grupo que comprende hK2, hK5, hK7 y hK14.

65

“Enfermedad”, como se usa en el presente documento, se refiere a una afección patológica de una parte, órgano o sistema de un organismo resultante de diversas causas, tales como infección, defecto genético o estrés ambiental y que se caracteriza por un grupo de signos o síntomas identificable.

5 Se ha observado que la epidermis expresa diversas serina proteasas incluyendo las enzimas calicreína, uroquinasa, plasmina, similar a triptasa y elastasa de neutrófilo. Estas serina proteasas intervienen en actividades múltiples en la piel incluyendo proliferación celular epidérmica, diferenciación celular, homeostasis en la barrera lipídica y de la piel y remodelado tisular. Lo que es más importante, la proteólisis de los corneodesmosomas del estrato córneo (SC) por las serina proteasas junto con otras enzimas es un evento crucial antes de la defoliación de la capa más externa de la piel, denominado descamación. Adicionalmente, la actividad proteasa aumentada, incluyendo la de las enzimas calicreína, plasmina y uroquinasa, está implicadas en reacciones inflamatorias de la piel. En la TABLA XX se muestra una lista de enfermedades inflamatorias de la piel.

15 La actividad proteasa aumentada también se observó como respuesta al estrés frente a diversos estímulos, incluyendo factores ambientales como exposición a radiación ultravioleta y cambios de temperatura o como una reacción a diferentes tensioactivos.

20 Diversos calicreínas, en particular hK5, hK7 y hK14 se han implicado en la cascada proteolítica en la descamación de la piel. Este proceso proteolítico está controlado a través de un proceso complejo de inhibición y activación y su desregulación puede ocasionar trastornos graves en la piel. Las enfermedades genéticas poco frecuentes (Síndrome de Netherton, síndrome de descamación de la piel) así como las enfermedades de la piel más comunes, como dermatitis atópica o soriasis, se caracterizan por una descamación aumentada de la piel causada, al menos en parte, por una actividad aumentada de la calicreína.

25 La presente invención también se refiere al uso de una serina proteasa en la preparación de un cosmético o agente cosmeceútico para el tratamiento o mejora de una afección no deseable de la piel. Los fragmentos biológicamente activos de un inhibidor de serina proteasa son también útiles en la preparación de dicho cosmético o agente cosmeceútico.

30 En la presente invención “una afección no deseable de la piel” se refiere a un problema que afecta a la piel o al aspecto de la piel, que no siempre puede considerarse una enfermedad.

35 Como se usa en el presente documento, los “cosméticos” son composiciones que se usan para potenciar o proteger el aspecto de la piel humana. Los cosméticos incluyen cremas para el cuidado de la piel, lociones, polvos, perfumes, barras de labios, esmaltes de uñas de manos y pies, maquillaje de ojos y cara, permanentes, tintes, lacas y geles para el pelo, desodorantes, productos para bebés, aceites de baño, baños de espuma, sales de baño, mantecas y muchos otros tipos de productos.

40 Los “cosmeceúticos” son productos cosméticos que se piensa que tienen beneficios similares a los de los fármacos. Los ejemplos de productos típicamente catalogados como cosmeceúticos incluyen cremas antienvjecimiento e hidratantes. Los cosmeceúticos pueden contener principios activos propuestos tales como vitaminas, fitoquímicos, enzimas, antioxidantes y aceites esenciales.

45 Como se usa en el presente documento, “enfermedad de la piel” se refiere a afecciones que afectan a la piel. Normalmente, las enfermedades de la piel se seleccionan de la Tabla XX. Preferentemente, la invención es adecuada para el tratamiento de las enfermedades de la piel, tales como dermatitis atópica, dermatitis de contacto (alergia), dermatitis de contacto (irritante), eccema, soriasis, acné, hiperqueratosis epidérmica, acantosis, inflamación epidérmica, inflamación dérmica o prurito, rosácea, síndrome de Netherton, síndrome de descamación de la piel de tipo A y B, ictiosis hereditaria, hidradenitis supurativa y eritrodermia (dermatitis exfoliativa generalizada). Más preferentemente, la enfermedad de la piel se selecciona del grupo que comprende síndrome de Netherton, dermatitis atópica, soriasis y síndrome de descamación de la piel.

50 El síndrome de Netherton (SN) es una genodermatosis recesiva autosómica rara causada por mutaciones en SPINK5 (LEKTI) uno de los principales inhibidores de la cascada de la calicreína de la piel. Se ha observado que el aumento de la actividad de la calicreína es la causa de sus síntomas clínicos.

55 El SN, un síndrome ictiosiforme multisistémico, se caracteriza por ictiosis, eritrodermia, defectos en el tallo piloso y características atópicas. Las infecciones múltiples, debidas a una función de la barrera de la piel gravemente deteriorada, son muy comunes.

60 El SN es muy raro, pero se dispone de algunos datos sobre su frecuencia, probablemente debido en parte a la dificultad de identificar el SN. Actualmente se diagnostican menos de 10 casos por millón.

Las opciones de tratamiento son muy limitadas y no curativas. Principalmente se concentran en el control de las diversas infecciones cutáneas y en la reducción del picor y del dolor (por ejemplo, con corticosteroides).

65 Se comprobó que una excesiva actividad de calicreína (hK5, hK7, hK14) causaba síntomas de trastornos de la piel. Una actividad disminuida del inhibidor de calicreína natural (LEKTI) podría reemplazarse por inhibidores alternativos de calicreína.

Sorprendentemente, los solicitantes han mostrado, por ejemplo, en el ejemplo 4, que la aplicación de inhibidores de serina proteasa, incluyendo MD67 (SEQ ID NO 8), en un modelo de ratón (que sobreexpresa la hK5 ortotópica), disminuía considerablemente la gravedad de los síntomas, los cuales se observaron en los modelos de enfermedad de piel no tratada (por ejemplo, SN). Los síntomas se caracterizan por una descamación grave de la piel, debido a la degradación de la proteína desmosómica prematura resultante de la división de corneodesmosomas y desprendimiento del estrato córneo. Esto causa una pérdida grave de las funciones de la barrera de la piel lo que conduce a deshidratación grave, eritema y picor intenso.

La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad prurítica de origen no bien definido, que normalmente comienza en la primera infancia y se caracteriza por picor, lesiones eccematosas y piel seca y gruesa. La DA se asocia a otras enfermedades atópicas (por ejemplo, asma, reacciones alérgicas, en aproximadamente el 30 % de los pacientes) y las infecciones cutáneas son comunes.

La patofisiología de la DA no se conoce bien. Parece haber un componente genético. Se sugiere un defecto inmunitario que implica una anomalía de células TH2 y se encontró que una mala regulación de la actividad proteasa estaba implicada en la enfermedad. Se piensa que esta mala regulación causa una función defectuosa en la barrera del estrato córneo, lo que conduce a la entrada de antígenos, lo que da lugar a la producción de diversas citocinas inflamatorias. La tasa de prevalencia en los Estados Unidos es 10-12 % en niños y de 0,9 % en adultos. En otros países desarrollados la tasa de prevalencia es tan alta como del 18 % y está aumentada especialmente en países desarrollados. La enfermedad es crónica, y aunque la mayoría de los pacientes mejoran desde la infancia a la edad adulta, aún no se dispone de tratamiento curativo. Dependiendo de la gravedad de los síntomas normalmente se prescriben esteroides tópicos, antihistaminas e inmunomoduladores o antibióticos, agentes antivíricos y antifúngicos.

La soriasis es una enfermedad crónica, no contagiosa y normalmente aparece como lesiones inflamadas edematosas en la piel, pero también se produce en la mucosa bucal. También están afectadas las articulaciones (artritis) en el 10 % de los pacientes. Las erupciones están relacionadas con diversos factores sistémicos y ambientales incluyendo episodios de estrés o infecciones. Hay una predisposición genética a la soriasis, y cada vez hay más pruebas de signos de un trastorno autoinmunitario. La actividad proteasa (por ejemplo, calicreína) aumentada está implicada en una descamación excesiva típica de la piel. En los Estados Unidos, del 2 al 3 % de la población está afectada y anualmente se producen más de 200.000 nuevos casos. Aproximadamente 1,5 millones de personas con artritis psoriásica acuden al médico cada año y 400 centenares de personas mueren anualmente por causas relacionadas con la soriasis. La frecuencia de la soriasis en otros países es similar, pero depende del clima y de la herencia genética de la población. Es menos habitual en el trópico y en personas de piel oscura.

Actualmente, no hay tratamiento curativo. Dependiendo de la gravedad de los síntomas, se prescriben corticosteroides tópicos, brea de hulla, agentes queratolíticos o retinoides.

Para los fines de tratamiento, "mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, que incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, de deporte, o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, monos, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

"Tratamiento" se refiere a tratamiento tanto terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Las personas que requieren tratamiento incluyen las que ya presentan el trastorno así aquellas en las que puede impedirse el trastorno. Por tanto, el mamífero a tratar en el presente documento puede haberse diagnosticado como que tiene el trastorno o puede estar predispuesto o ser susceptible al trastorno.

El término "sujeto" se refiere a pacientes humanos o a otros mamíferos e incluye cualquier individuo que se desee examinar o tratar usando los métodos de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, se entenderá que "paciente" no implica automáticamente que los síntomas o las enfermedades estén presentes.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y a composiciones que son fisiológicamente tolerables y que no producen típicamente una reacción alérgica o no deseada similar, tal como molestias gástricas, mareo y similar, cuando se administran a un ser humano.

Como se usa en el presente documento, el término "proteasa" se refiere a una clase de enzimas que reconocen una molécula y escinden una secuencia de activación en la molécula. La proteasa puede ser una endopeptidasa que escinde enlaces peptídicos internos. Como alternativa, la proteasa puede ser una exopeptidasa que hidroliza los enlaces peptídicos desde el extremo N terminal o extremo C terminal de la molécula polipeptídica o proteica. La proteasa se pliega en una conformación para formar un sitio catalítico que recibe y escinde la secuencia de activación.

"Inhibidores" se refiere a un polipéptido, o a un compuesto químico, que inhibe específicamente la función de una calicreína o serina proteasa, preferentemente, uniéndose a dicha calicreína o serina proteasa.

"Bucle de serpina reactivo" o "Bucle de sitio reactivo" o BSR se refiere a un bucle de sitio reactivo flexible, expuesto encontrado en la serpina y que está implicado en la interacción con la supuesta proteasa diana. Desde el resto en el

lado aminoacídico del enlace escindible, y moviéndose lejos del enlace, los restos se denominan convencionalmente P1, P2, P3, etc. Los restos que siguen al enlace escindible se denominan P1', P2', P3', etc. Normalmente, el BSR está compuesto de 6 a 12 restos de aminoácidos.

- 5 Los "inhibidores de serina proteasa" o serpina de acuerdo con la invención pueden seleccionarse del grupo que comprende α -lantiquimotripsina (ACT), inhibidor de proteína C (PCI), α -lantiproteínasa (AAT), precursor de la proteína relacionada con la α -lantitripsina humana (ATR), inhibidor de α -2-plasmina (AAP), precursor de la anti-
- 10 trombina III humana (ATIII), inhibidor de proteasa 10 (PI10), precursor de la proteína 2 de unión a colágeno humano (CBP2), inhibidor de proteasa 7 (PI7), leuserpina inhibidora de proteasa 2 (HLS2), inhibidor de proteasa C1 plasmática humana (C1 INH), inhibidor de elastasa de monocito/neutrófilo(M/NEI), inhibidor de activador de plasminógeno 3 (PAI3), inhibidor de proteasa 4 (PI4), inhibidor de proteasa 5 (PI5), inhibidor de proteasa 12 (PI12), precursor endotelial del inhibidor 1 del activador de plasminógeno humano (PAI-1), inhibidor 2 activador de plasminógeno humano de placenta (PAI2), precursor del factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF) humano, inhibidor de proteasa 6 (PI6), inhibidor de proteasa 8 (PI8), inhibidor de proteasa 9 (PI9), antígeno 1 de carcinoma de
- 15 células escamosas (SCCA-1) humanas, antígeno 2 de carcinoma de células escamosas (SCCA-2) humanas, globulina de unión a T4 (TBG), Megsina, e inhibidor de proteasa 14 (PI14), fragmentos de los mismos, quimeras moleculares de los mismos, combinaciones de los mismos y/o variantes de los mismas.

20 Dado que la mayoría de estas serpinas tienen diferentes nombres, el solicitante incluye a continuación una tabla I que resumen sus especificaciones.

TABLA I

Serpina	Número de registro	Secuencia de BSR
PI o AAT, A1AT_ PRECURSOR DE ALFA-1-ANTITRIPSINA HUMANA (INHIBIDOR DE ALFA-1 PROTEASA) (ALF-1-ANTIPROTEINASA)	sp P01009	GTEAAGAMFLEAIPMSIPPE
PIL o ATR, A1AU_ PRECURSOR DE LA PROTEÍNA RELACIONADA CON LA ALFA-1-ANTITRIPSINA HUMANA	sp P20848	GTEATGAPHLEEKAWSKYQT
PLI O AAP, A2AP_ PRECURSOR DE ALFA-2-ANTIPLASMINA HUMANA (INHIBIDOR DE ALFA-2 PLASMINA) (ALFA-2-PI) (ALFA-2-AP)	sp P08697	GVEAAAATSIAMSRMSLSSF
AACT, AACT_ PRECURSOR DE ALFA-1-ANTIQUIMOTRIPSINA HUMANA (ACT)	sp P01011	GTEASAATAVKITLLSALVE
AT3, ANT3_ PRECURSOR DE ANTITROMBINA III HUMANA (ATIII)	sp P01008	GSEAAASTAVVIAGRSLNPN
P110,BOMA BOMAPINA HUMANA (INHIBIDOR DE PROTEASA 10)	sp P48595	GTEAAAGSGSEIDIRVPS
CBP2, CBP2_ PRECURSOR DE PROTEÍNA 2 DE UNIÓN A COLÁGENO HUMANO (COLIGINA 2)	sp P50454	GNPFDQDIYGREELRSPKLF
PI7 o PN1, GDN_ PRECURSOR DE NEXINA DERIVADO DE GLIA HUMANA (GDN) (PROTEASA NEXINA I) (PN-1) (INHIBIDOR DE PROTEASA 7)	sp P07093	GTKASAATTAILIARSSPPW
HCF2, HEP2_ PRECURSOR DE COFACTOR II DE HEPARINA HUMANA (HC-II) (INHIBIDOR DE PROTEASA LEUSERPINA 2) (HLS2)	sp P05546	GTQATTVTTVGFMPSTQVR
C1NH o C1IN, IC1_ PRECURSOR DE INHIBIDOR C1 DE PROTEASA PLASMÁTICA HUMANA (C1 INH)	sp P05155	GVEAAAASISVARTLLVFE
ELANH2 o PI2, ILEU_ INHIBIDOR DE ELASTASA DE LEUCOCITOS HUMANOS (LEI) (INHIBIDOR DE ELASTASA DE MONOCITO/NEUTRÓFILO (M/NEI) (EI)	sp P30740	GTEAAAATAGIATFCMLMPE
PCI o PLANH3 o PROCI, IPSP_ PRECURSOR DE INHIBIDOR DE SERINA PROTEASA PLASMÁTICA HUMANA (PCI) (INHIBIDOR DE PROTEÍNA C) (INHIBIDOR-3 DE ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO) (PAI3)	sp P05154	GTRAAAATGTIFTFRSARLN
PI4 o KST, KAIN_ PRECURSOR DE CALISTATINA HUMANA (INHIBIDOR DE CALICREÍNA) (INHIBIDOR DE PROTEASA 4)	sp P29622	GTEAAAATTFAIKFFSAQTN
PI5, MASP_ PRECURSOR DE MASPINA HUMANA (INHIBIDOR DE PROTEASA 5)	sp P36952	GGDSIEVPGARILQHKDELN

Serpina	Número de registro	Secuencia de BSR
PI12, NEUS_PRECURSOR DE NEUROSERPINA HUMANA (INHIBIDOR DE PROTEASA 12)	sp Q99574	GSEAAAVSGMIAISRMVLY
PAI1 o PLANH1, spIP05121 PAI1_PRECURSOR DEL INHIBIDOR-1 DE ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO (PAI-1) HUMANO	sp P05121	GTVASSSTAVIVSARMAPEE
PAI2 o PLANH2, PAI2_INHIBIDOR-2 ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO HUMANO, PLACENTA (PAI2) (SERPINA ARG DE MONOCITOS)	SP P05120	GTEAAAAGTGGVMTGRTGHGG
(INHIBIDOR DE UROQUINASA)		
PEDF, PRECURSOR DEL FACTOR DERIVADO DE EPITELIO PIGMENTARIO (PEDF) HUMANO (EPC-1)	sp P36955	GAGTTPSPGLQPAHLTFPLD
PI6 o PTI, PTI6_INHIBIDOR DE TROMBINA DE PLACENTA HUMANA (ANTIPROTEINASA CITOPASMÁTICA) (CAP) (INHIBIDOR DE PROTEASA 6)	sp P35237	GTEAAAATAAIMMMRCARFV
P18, PTI8_ANTIPROTEINASA 2 CITOPASMÁTICA (CAP2) HUMANA (CAP-2) (INHIBIDOR DE PROTEASA 8)	sp P50452	GTEAAAATAVVRNSRCSRME
P19, PTI9_ANTIPROTEINASA 3 CITOPASMÁTICA (CAP3) HUMANA (CAP-3) (INHIBIDOR DE PROTEASA 9)	sp P50453	GTEAAAASSCFVVAECCMES
SCCA1, SCC 1_ANTÍGENO 1 DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (SCCA-1) HUMANAS (PROTEÍNA T4-A)	sp P29508	GAEAAAATAVVGFGSSPAST
SCCA2, SCC2_ANTÍGENO 2 DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (SCCA-2) HUMANAS (LEUPINA)	sp P48594	GVEAAAATAVVVVVELSSPST
TBG, THBG_PRECURSOR DE GLOBULINA DE UNIÓN A TIROXINA HUMANA (GLOBULINA DE UNIÓN A T4)	sp P05543	GTEAAAVPEVELSDQPENTF
MEGSINA	gi 4505149 ref N P_003775.1	GTEATAATGSN IVEKQLPQS
P114, pancpina, TSA2004	gi 3724282 dbj B AA33766.1	GSEAAATSTGIHIPVIMSLAQ

Ventajosamente, el inhibidor de serina proteasa descrito en la invención es una enzima serina proteasa similar a tripsina y, preferentemente, un inhibidor de caliceína. Los inhibidores de caliceína se seleccionan entre los inhibidores hK2, hK3, hK4, hK5, hK6, hK7, hK8, hK9 55 hK10, hK11, hK12, hK13, K14 o K15. Los inhibidores de caliceína preferidos se seleccionan entre los inhibidores hK2, hK5, hK7 y K14.

En caso de que el inhibidor de caliceína sea un inhibidor dirigido contra hK2, dicho inhibidor puede seleccionarse entre los desvelados en la Solicitud de Patente Internacional PCT / IB2004/001040. Preferentemente, el inhibidor de caliceína puede seleccionarse del grupo que comprende M0820, M062, M061, M067 y MDC1. Más preferentemente este inhibidor es MD67. La presente solicitud desvela una proteína inhibidora recombinante de una proteasa que comprende una secuencia polipeptídica inhibidora y al menos una secuencia polipeptídica de un sitio de interacción enzima-sustrato específico para una proteasa, así como un método para producir la proteína inhibidora recombinante de una proteasa. Preferentemente el inhibidor de serina proteasa recombinante se selecciona del grupo que comprende la SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 o un fragmento biológicamente activo de las mismas que tiene una actividad inhibidora de serina proteasa.

Como un ejemplo de inhibidor de serina proteasa desvelado en la invención, los solicitantes han descubierto sorprendentemente 7 nuevas proteínas inhibidoras recombinantes específicas para la proteasa hK2 como se resumen en la siguiente tabla II, estos inhibidores son:

20

Inhibidores recombinantes	Otro nombre	SEQ ID NO (proteína)
rACT _{8.20}	MD820	2
rACT _{8.2}	MD62	4
rACT _{8.3}	MD83	6
rACT _{6.7}	MD67	8
rACT _{6.1}	MD61	10
ACT _{5.18}	MD518	12

ACT_{PCI}

MDCI

14

Estas proteínas inhibitoras se han obtenido modificando el BSR de la α -1-antiquimotripsina (rACT), que se sabe que inhibe un gran panel de enzimas humanas tales como quimotripsina, quimasa de mastocitos, catepsina G, calicreínas prostáticas hK2 y PSA (hK3), para cambiar la especificidad de esta serpina. Las secuencias peptídicas, seleccionadas como sustratos para la enzima hK2 mediante tecnología de presentación en fagos, como se explica en la Solicitud de Patente Internacional PCT/IB2004/001040, se han usado para reemplazar el enlace escindible y los restos de aminoácidos adyacentes al BSR. Normalmente, los inhibidores recombinantes se produjeron en bacterias y se purificaron mediante cromatografía de afinidad.

Adicionalmente, los solicitantes también han descubierto que el reemplazo de los restos localizados en P3-P3' en la estructura del BSR de rACT_{TS}, por un sustrato pentapeptídico que codifica el BSR del inhibidor de Proteína C (PCI), conduce a la producción de un inhibidor recombinante (MDCI) que es estable para inhibir las calicreínas hK2 y hK3.

En caso de que el inhibidor de calicreína sea un inhibidor dirigido contra hK14, entonces dicho inhibidor puede seleccionarse entre los desvelados en la Solicitud de Patente Internacional PCT/IB2005/000504. Preferentemente, dicho inhibidor recombinante puede seleccionarse del grupo que comprende AAT_{G1}, AAT_{G1G}, AAT_{C11}, AAT_{C11G}, AAT_{E5}, AAT_{E8}, AAT_{F11}, AAT_{F3}, AAT_{G9}, ACT_{G1}, ACT_{G1G}, ACT_{C11}, ACT_{C11G}, ACT_{E5}, ACT_{E8}, ACT_{F11}, ACT_{F3}, ACT_{G9}, ACT_{GIV}, ACT_{TS} y ACT_{C11D}. Preferentemente, dicha proteína inhibitora de una proteasa hK14 es AAT_{G1}, AAT_{GLG}, AAT_{C11}, AAT_{C11G}, AAT_{E5}, AAT_{E8}, AAT_{F3}, AAT_{G9}, ACT_{G1G}, ACT_{C11}, ACT_{C11G}, ACT_{E5}, ACT_{E8}, AGT_{F11}, ACT_{F3}, ACT_{G9}, ACT_{GIV}, o ACT_{C11D}.

La presente solicitud desvela una proteína inhibitora recombinante de una proteasa hK14 que tiene una secuencia polipeptídica inhibitora y al menos una secuencia polipeptídica de un sitio de interacción entre sustrato-enzima específico para dicha proteasa hK14. Preferentemente, dicha proteína inhibitora recombinante de una proteasa hK14 tiene, en condiciones fisiológicas,

- i) una estequiometría de inhibición (EI) igual o inferior a 11,7 después de al menos 4 horas de incubación,
- ii) una velocidad de asociación (Ka) de al menos $7'500 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,
- iii) una actividad inhibitora de 100 % después de al menos 30 minutos de incubación.

Además de la secuencia polipeptídica inhibitora del inhibidor proteasa también puede seleccionarse una cisteína proteasa ya que ahora se conocen diversos casos bien documentados de inhibición de cisteína proteasas por serpinas (Gettins P.G.W., 2002 "Serpín structure, mechanism, and function" en Chem. Rev, 102, 4751-4803). Estos ejemplos incluyen la inhibición de catepsinas K, L y S por el antígeno 1 de carcinoma de células escamosas de serpina, la inhibición de la prohormona tiol proteinasa mediante la α -1-antiquimotripsina, y la inhibición de miembros de la familia de cascada, incluyendo la caspasa 1 (enzima convertidora 1β interleuquina), caspasa 3 y caspasa 8 mediante la serpina crmA vírica y las caspasas 1, 4 y 8 mediante la serpina humana P19.

Normalmente, el inhibidor de serina proteasa es una proteína inhibitora recombinante. Por tanto, cuando se emplean técnicas recombinantes para preparar un inhibidor de serina proteasa, se usan preferentemente moléculas de ácido nucleico o sus fragmentos que codifican los polipéptidos.

Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a una secuencia de ADN purificada y aislada que codifica el inhibidor de serina proteasa como se ha descrito anteriormente.

"Una secuencia de ADN purificada y aislada" se refiere al estado en el que la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína inhibitora recombinante de una proteasa de la invención, o será el ácido nucleico que codifica dicha proteína inhibitora recombinante de una proteasa, de acuerdo con la presente invención. El ácido nucleico carecerá o carecerá sustancialmente de material con el que está normalmente asociado en la naturaleza tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentra en su entorno natural, o en el entorno en el que se prepara (por ejemplo, cultivo celular) cuando dicha preparación es por tecnología de ADN recombinante llevada a cabo *in vitro* o *in vitro*.

El ADN que puede usarse en el presente documento es cualquier secuencia polidesoxinucleotídica, incluyendo, por ejemplo, ADN bicatenario, ADN monocatenario, ADN bicatenario en el que una cadena, o las dos, están compuestas por dos fragmentos o más, ADN bicatenario en el que una cadena, o las dos, tienen una estructura fosfodiéster ininterrumpida, ADN que contiene una o más partes monocatenarias y una o más partes bicatenarias, ADN bicatenario en el que las cadenas de ADN son totalmente complementarias, ADN bicatenario en el que las cadenas de ADN son solo parcialmente complementarias, ADN circular, ADN covalentemente cerrado, ADN lineal, ADN covalentemente reticulado, ADNc, ADN sintetizado químicamente, ADN semisintético, ADN biosintético, ADN aislado de manera natural, ADN digerido con enzimas, ADN sometido a cizalla, ADN marcado, tal como ADN radiomarcado y ADN marcado con fluorocromos, ADN que contiene una o más especies de ácido nucleico de origen no natural.

Las secuencias de ADN que codifican el inhibidor de serina proteasa, o un fragmento biológicamente activo del mismo, que tienen una actividad inhibitora de serina proteasa, pueden sintetizarse mediante técnicas químicas

convencionales, por ejemplo, el método de fosfotriéster o mediante métodos de síntesis automatizados y métodos de PCR.

5 La secuencia de ADN purificada y aislada que codifica al inhibidor de serina proteasa también puede producirse mediante técnicas enzimáticas. Por tanto, las enzimas de restricción, que escinden moléculas de ácido nucleico en secuencias de reconocimiento previamente definidas pueden usarse para aislar secuencias de ADN de moléculas de ácido nucleico más grandes que contienen la secuencia de ácido nucleico, tal como ADN (o ARN) que codifica la proteína inhibidora recombinante o un fragmento de la misma.

10 También se desvela un ácido nucleico en forma de polirribonucleótido (ARN), incluyendo, por ejemplo, ARN monocatenario, ARN bicatenario, ARN bicatenario en el que una cadena, o las dos, están compuestas de dos o fragmentos, ARN bicatenario en el que una cadena, o las dos, tienen una estructura fosfodiéster ininterrumpida, ARN que contiene una o más partes monocatenarias y una o más partes bicatenarias, ARN bicatenario en el que las cadenas de ARN son totalmente complementarias, ARN bicatenario en el que las cadenas de ARN son solo parcialmente complementarias, ARN reticulado covalentemente, ARN digerido con enzimas, ARN sometido a cizalla, ARNm, ARN sintetizado químicamente, ARN semisintético, ARN biosintético, ARN aislado de manera natural, ARN marcado, tal como ARN radiomarcado y ARN marcado con fluorocromos, ARN que contiene una o más especies de ácido nucleico de origen no natural.

20 La secuencia de ADN purificada y aislada que codifica un inhibidor de serina proteasa se selecciona preferentemente del grupo que comprende SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 16 a SEQ ID NO 37.

25 La presente divulgación también describe variantes de las secuencias anteriormente mencionadas, es decir secuencias de nucleótidos que varían de la secuencia de referencia por sustituciones de nucleótidos conservativas, mediante las cuales uno o más nucleótidos se sustituyen por otros con las mismas características.

30 En la presente divulgación también se incluye el uso de una secuencia de ADN purificada y aislada que codifica un inhibidor de serina proteasa, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de la piel.

Como alternativa, los inhibidores de calicreína o inhibidores de serina proteasa de la divulgación comprenden un marcador detectable o se unen a un marcador detectable para formar un complejo detectable.

35 Los "marcadores detectables" son moléculas detectables o residuos de detección para fines diagnósticos, tales como enzimas o péptidos que tienen una propiedad de unión particular, por ejemplo, estreptavidina o peroxidasa de rábano picante. El residuo de detección puede incluir adicionalmente residuos químicos tales como biotina que pueden detectarse uniéndose a un residuo detectable afín específico, por ejemplo, avidina marcada.

40 Preferentemente, los marcadores detectables incluyen marcadores fluorescentes y marcadores usados convencionalmente en la técnica para formación de imágenes MRI-CT. Se conocen diversos materiales fluorescentes y pueden utilizarse como marcadores. Estos incluyen, por ejemplo, la fluoresceína, rodamina, auramina, Rojo Texas, azul AMCA y Amarillo Lucifer.

45 Los inhibidores de calicreína o los inhibidores de serina proteasa descritos en la invención pueden llevar un marcador radioactivo como residuo de detección, tales como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{99}Tc y ^{186}Re . Cuando se usan marcadores reactivos, pueden utilizarse procedimientos de recuento actualmente disponibles para identificar y cuantificar los miembros de unión específicos.

50 En el caso en el que el marcador sea una enzima, la detección puede realizarse mediante cualquiera de las técnicas actualmente utilizadas de colorimetría, espectrofotometría, fluoroespectrofotometría, amperométricas o gasométricas conocidas en la materia.

55 Los marcadores radioactivos son útiles en técnicas de diagnóstico *in vitro*, en técnicas de formación de radioimágenes *ex vivo* e *in vivo*. En un aspecto adicional, los marcadores radioactivos son útiles en técnicas de cirugía radioinmunoguiada, en las que pueden identificar e indicar la presencia y/o localización de células cancerosas, células precancerosas, células tumorales y células hiperproliferativas antes, durante o después de cirugía para extirpar dichas células.

60 En el caso de la formación de imágenes *in vivo*, los marcadores pueden conjugarse con un agente formador de imágenes en lugar de con uno o más radioisótopos, incluyendo, pero sin limitación, un agente que potencia la formación de imágenes de resonancia magnética. Los ejemplos de grupos quelantes incluyen EDTA, porfirinas, éteres corona de poliaminas y polioximas.

65 Como ejemplos de iones paramagnéticos se incluyen gadolinio, hierro, manganeso, renio, europio, lantano, holmio y erbio.

La presente divulgación también se dirige a composiciones farmacéuticas que comprenden el inhibidor de serina proteasa como se describe en el presente documento, como un agente activo, opcionalmente en combinación con uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables.

5 Preferentemente la composición, como una composición farmacéutica de acuerdo con la divulgación, se administra a un paciente que necesita el tratamiento mediante cualquier vía adecuada, normalmente por inyección en la corriente sanguínea o en el líquido cefalorraquídeo (CSF, *cerebrospinal fluid*), o directamente en el sitio de la enfermedad, o cerca de este sitio. La dosis exacta dependerá de diversos factores, incluyendo si la composición es para el diagnóstico, el pronóstico, la profilaxis de o para el tratamiento, el tamaño y la localización de, por ejemplo, descamación, de la naturaleza exacta de la composición y de la naturaleza del marcador detectable o funcional
10 unido al inhibidor de calicreína o al inhibidor de serina proteasa.

La presente composición farmacéutica comprende, como sustancia activa, una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición como la que se describe, opcionalmente en combinación con transportadores diluyentes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
15

Una "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a un material o compuesto químico que, cuando se administra a un ser humano o a un organismo animal, induce un efecto farmacológico y/o fisiológico detectable.

20 La cantidad farmacéuticamente eficaz de una unidad de dosificación del polipéptido normalmente está en el intervalo de 0,001 ng a 100 µg por kg de peso corporal del paciente que va a tratarse.

La composición farmacéutica puede contener uno o más transportadores, diluyentes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
25

Los transportadores, diluyentes y adyuvantes aceptables que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en la preparación, que pueden usarse desde el punto de vista farmacéutico, no son tóxicos para los receptores y las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como tampón fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menor de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polinivilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa, hidroxietilcelulosa (Natrosol®) o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de proteína y Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).
30
35

40 La forma de administración de la composición farmacéutica puede ser sistémica o tópica. Por ejemplo, la administración de dicha composición puede ser mediante diversas vías parenterales tales como la vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, bucal o mediante un dispositivo implantable y también puede suministrarse por medios peristálticos.

45 La composición farmacéutica, como se describe en el presente documento, también puede incorporarse o impregnarse en una matriz bioabsorbible, administrándose la matriz en forma de una suspensión de matriz, de un gel o de un soporte sólido. Además, la matriz puede comprender un biopolímero tal como Natrosol®.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Como ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida, se incluyen matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrófobos, que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos con diseño, por ejemplo, películas o microcápsulas. Como ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol vinílico), polilactidas (Patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y [gamma] etil-L-glutamato, etilenvinil acetato no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tal como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidrobutírico.
50
55

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.
60

Se entiende que la dosificación adecuada de la presente composición dependerá de la edad, del género, de la salud y peso del receptor, del tipo de tratamiento simultáneo, si lo hubiera, y de la naturaleza del efecto deseado.

65 La forma de dosificación apropiada dependerá de la enfermedad, del inhibidor y del modo de administración; como posibilidades se incluyen comprimidos, cápsulas, pastillas para chupar, pastas dentales, supositorios, inhalantes, soluciones, pomadas y depósitos parenterales.

5 Dado que en la presente divulgación también se incluyen modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, del inhibidor), estas pueden ser útiles para la unión en cruzado del inhibidor con una matriz insoluble en agua o con los otros transportadores macromoleculares, o para mejorar la solubilidad, adsorción y permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica. Dichas modificaciones son muy conocidas en la técnica y como alternativa pueden eliminar o atenuar cualquier posible efecto secundario no deseable del péptido y similar.

10 Otra materia objeto de la presente divulgación es proporcionar un kit para el diagnóstico, pronóstico, profilaxis o tratamiento de enfermedades de la piel en un mamífero, comprendiendo dicho kit una serina proteasa recombinante, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones para su uso.

15 El kit de la presente divulgación puede comprender adicionalmente una forma de dosificación farmacéutica individual que comprenda otras composiciones farmacéuticas y sus combinaciones.

20 Generalmente, el kit comprende un envase y una etiqueta o prospecto en o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los envases pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es eficaz para el tratamiento de la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o vial que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para el tratamiento de la afección de elección, tal como cáncer.

25 Como alternativa, o de manera adicional, el kit puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Adicionalmente puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

30 La presente invención también desvela el uso de la composición como una herramienta farmacológica en el desarrollo y estandarización de sistemas de ensayo *in vitro* o *in vivo* para el diagnóstico, pronóstico, profilaxis o tratamiento de enfermedades de la piel en mamíferos.

35 En la presente divulgación también se incluye un ensayo de detección para el diagnóstico, pronóstico, profilaxis o tratamiento de enfermedades de la piel en una muestra de tejido, que comprende poner en contacto la muestra de tejido con la composición, determinar y medir la cantidad de marcador detectado y correlacionar esta cantidad con la presencia o ausencia de una enfermedad en dicha muestra de tejido.

40 Otro objeto más de la presente divulgación es proporcionar un método para producir la muerte de una célula de la piel que exprese moléculas de calicreína, que comprende poner en contacto la célula con la composición para producir la muerte de la célula, destruirla o impedir la supervivencia de las células que expresan las moléculas de calicreína.

45 Es también un objeto de la presente divulgación, proporcionar un método para inhibir células de la piel que expresen serina proteasa y, en particular, moléculas de calicreína, que comprende poner en contacto dicha célula de la piel con la composición.

50 Otro objeto más de la presente divulgación es proporcionar una composición cosmética que comprenda un inhibidor de serina proteasa, o un fragmento biológicamente activo del mismo, que tenga una actividad inhibidora de serina proteasa como se describe en el presente documento, así como el uso de esta composición para la mejora de una afección no deseable de la piel.

55 Preferentemente, el inhibidor de serina proteasa es una proteína inhibidora recombinante.

Normalmente, la serina proteasa se selecciona del grupo que comprende las enzimas calicreína, plasmina, quimotripsina (Chtr), uroquinasa (uPA), triptasa y elastasa de neutrófilo (HNE) y/o combinaciones de las mismas.

60 Preferentemente, la calicreína se selecciona del grupo que comprende hK2, hK5, hK7 y hK14 y/o una combinación de las mismas.

65 La invención también describe el uso de un inhibidor de serina proteasa, o un fragmento biológicamente activo del mismo, que tiene una actividad inhibidora de serina proteasa, en la preparación de una composición cosmética para la mejora de una afección no deseable de la piel.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible a variaciones y modificaciones distintas de las específicamente descritas. Ha de entenderse que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones sin alejarse de sus características esenciales. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos referidos o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones o cualquiera de dos o más de dichas etapas o

características. Por lo tanto, la presente divulgación debe considerarse, en todos los aspectos, como ilustrativa y no limitativa, del alcance de la invención que se indica en las reivindicaciones adjuntas y todos los cambios se incluyen dentro del significado e intervalo de equivalencia que pretende incluirse en el presente documento.

- 5 La siguiente descripción se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, dichos ejemplos ilustran métodos para llevar a cabo la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1:

- 10 Desarrollo de inhibidores de ACT recombinantes, específicos para la hK2 humana usando sustratos seleccionados por presentación en fagos

Material

- 15 hK2 y hK3 (PSA) se purificaron de semen humano como se describe previamente (Frenette G, Gervais Y, Tremblay RR, Dube JY. 1998 "Contamination of purified prostate-specific antigen preparations by kallikrein hK2" J Urol 159, 1375-8), los anticuerpos monoclonales anti-PSA y anti-hK2 eran un obsequio del Profesor RR Temblay, Universidad de Laval. Canadá. La quimotripsina humana (Chtr), el activador de plasminógeno uroquinasa (uPA), la calicreína hK1 humana, la calicreína plasmática (PK) humana, la elastasa de neutrófilo humano (HNE) y la ACT (α 1-antiquimotripsina plasmática humana) comercial, se adquieren en Calbiochem. Z-Phe-Arg-AMC, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, Z-Gly-Gly-Arg-AMC, MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC se adquirieron en Calbiochem. El sustrato fluorescente CFP-TFRSA-YFP se desarrolló como se ha descrito previamente (Mahajan NP *et al.* 1999 "Novel mutant green fluorescent protein protease substrates reveal the activation of specific 5 caspases during apoptosis" Chem Biol 6, 401-9). El ADNc para la α 1-antiquimotripsina (ACT) humana fue un generoso obsequio del Dr. Harvey Rubin (Universidad de Pensilvania).
- 20
- 25

Mutagénesis dirigida a sitio

- 30 Después de la subclonación del ADNc de ACT en el vector de expresión pQE-9 (Qiagen, Alemania) y de la introducción de una etiqueta de His₆ en el N terminal de rACT_{TS}, se incorporaron dos sitios de restricción *Sac II* y *MluI*, aguas abajo de 18 pb y aguas arriba de 18 pb del codón P1 en el dominio BSR respectivamente. Estos sitios se crearon mediante mutación silenciosa usando los oligonucleótidos 5'-GTGATTTTACCGCGGTGGCAGCAG-3' para el sitio *Sac II* y 5'-GCACAATGGTACGCGTC TCCACTAATG-3' para el sitio *MluI* y siguiendo el protocolo de mutagénesis quickchange proporcionado por Stratagene.
- 35

Construcción de la biblioteca de presentación en fagos para sustrato

- 40 Se generaron fagotecas de sustrato usando un fagémido pH0508b modificado (Lowman *et al.* 1991 "Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display" Biochemistry 12, 10832-8). La construcción consistía en una etiqueta de His₆ en cualquier extremo de una región rica en repeticiones de Gly-Gly-Gly-Ser que precede al dominio carboxilo terminal (codones 249-406) del gen III M13. Se generaron pentámeros al azar mediante extensión por PCR de los oligonucleótidos en molde con sitios de restricción apropiados colocados a ambos lados de los codones degenerados:

- 45 5'TGAGCTAGTCTAGATAGGTGGCGGTNNSNNSNNSNNSGGGTTCGACGTCGGTCA TAGCAGTCGCT-GCA-3' (donde N es cualquier nucleótido y S es G o C) usando

Cebadores biotinilados 5' correspondientes a las regiones flanqueantes:

- 50 5'TGAGCTAGTCTAGATAGGTG-3' (SEQ ID NO 83) y 5'-TGCAGCGACTGCTATGA-3' (SEQ ID NO 84).

- Los moldes de PCR se digirieron y su purificaron como se ha descrito anteriormente (Smith G.P, Scott J.K. 1993 "Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage" Methods Enzymol. 217, 228-57), se insertaron en el vector pH0508b digerido con XbaI/Sall, y se sometió a electroporación en XL1-Blue (F⁻). El grado de la biblioteca se estimó a partir de la eficiencia de transformación determinada sembrando una pequeña parte de las células transformadas en placas Luria-Bertani que contenían ampicilina y tetraciclina (100 y 15 μ g.ml⁻¹, respectivamente). El resto de las células transformadas se usó para preparar una fagoteca incubando durante una noche añadiendo un fago auxiliar M13K07 a una concentración dando una multiplicidad de infección de 100 unidades formadoras de placa (u.f.p.) por ml. Los fagos se recogieron del sobrenadante y se purificaron con poli(etilenglicol). De estos, 200 clones se seleccionaron arbitrariamente para su secuenciación, para verificar la aleatorización de la biblioteca.
- 55
- 60

Exploración de la biblioteca pentapeptídica presentada en fagos

- 65 Esta nueva biblioteca pentapeptídica se sometió a ocho rondas de exploración con hK2. Se lavaron cien microlitros de Ni²⁺-ácido nitrilotriacético acoplado a perlas de sefarosa (resina de Ni²⁺ - ácido nitrilotriacético) con 10 ml de

NaCl/Pi que contenía BSA 1 mg.ml⁻¹. A la resina de Ni²⁺ - ácido nitrilotriacético equilibrada, se añadieron partículas de fago (10¹¹) y se permitió la unión con agitación suave durante 3 h a 4 °C. Posteriormente, la resina se lavó (NaCl/P/BSA 1 mg.ml⁻¹, imidazol 5 mM, Tween 20 al 0,1 %) para retirar los fagos no unidos y después se equilibró en NaCl/Pi. El fago sustrato se expuso a 27 nM (concentración final) de hK2 durante 45 min a 37 °C. También se realizó una selección de control sin proteasa. Los fagos escindidos liberados en el sobrenadante se amplificaron usando la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli* y después se usaron para rondas de selección posteriores. Después de ocho rondas de selección, se seleccionaron aproximadamente 15 clones individuales de la quinta, sexta y octava ronda de selección y el ADN plasmídico se aisló y se secuenció en la región codificante del sustrato.

10 Construcción y expresión de ACT de tipo silvestre recombinante y sus variantes

Se generaron seis variantes, que correspondían a un cambio en el bucle de sitio reactivo en las posiciones entre P3 y P3' (véase la Tabla III más adelante), mediante extensión por PCR de los oligonucleótidos molde:

- 15 rACT_{8.20}, 5'-TACCGCGGTCAAATCACCCTCCGTTCTCGAGCAGTGGG GACGCGT GA-3' (SEQ ID NO 61);
 rACT_{6.3}, 5'-TACCGCGGTCAAATCACCAGGAGGTCTATCGATGT GGAGACGCGTGA-3' (SEQ ID NO 62);
 rACT_{8.3}, 5'-TACCGCGGTCAAATCAGGGGGAGATCTGAGTTAGTG GAGACGCGTGA-3' (SEQ ID NO 63);
 rACT_{6.7}, 5'-TACCGCGGTCAAATCAAGCTTAGAACAACATTAG TGGAGACCGCTGA-3' (SEQ ID NO 64);
 rACT_{6.1}, 5'-TACCGCGGTCAAATCATGACAAGATCTAACTTAGT GGAGACGCGTGA-3' (SEQ ID NO 65);
 20 rACT_{5.18}, 5'-TACCGCGGTCAAATCACCGAGCGTGTCTCGCCCGTG GAGACGCGTGA-3' (SEQ ID NO 86)

(en donde las secuencias subrayadas codifican nuevos sitios de escisión en el bucle de sitio reactivo), usando cebadores correspondientes a las regiones flanqueantes 5'-TACCGCGGTCAAATC-3' (SEQ ID NO 67) y 5'-TCACGCGTGTCCAC-3' (SEQ ID NO 68). Los productos de la PCR se digirieron con las enzimas de restricción *Sac II* y *Mlu I* y después se subclonaron en la construcción rACT_{TS} digerida. Se produjeron serpinas recombinantes en la cepa TG1 de *E. coli*. Las células crecieron a 37 °C en medio 2 x TY (triptona 16 g, extracto de levadura 10 g, NaCl 5 g por l) que contenía ampicilina 100 µg/ml a una A₆₀₀ = 0,5. Después, se añadió isopropilto-β-galactósido (IPTG) a una concentración final de 0,5 mM lo que permitió la expresión de serpinas recombinantes durante 16 h a 16 °C. Las células de 100 ml de cultivo se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en PBS frío y después se pasaron a través de una prensa francesa para recoger las proteínas citoplasmáticas solubles totales. Los desechos celulares se retiraron por centrifugación y se añadieron perlas de agarosa de afinidad de Ni²⁺ - ácido nitrilotriacético al sobrenadante durante 90 min a 4 °C para unir las serpinas recombinantes. Posteriormente, la resina se lavó con Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, Imidazol 25 mM y las proteínas unidas se eluyeron durante 10 min con Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM e Imidazol 150 mM. Una vez finalizada la purificación, la rACT se dializó frente a Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, Tritón X-100 0,05% durante 16 h a 4 °C. La concentración de las proteínas se determinó para purificación mediante ensayo Bradford y se normalizó por densitometría de geles SDS-PAGE teñidos con Azul de Coomassie (Laemmli UJ. 1970 "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T42 Nature 227, 680-5).

40 TABLA III
 Alineamiento del BSR (Bucle de Serpina Reactivo) de la serpina α1-antiquimotripsina (ACT) recombinante y sus variantes

Serpina	Péptido Sustrato Seleccionado ^a	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5	P'6
rACT _{TS}		V	K	I	T	L	L*	S	A	L	V	E	T
rACT _{8.20}	LR↓SRA	V	K	I	T	L	R*	S	R	A	V	E	T
rACT _{6.2}	RR↓SID	V	K	I	T	R	R*	S	I	D	V	E	T
rACT _{6.3}	RGR↓SE	V	K	I	R	G	R*	S	E	L	V	E	T
rACT _{6.7}	KLR↓TT	V	K	I	K	L	R*	T	T	L	V	E	T
rACT _{6.1}	MTR↓SN	V	K	I	M	T	R*	S	N	A	V	E	T
ACT _{5.18}	ER↓VSP	V	K	I	T	E	R*	V	S	P	V	E	T

^a Los péptidos sustrato se seleccionaron con calicreína hK2 usando una biblioteca pentapeptídica aleatoria presentada en fagos. Los restos normales son comunes a rACT_{TS}, los restos en negrita y subrayados corresponden a péptidos sustrato relocalizados en el BSR de variantes de ACT. El enlace escindible por hK2 en los péptidos sustrato se indica con una ↓ y el supuesto sitio de escisión en las serpinas se marca con un asterisco * entre los restos P1-P1'.

45 Ensayos de inhibición y estequiometría de inhibición (EI)

Se determinaron los valores de estequiometría de inhibición (EI) para la inhibición de rACT_{TS} y sus variantes con hK2 y otras enzimas diferentes. Se realizó un ensayo inicial con un exceso molar de rACT (100 veces) sobre las enzimas hK2, PSA1, hK1, quimotripsina (Chtr), calicreína plasmática (PK), uroquinasa (uPA) y elastasa de neutrófilo humano (NHE). La reacción se efectuó durante 30 min a 25 °C (90 min a 37 °C para PSA) en tampón de reacción (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tritón X-100 0,05%, BSA 0,01%) y la actividad enzimática residual se midió añadiendo sustratos fluorescentes (Z-Phe-Arg-AMC para hK1, hK2 y PK, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC para Chtr, Z-Gly-Gly-Arg-

AMC para uPA, MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC para HNE, y CFP-TFRSA-YFP para PSA). La actividad de la enzima en presencia de inhibidores se comparó con la reacción no inhibida. Para reacciones en las que se observó una inhibición, la EI se determinó incubando diferentes concentraciones de serpinas recombinantes. Usando análisis de regresión lineal de actividad fraccional (velocidad de reacción enzimática inhibida / velocidad de reacción enzimática no inhibida) frente a la relación molar del inhibidor con respecto a la enzima ($[I]_0/[E]_0$), se obtuvo la estequiometría de inhibición, correspondiente a la intersección de las abscisas.

Cinética

Las constantes de velocidad de asociación para las interacciones de hK2, quimotripsina, PK y HNE con rACT diferentes se determinaron en condiciones de pseudo primer orden usando el método de la curva de progreso (Morrison JF, Walsh CT. 1988 "The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors" Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol 61, 201-301). En estas condiciones, se mezcló una cantidad fija de enzima (2 nm) con diferentes concentraciones de inhibidor (0-800 mM) y un exceso de sustrato (10 μ M). Cada reacción se realizó en tampón de reacción (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tritón X-100 0,05%, BSA 0,01%) a 25 °C durante 45 min y la velocidad de formación de producto se midió usando un lector de microplaca de 96 pocillos para fluorescencia FLx800 (Biotek, USA). En este modelo, se consideró que la inhibición era irreversible durante el transcurso de la reacción y el progreso de la actividad enzimática se expresó mediante la formación de producto (P), comenzando a una velocidad (V_z) y se inhibe a lo largo del tiempo (t) a una constante de velocidad de primer orden (k_{obs}), que solo depende de la concentración del inhibidor.

$$P = (v_z/k_{obs}) \times [1 - e^{(-k_{obs}t)}]$$

ec 1

Para cada inhibidor, se calculó una k_{obs} , para cuatro concentraciones de inhibidores diferentes, mediante regresión no lineal de los datos usando la ecuación 1. Representando gráficamente la k_{obs} frente a la concentración de inhibidor $[I]$, se determinó una constante de velocidad de segundo orden, k' , igual a la pendiente de la curva ($k' = \Delta k_{obs} / \Delta [I]$). Debido a la competición entre el inhibidor y el sustrato, se usó la siguiente ecuación 2 para corregir la constante de velocidad de segundo orden k' teniendo en cuenta la concentración del sustrato $[S]$ y la K_m de la enzima por su sustrato, dando la k_a .

$$K_a = (1 + [S] / K_m) \times k' \quad \text{ec 2}$$

El valor de K_m de hK2 para Z-FR-AMC, de quimotripsina para Suc-MPF-AMC, de PK para Z-FR-AMC y de HNE para MeOSuc-MPV-AMC fue de 67 μ M, 145 μ M, 170 μ M y 130 μ M respectivamente.

Análisis de transferencia de Western de formación de complejo y degradación de inhibidor

La calicreína hK2 se incubó durante 3 horas a 37 °C con diferentes ACT recombinantes a una proporción $[I]_0:[E]_0$ de 100:1 en Tris 50 mM, NaCl 200 mM, Tritón X-100 0,05%. Las muestras de proteína se calentaron a 95 °C durante 5 min, se separaron por SDS-PAGE (acrilamida 12% proporción T:C de 19:1) y después se electro transfirieron sobre nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Pharmacia). Se detectaron los complejos hK2 libre y hK2-ACT usando un anticuerpo monoclonal anti-hK2 de ratón y un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina. La transferencia de Western se visualizó usando el kit de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech). La hK2 también se incubó con ACT_{8,3} o ACT_{6,7} durante 30 min a 25 °C (condiciones cinéticas) a una proporción $[I]_0:[E]_0$ de 10:1 en Tris 50 mM, NaCl 200 mM, Tritón X-100 0,05%. Las proteínas se detectaron por transferencia de Western, usando un anticuerpo monoclonal anti-His₆ seguido de detección con el anticuerpo secundario y el protocolo descrito anteriormente.

Producción de ACT de tipo silvestre recombinante soluble y variantes de ACT

Para desarrollar inhibidores específicos de la calicreína, hK2, se usó la serpin α 1-quimotripsina de tipo silvestre. Los restos P3-P3' localizados en la estructura BSR de rACT_{TS} se reemplazaron por pentapéptidos sustrato, previamente seleccionados por tecnología de presentación en fagos como se ha descrito anteriormente. Se diseñaron y construyeron seis variantes de rACT mostradas en la Tabla IV. El enlace escindible en los péptidos sustrato se alineó de acuerdo con Leu-35B-Ser-359 en el BSR de la serpin. La rACT_{TS} y sus variantes se expresaron en la cepa TG1 de *E. coli* como proteínas de fusión que contenían una etiqueta de His en la posición N terminal. Cada uno de ellas se produjo a baja temperatura lo que permitió la acumulación de la proteína principalmente en forma soluble activa. Purificada en condiciones nativas, el nivel de producción varió entre 1,0 a 2,5 mg/l. La pureza de las serpinas purificadas, tales como, por ejemplo, la Variante 6.1 y la ACT de tipo silvestre, según se estimó mediante análisis SDS-PAGE, es mayor del 98%.

Las variantes de rACT son principalmente específicas para la calicreína hK2

Para determinar la especificidad inhibitoria de las variantes de rACT (Tabla IV), se exploró un panel de enzimas que incluía la elastasa de neutrófilo humano, las proteinasas similares a quimotripsina (Chtr, PSA o hK3) y similares a tripsina (hK2, hK1, PK, uPA).

TABLA IV

Perfil inhibitorio de rACT _{TS} y sus variantes							
	ACT _{8.20} (LR↓SRA) ^a	ACT _{6.2} (RR↓SID) ^a	ACT _{8.3} (RGR↓SE) ^a	ACT _{6.7} (KLR↓TT) ^a	ACT _{6.7} (MTR↓SN) ^a	ACT _{5.18} (ER↓VSP) ^a	ACT _{TS} (LL↓SA) ^a
	MD 820	MD 62	MD 83	MD 67	MD 61	MD518	
Proteasa	% DE INHIBICIÓN ^b						
hK2	95	100	100	100	100	73	0
Chtr	66	0	0	0	0	0	100
PK	54	100	0	36	100	0	0
HNE	30	0	0	0	60	0	15
PS (hK3)	45	0	0	0	0	0	80
hK1	0	0	0	0	0	0	0
Uroquinasa	0	0	0	0	0	0	0

^aSecuencia de aminoácidos escindida en el BSR (Bucle de Serpina Reactivo) de las ACT recombinantes que corresponde al péptido sustrato seleccionado por hK2.

^bLas proteasas y serpinas se incubaron durante 30 min a 25 °C (90 min a 37 °C para PSA) a una proporción [I]₀: [E]₀ de 100:1. El porcentaje de inhibición corresponde a 100 x (1 - (velocidad en presencia de inhibidor / velocidad de control no inhibido)).

10 Incubando con un exceso de inhibidores ([I]₀: [E]₀ de 100:1) durante 30 minutos, la hK2 se inhibe completamente por rACT_{6.2}, rACT_{8.3}, rACT_{6.7} y rACT_{6.1}, mientras que la rACT_{8.20} y la rACT_{5.18} inhibieron el 95% y el 73% de la actividad enzimática, respectivamente. En esta condición, la rACT de tipo silvestre no mostró actividad de inhibición contra hK2. Entre estas variantes, dos (rACT_{8.3} y rACT_{5.18}) son específicas para hK2, no inhibiendo otra enzima ensayada. Otras dos variantes, rACT_{6.7} y rACT_{6.2}, inhibieron también PK a 36% y 100% respectivamente. Al igual que la ACT de tipo silvestre, la variante rACT_{8.20} inhibió las dos proteasas similares a quimotripsina, Chtr y PSA, pero adicionalmente también PK y HNE. Ninguna de las serpinas recombinantes mostró actividad inhibitoria contra la calicreína hK1 y uPA.

15 Las estequiometrías de inhibición de las ACT variantes para hK2 mejoran drásticamente en comparación con las de ACT de tipo silvestre

20 La determinación de la estequiometría de inhibición se realizó en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica para todas las enzimas para garantizar la comparación más valiosa. La ACT de tipo silvestre recombinante dio un valor EI de 2 (tabla V) con la quimotripsina, que es idéntico al valor obtenido con la ACT comercial en condiciones similares (datos no mostrados).

25

Tabla V
 Comparación de valores de estequiometría de inhibición y constantes de velocidad de segundo orden (k_a) para la reacción de rACT_{TS} y sus variantes con hK2 y otras proteinasas

Proteasa	ACT _{8,20} (LR↓SRA) ^c MD820	(k_a) ^b M ⁻¹ s ⁻¹	EI	ACT _{6,2} (RR↓SID) ^c MD62	k_a^b M ⁻¹ s ⁻¹	EI	ACT _{8,32} (RGR↓SE) ^c MD83	k_a^b M ⁻¹ s ⁻¹	EI	ACT _{6,7} (KLR↓TT) ^c MD67	k_a^b M ⁻¹ s ⁻¹	EI	ACT _{6,1} (MTR↓SN) ^c MD61	k_a^b M ⁻¹ s ⁻¹	EI	ACT _{5,18} (ER↓VSP) ^c MD518	k_a^b M ⁻¹ s ⁻¹	EI	ACT _{TS} (LL↓SA) ^c
hK2	10	1779	25	6261	34	2439	9	8991	19	3442	139	595	-	-	-	-	-	-	
Chtr	13	905	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6129
PK	15	424	18	6217	-	-	27	201	16	8024	-	-	-	-	-	-	-	-	5
HINE	33	158	-	-	-	-	-	-	159	1192	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4																		

^aLos valores de EI indicados se determinaron usando análisis de regresión lineal para extrapolar la proporción I/E.

^bLas constantes de velocidad de segundo orden para las reacciones de serpina-proteinasas se midieron en condiciones de pseudo-primer o segundo orden como se describe en "Procedimiento Experimental".

^cLa secuencia de aminoácidos de los restos P3-P3' en el BSR (Bucle de Serpina Reactivo) de la ACT recombinante corresponde al péptido sustrato seleccionado por hK2.

-, Actividad inhibidora no detectable.

Para determinar los valores de EI de todas las variantes recombinantes, los solicitantes incubaron hK2 (5 nM) con diferentes concentraciones (6,25-500 nM) de rACT_{8.20}, rACT_{6.2}, rACT_{8.3}, rACT_{6.7}, rACT_{6.1}, rACT_{5.18}, rACT_{TS} a 25 °C durante 30 min en tampón de reacción. Las actividades residuales (velocidad) para hK2, se ensayaron añadiendo el sustrato fluorescente (10 μM) Z-FR-AMC. La velocidad fraccional corresponde a la proporción de la velocidad de la enzima inhibida (v_i) con respecto a la velocidad del control no inhibido (v_0). La EI se determinó usando análisis de regresión lineal para extrapolar la proporción I/E (es decir la intersección en el eje x).

Todas las variantes de ACT recién construidas, mostraron valores de EI más bajos con hK2 en comparación con la ACT de tipo silvestre. De estas variantes rACT_{6.7}, rACT_{6.1} y rACT_{6.2} tuvieron los valores de estequiometría de inhibición más bajos para hK2 (9, 19 y 25 respectivamente). Mientras que rACT_{6.2} y rACT_{6.1} también tuvieron los valores de EI más bajos (18 y 16) para PK, la EI para rACT_{6.7} fue mucho más alta (277). Las dos ACT recombinantes específicas para hK2, rACT_{8.3} y rACT_{5.18} tuvieron una proporción EI más alta de 34 y 139, respectivamente. El valor EI del inhibidor rACT_{8.20} fue superior a 100 para todas las proteasas ensayadas incluyendo la hK2.

Las ACT variantes forman complejos estables con hK2 sin degradación de inhibidores

La hK2 se incubó durante 3 h a 37 °C con rACT_{8.20}, rACT_{6.2}, rACT_{8.3}, rACT_{6.7}, rACT_{6.1}, rACT_{5.18}, y rACT de tipo silvestre, a una proporción I:E de 100:1. Se realizaron análisis de transferencia de Western de los productos de reacción de las rACT con hK2 (rACT_{8.20}), rACT_{6.2}, rACT_{8.3}, rACT_{6.7}, rACT_{6.1}, rACT_{5.18} y rACT de tipo silvestre, en condiciones reductoras usando un anticuerpo anti-hK2 de ratón para determinar el destino de los inhibidores después de la interacción con la enzima. Cuando la hK2 se incubó con variantes de ACT, la hK2 libre (E) desapareció por completo para formar un complejo covalente (EI). Este complejo covalente demostró una alta estabilidad ya que no se degradó durante un periodo de incubación de 16 h (datos no mostrados). La ACT de tipo silvestre inhibió más lentamente la hK2, que en su mayor parte no formaba complejo después de 3 horas de incubación. Los valores de estequiometría de inhibición elevados medidos con hK2 no se debieron a la degradación no formadora de complejo de los inhibidores de variantes de ACT.

Además, la ACT_{8.3} o ACT_{6.7} se incubaron con hK2 en condiciones cinéticas (30 min a 25 °C) a una proporción I:E de 10:1. La formación del complejo se analizó por transferencia de western en condiciones reductoras usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-etiqueta de his. Todas las proteínas inhibitoras formaron complejo con hK2 o estaban presentes como forma no escindida, indicando que la posible ruta del sustrato para la interacción serpin-enzima es marginal.

Las ACT variantes mostraron constantes de asociación más altas con hK2

La velocidad de reacción inhibitora con las ACT variantes se determinó para cada proteasa que mostraba reactividad con estos inhibidores. Para esta finalidad, la interacción de hK2 y de las serpinas recombinantes se midió en condiciones de pseudo-primer orden usando el método de la curva de progreso. La hK2 (2 nM) y el sustrato Z-FR-AMC (10 μM) se añadieron a diversas cantidades (20 nM-800 nM) de inhibidores rACT_{8.20}, rACT_{5.18} e inhibidores rACT_{6.2}, rACT_{8.3}, rACT_{6.7}, rACT_{6.1} (datos no mostrados). Las curvas de progreso representativas se sometieron a un análisis de regresión no lineal usando la ec 1 y la velocidad (k_{obs}) se representó gráficamente frente a las concentraciones de serpina. Después de la determinación de la k_{obs} , las constantes de asociación (k_a) se calcularon usando la K_m de las proteasas para sus sustratos correspondientes (tabla VI). El valor k_a de la ACT de tipo silvestre con la quimotripsina fue idéntico al de los datos publicados Cooley et al. 2001 "The serpin MNEI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites" *Biochemistry* 40, 15762-70). La rACT_{6.7} recombinante mostró una k_a más alta ($8991 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) con hK2 mientras que la obtenida con PK fue 45 veces inferior. En cambio, la rACT_{6.2} recombinante dio una k_a equivalente con hK2 y PK demostrando una ausencia de discriminación entre las dos proteasas. Los valores k_a de los inhibidores recombinantes específicos de hK2, rACT_{8.3} y rACT_{5.18}, fueron inferiores, 2439 y $595 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente, mientras que la ACT_{8.20} no específica mostró una k_a de $1779 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, para hK2, superior comparada con Chtr, PK y HNE. Una de las serpinas recombinantes, la rACT_{6.1}, reaccionó a una velocidad más alta con PK en comparación con hK2.

Los restos P3-P3' localizados en la estructura BSR de la rACT_{TS} se reemplazaron por el pentapéptido sustrato que codificaba el BSR del Inhibidor de Proteína C (PCI) (Tabla VI) como se describe en el ejemplo 1.

TABLA VI Alineamiento del BSR (Bucle de Serpina Reactivo) de las serpinas recombinantes ACT, PCI y ACT_{PCI}.
Secuencias BSR

Serpina	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5	P'6
rACT _{Trs}	V	K	I	T	L	L	S	A	L	V	E	T
Secuencia de ADN (codón)	GTC	AAA	ATC	ACC	CTC	CTT	TCT	GC A	TTA	GTG	GAG	GTC
rPCI _{Trs}	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L	N	S
Secuencia de aminoácidos	V	K	I	T	F	R	S	A	L	V	E	T
rACT _{PCI} (MD CI)	V	K	I	T	F	R	S	A	L	V	E	T
Secuencia de ADN (codón)	GTC	AAA	ATC	ACC	TTT	AGA	TCT	GC A	TTA	GTG	GAG	GTC

Los restos normales son comunes a la rACT_{Trs}; los restos en negrita y subrayados corresponden a péptidos sustrato relocalizados en el BSR de variantes de ACT. El enlace escindible en los péptidos sustrato se indica mediante → y el supuesto sitio de escisión en las serpinas se marca con asterisco entre los restos P1-P1'.

En resumen, para producir la proteína recombinante ACT_{PCI} (MDCI), células TG1 se transformaron con las construcciones correspondientes, seguido de crecimiento en medios de cultivo apropiados. Después, las células se indujeron a una densidad óptima para expresar los inhibidores recombinantes durante 16 h a 16 °C. El inhibidor recombinante de ACT_{PCI} se extrajo del citoplasma bacteriano y se separó por cromatografía de afinidad usando una columna de Ni-NTA como se describe en el ejemplo anterior.

Análisis de expresión de ACT recombinante mediante SDS-PAGE

La pureza de los diferentes inhibidores desarrollados en el ejemplo 1 y 2 se ensayó mediante análisis SDS-PAGE en condiciones reductoras.

Evaluación de los inhibidores

Estos inhibidores se analizaron adicionalmente para evaluar su especificidad y afinidad para inhibir las calicreínas humanas hK2 y hK3 y la calicreína plasmática, tripsina, uroquinasa, elastasa, trombina, hK14 y calicreína 8 humana (Tabla VII). Estos dos enzimas poseen diferentes especificidades enzimáticas (hK2: similar a tripsina, hK3: similar a quimotripsina) pero se inhiben de manera natural por ACT. Aunque la ACT se considera que es el inhibidor de hK3 natural en la circulación sanguínea, su inhibición de hK2 es más débil.

El análisis de la reacción inhibidora entre las rACT y las calicreínas humanas se analizó mediante transferencia de Western (datos no mostrados). Para cada una de las variantes de ACT, 1 µg de inhibidor se incubó con 100 ng de hK2 o hK3 durante 1 hora a 37 °C en condiciones fisiológicas.

Los aminoácidos cambian dentro del bucle reactivo usando secuencias sustrato seleccionadas para la ACT transformada con especificidad por hK2 en un inhibidor altamente específico para hK2 (MD820, MD61, MD62) sin inhibir hK3. Estos resultados confirman los mostrados previamente en la Tabla IV. Solamente MDCI, basándose en el bucle reactivo del inhibidor de la Proteína C (PCI) es capaz de inhibir ambas calicreínas ensayadas (hK2 y hK3).

MD61 y MD62 son inhibidores con una afinidad muy alta por hK2 inhibiendo toda la proteína hK2 en menos de 3 minutos (en las mismas condiciones) en comparación con la α1-antiquimotripsina de tipo silvestre o comercial, que requiere más de 12 horas de incubación para inhibir la misma cantidad de hK2 (datos no mostrados).

TABLA VII
Perfil inhibidor de MD_{CI}

PROTEASA	INHIBITION % ^B	EI	$k_a M^{-1} s^{-1}$
Quimotripsina	98	1	86261
Calicreína plasmática	100	4,6	25900
Tripsina	100	1	1126025
Uroquinasa	0	-	-
Elastasa	0	-	-
Trombina	0	-	-
hK14	100	3,2	287000
Calicreína humana 8	~25	~180	

Ejemplo 2:

Desarrollo de sitios activos de sustrato específicos para la hK14 humana.

El contenido de la Solicitud N+PCT/IB2006/000574 (Universidad de Lausanne) se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Materiales

Se obtuvieron los siguientes materiales de fuentes comerciales: elastasa, tripsina, quimotripsina y calicreína plasmática (Calbiochem), laminina humana 10 y 11 (Chemicon), colágeno humano IV (Life Technologies), ADN ligasa de T4 (Invitrogen), polinucleótido quinasa de T4 (Qbiogene), perlas de agarosa Ni²⁺-ácido nitrilotriacético (Qiagen), enzimas de restricción (Roche, Amersham Pharmacia, Promega), anticuerpo anti-His (Sigma). La síntesis de los oligonucleótidos se realizó en Invitrogen y la secuenciación de ADN en Synergene Biotech GmbH. La calicreína humana 2 y el antígeno específico de próstata se purificaron de plasma seminal humano como se ha descrito anteriormente (Frenette *et al.*, 1997; Frenette *et al.*, 1998). La matrilina-4 es un obsequio de R. Wagener (Colonia, Alemania).

Clonación de KLK14 en el vector de expresión pPICZ α A de *P. pastoris*

Se realizó síntesis de ADNc de primera cadena por transcriptasa inversa usando el sistema de preamplificación SuperScript™ (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) con 2 μ g de ARN total de cerebelo humano (Clontech, Palo Alto, CA) como molde. El volumen de reacción final fue de 20 μ l. Para confirmar la eficacia de la RT-PCR, 1 μ l de ADNc se amplificó posteriormente por PCR con cebadores específicos para actina, un gen constitutivo (ActinS: 5' ACAATGAGCTGCGTGTGGCT, ActinAS: 5' TCTCCTTAATGTCACGCACGA). Los productos PCR de actina con una longitud esperada de 372 pares de bases (pb) se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. La amplificación por PCR del ADNc de KLK14 que codifica los 227 aminoácidos de la proteína hK14 madura (correspondiente a los aminoácidos 25-251 del n.º de registro de Genbank AAK48524) se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 50 μ l que contenía 1 μ l de ADNc de cerebelo como molde, 100 ng de cebadores (FPL6: 5' AGG ATG AGG AAT TCA TAA TTG GTG GCC AT (SEQ ID NO 69) y RPL6: 5' CCC ACC GTC TAG ACC ATC ATT TGT CCC GC (SEQ ID NO 70)), Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, desoxinucleósido trifosfatos 200 μ M (dNTP) y 0,75 μ l (2,6 U) de mezcla de polimerasa PCR de Molde Expand Long (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) usando un ciclador maestro Eppendorf. Las condiciones de la PCR fueron 94 °C durante 2 min, seguido de 94 °C durante 10 s, 52 °C durante 30 s, 68 °C durante 1 min durante 40 ciclos y una extensión final a 68 °C durante 7 min. Después de la PCR, la KLK14 amplificada se visualizó con bromuro de etidio en geles de agarosa al 2 %, se extrajo, se digirió con EcoRI/XbaI y se ligó en el vector de expresión pPICZ α A del sistema de expresión de *Pichia pastoris* Easysselect™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) en sitios de enzimas de restricción correspondientes usando técnicas convencionales (Sambrook *et al.* 1989). La secuencia de KLK14 con la construcción se confirmó con un secuenciador de ADN automático usando cebadores específicos del vector en ambas direcciones.

Producción de la proteína

El vector pPICZ α A-KLK14 linealizado con PmeI, así como el vector pPICZ α A vacío (control negativo), se transformaron en células X-33 químicamente competentes de la cepa de levadura de *P. pastoris*, después de lo cual se integraron en el genoma de levadura mediante recombinación homóloga. Las células X-33 transformadas se sembraron después en YPDS (extracto de levadura al 1%, peptona al 2 %, dextrosa al 2 %, sorbitol 1 M, agar al 2 %) en placas que contenían Zeocin™, un reactivo selectivo. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se seleccionó un transformante de levadura estable, se inoculó en complejo glicerol mínimo tamponado (BMGY) [extracto de levadura al 1 %, peptona al 2 %, fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0), base de nitrógeno de levadura 1,34 %, biotina 40 mg/litro y glicerol al 1 %] durante una noche a 30 °C en un agitador de placa a 250 rpm, se diluyó a una DO₆₀₀ = 1,0 en BMMY (el mismo que BMGY excepto que se reemplazó el glicerol al 1 % con metanol al 0,5 %) y se incubó en las mismas condiciones que las anteriores durante 6 días con un complemento diario de metanol al 1 %. El sobrenadante se recogió por centrifugación a 4000 x g durante 20 min.

Purificación de la proteína

La hK14 recombinante se purificó del sobrenadante del cultivo de levadura por intercambio de cationes usando una columna de flujo rápido de carboximetil (CM) Sepharose HiTrap™ de 5 ml en el sistema de cromatografía AKTAFPLC (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). En primer lugar, el sobrenadante se filtró con un filtro desechable de 0,22 μ m y se concentró 50 veces por ultra-filtración con una membrana Amicon™ YM10 (Millipore Corporation, Bedford, MA). El sobrenadante filtrado, concentrado, se introdujo después en el inyector del sistema AKTAFPLC y se cargó en la columna de CM Sepharose, previamente equilibrada con 5 ml de tampón MES 10 mM (pH 5,3) a un caudal de 0,8 ml/min. La columna se lavó con el tampón de equilibrio anteriormente mencionado y la hK14 adsorbida se eluyó con un gradiente de KCl lineal continuo de 150 ml de 0 a 1 M en MES 10 mM (pH 5,3) a un caudal de 3 ml/min. Las fracciones de elución de 5 ml se recogieron y analizaron. Las fracciones que contenían hK14 se agruparon y posteriormente se concentraron 10 veces usando el dispositivo de Biomax-10 Ultrafree®-15 Centrifugal Filter (Millipore Corporation, Bedford, MA). La concentración de proteína de la hK14 purificada se determinó mediante el método del ácido bicinonínico (Smith *et al.*, 1985), que usa albúmina de suero bovino como calibrador (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

La pureza de la proteína hK14 recombinante se analizó mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970) seguido de tinción con azul de Coomassie y/o análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo de conejo policlonal producido previamente suscitado contra hK14 (Borgono *et al.*, 2003) y su identidad se confirmó mediante espectrometría de masas en tándem, como se describe con detalle para la hK10 recombinante (Luo *et al.*, 2001).

Exploración de la biblioteca pentapeptídica presentada en fagos

Un fagémido de tipo monovalente proporcionado por el Dr Lowman (Genentech company, San Francisco, CA) se modificó previamente para generar una fagoteca de sustrato que contenía seis restos de His en el extremo N terminal con respecto al pentapéptido aleatorio fusionado a g3p (Cloutier *et al.*, 2002). Los seis restos de His permiten la fijación del fago a la columna de Ni-NTA.

La preparación del dúplex que se inserta en el fagémido se realizó por reacción PCR de un oligonucleótido degenerado, en el que los 5 aminoácidos al azar están codificados por NSS (N=A, T, G, C y S=G, C). La biblioteca resultante se componía de $1,8 \times 10^8$ transformantes, que es lo suficientemente grande para obtener todas las secuencias aleatorias representadas.

5 Esta biblioteca de sustrato de presentación en fagos se sometió a seis rondas de exploración con hK14. En resumen, los fagos sustrato (10^{11}) se incubaron con sesenta microlitros de resina Ni^{2+} -ácido nitrilotriacético en PBS 1X que contenía BSA a 1 mg/ml, se lavaron cuatro veces (PBS 1X, BSA 1 mg/ml, imidazol 5 mM, Tween 20 al 0,1 %) para retirar los fagos no unidos y después se expusieron a 65 nM (concentración final) de hK14 durante 45 minutos a 37 °C en Tris 50 mM, NaCl 100 mM, Tritón al 0,05 %, pH 7,5. Los fagos liberados se amplificaron posteriormente usando *Escherichia coli* XL1-Blue y después, tras la purificación, se usaron para rondas de selección posterior. Se secuenciaron 32 clones individuales de la última ronda de selección para la determinación de sus secuencias de aminoácidos correspondientes.

15 Expresión del sustrato fluorescente CFP-YFP

Se construyeron sustratos fluorescentes recombinantes, usando la proteína fluorescente cian como donante y la proteína fluorescente amarilla como aceptor, como se ha descrito anteriormente (Felber *et al.*, 2004). Las proteínas recombinantes CFP-XXXXX-YFP-6xHis se construyeron con distintos pentapéptidos (en negrita) entre las proteínas CFP e YFP usando genes sintéticos que poseían los sitios de restricción (BssHII; Sall) apropiados. Las construcciones contenían las siguientes secuencias de aminoácidos entre las proteínas CFP e YFP: Gly-Ala-Leu-Gly-Gly-XXXXX-Gly-Ser-Thr. Para producir las proteínas recombinantes, células TG1 se transformaron con las construcciones correspondientes y se purificaron mediante cromatografía de afinidad usando perlas de agarosa Ni^{2+} -NTA. La pureza y cantidad de los sustratos recombinantes CFP-YFP purificados se evaluó mediante electroforesis en gel de SDS de acuerdo con Laemmli seguido de tinción con Azul de Coomassie y análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo primario anti-His específico (dilución 1/3000), un anticuerpo secundario anti-Fab de ratón (dilución 1/50000) y el sistema ECL (Amersham) para la detección. Todos los clones se secuenciaron antes de la evaluación.

30 Determinación directa de K_{cat}/K_m y estudios de especificidad usando los sustratos fluorescentes CFP-YFP

La especificidad de sustrato de las proteínas CFP-sustrato-YFP se ensayó frente a diferentes proteasas y los valores de K_{cat}/K_m se calcularon como se ha descrito anteriormente (Felber *et al.*, 2004). En resumen, la fluorescencia de las proteínas CFP-X₅-YFP se midió en placas negras de 96 pocillos usando un lector de fluorescencia de microplaca (Bio-Tek Instruments, Inc.) con excitación a 440 nm (± 15) y emisiones a 485 nm (± 10) y 528 nm (± 10). Cada sustrato recombinante, a una concentración de 150 nM, se incubó hK14, quimotripsina, tripsina, PSA, hK2, caliceína plasmática o elastasa a una concentración final de 8 nM, 0,1 nM, 0,3 nM, 2 μM , 10 nM, 10 nM y 0,5 nM, respectivamente. La reacción se realizó durante 60 min a 37 °C en tampón de reacción (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, Tritón-X100 al 0,05 %). La concentración enzimática para determinaciones de velocidad inicial se seleccionó a un nivel con objeto de hidrolizar específicamente el enlazador de sustrato y no un sustrato GGGGG, que se usó como control negativo. La aparición de fluorescencia, que correspondía a la formación de productos, se midió mediante espectrometría con una excitación a 440 nm (± 15) y una emisión a 485 nm (± 10). La pendiente se transformó en unidades de nmol de producto generado por segundo, basándose en una curva de calibración obtenida a partir de la hidrólisis completa de cada péptido, evaluado en SDS-PAGE. El parámetro cinético k_{cat}/K_m se determinó en condiciones de pseudo primer orden usando una concentración de sustrato muy por debajo de la K_m estimada (Felber *et al.*, 2004).

Los productos de escisión se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno Immobilon (Bio-Rad) y se sometieron a degradación automática Edman con un secuenciador de Applied-Biosystems (modelo AB1493A) para determinar el sitio de escisión.

50 Selección de sustratos de fago para hK14

La fagoteca de sustratos se cribó frente a hK14 para seleccionar sustratos escindidos por su actividad hidrolítica. Los fagos escindidos se amplificaron en células TG1 de *E. coli* y después se sometieron a cinco rondas más de digestión enzimática y exploración. La cantidad de fagos liberados aumentó en cada ronda, indicando la presencia de un mayor número de fagos susceptibles a hK14 después de cada ronda de selección. Las secuencias de aminoácidos de 32 péptidos de fago de la última ronda de selección se determinaron por secuenciación. Las secuencias correspondientes a las regiones de sustrato se indican en la Tabla 1. De todos los péptidos seleccionados y escindidos, un 69 % posee un resto básico en la posición P1, como se esperaba para una supuesta actividad similar a tripsina de hK14, mientras que un 31 % de los péptidos tenía un resto de tirosina específico para una enzima similar a quimotripsina en P1.

Caracterización cinética de la hidrólisis de sustratos por hK14

Para verificar que las secuencias del análisis de presentación en fagos eran ciertamente sustratos para hK14, y para identificar el sitio de escisión, todos los péptidos seleccionados se construyeron en forma de sustrato fluorescente. El sistema de sustrato de los solicitantes se basa en la transferencia de energía de CFP a YFP que está relacionada con el sustrato. La escisión del enlazador mediante una proteasa separa los dos fluoróforos y produce una pérdida de transferencia de energía. Por tanto, la hidrólisis del sustrato puede evaluarse midiendo el aumento de la intensidad de fluorescencia del donante a 485 nm, correspondiente a la longitud de onda de emisión de CFP (Mitra *et al.*, 1996; Felber *et al.*, 2004).

Todos los sustratos se hidrolizaron con hK14 con un nivel de eficacia variable y con valores de Kcat/Km que variaban de 2 000 a 481 000 M⁻¹s⁻¹. La especificidad de la escisión se demostró con CFP-GGGGG-YFP que no se hidrolizó con hK14 (no mostrado).

Los resultados indican claramente que el aminoácido P1 preferido para hK14 es susceptiblemente Arg (Tabla 1) dado que los mejores sustratos de hK14 con valores de Kcat/km mayores de 200.000 M⁻¹s⁻¹ poseen una Arg en la posición P1. Cabe destacar, a partir de los cuatro péptidos escindidos más eficazmente por hK14, que dos contenían una Gln en la posición P2. En cambio, se encontró una amplia variedad de aminoácidos en la posición P1', demostrando una preferencia no significativa en esta posición. Sin embargo, dos sustratos poseen un ácido aspártico en la posición P1' y se escinden de manera relativamente eficaz.

Por otro lado, todos los sustratos con una Lys en la posición P1 se escindieron a baja velocidad con un valor de Kcat/Km igual a, o por debajo de, 34. 000 M⁻¹s⁻¹. De manera similar, la velocidad de escisión para los sustratos con una tirosina P1 fue muy baja excepto para un sustrato, el péptido G9, que tuvo un valor de Kcat/Km de 134 000 M⁻¹s⁻¹. Con la excepción de la posición P1', donde se encuentra el resto glicina en aproximadamente un 50 % de los sustratos de Lisina o Tirosina P1, en las otras posiciones no se recuperó ningún aminoácido más frecuentemente. No obstante, ha de comentarse que la mayoría de los restos de glicina encontrados en la posición P1' se originaban en la región enlazadora del fago que flanqueaba los sustratos pentapéptidos seleccionados, en donde los restos de Lys o Tyr se encontraban en la posición 5 del péptido seleccionado.

Especificidad de sustratos seleccionados preferidos

Dado que muchos de los sustratos seleccionados contenían motivos posiblemente susceptibles a escisión por otras proteasas, los solicitantes midieron el grado al cual la hK2, la caliceína plasmática, PSA, quimotripsina, tripsina y elastasa podían escindir estos sustratos de hK14 (Tabla VIII). Cada sustrato se ensayó a una concentración enzimática que conducía a la escisión específica en el enlazador de sustrato y no hidrolizando el sustrato de control GGGGG.

De manera no sorprendente, la mayoría de los sustratos similares a tripsina se escindían con tripsina con una eficacia variable que no se correlacionaba estrictamente con las preferencias de hK14. Por ejemplo, los dos pentapéptidos, VGSRL y RQTND, eran los mejores sustratos para hK14 pero no se escindían de un modo eficaz con tripsina en comparación con otros péptidos similares a LSGGR mostrando un valor de Kcat/Km de casi 5.000.000 M⁻¹.s⁻¹. Por otro lado, los péptidos que poseían una Gln en la posición P2 eran excelentes sustratos para hK14 así como para la tripsina. Únicamente dos sustratos de hK14 con baja actividad hK14 similar a tripsina, RVTST y VVMKD, aunque cuatro de los cinco sustratos con actividad hK14 similar a quimotripsina, no se escindieron con tripsina.

Todos los sustratos similares a quimotripsina se escindieron con quimotripsina de un modo más eficaz que con hK14, excepto para el sustrato TVDYA que dio caso el mismo valor kcat/Km con hK14, quimotripsina y elastasa. La elastasa proteolizó también los dos péptidos seleccionados, TSYLN e YQSLN, que también se escindió débilmente con PSA

Los sustratos preferidos mostraron una alta selectividad por hK14 en comparación con las otras caliceínas humanas tales como hK1, hK2, PSA y PK. Únicamente hK2 proteolizó la mayoría de los sustratos similares a tripsina con valores Kcat/Km siempre al menos 5 veces inferiores que para hK14. Por ejemplo, el péptido NQRSS es 27 y 78 veces más selectivo por hK14 que por hK2 y PK, respectivamente y el péptido F3 demuestra alta especificidad por hK14 y no puede detectarse ninguna escisión con otra caliceína.

TABLA VIII

Especificidad de sustratos hK14 seleccionados con fagos frente diferentes proteasas humanas

Péptido	Secuencia	hK14	Tripsina	Quimotripsina	Elastasa	Caliceína plasmática	hK1	hK2	PSA
Sustrato de tipo tripsina									
<u>Kcat/Km (M⁻¹.s⁻¹)</u>									
G1	VGSLR	481.000	270.000	145.000	-	-	-	21.000	-
C11	ROTNO	415.000	260.000	251.000	-	-	-	23.000	-
E5	NORSS	388.000	2.070.000	-	-	-	-	14.000	-
E8	LORAI	367.000	2.270.000	-	209.000	5.000	-	25.000	-

Péptido	Secuencia	hK14	Tripsina	Quimotripsina	Elastasa	Calicreína plasmática	hK1	hK2	PSA
Sustrato de tipo tripsina									
<u>Kcat/Km (M-1.s-1)</u>									
F11	ORLRO	307.000	1.420.000	168.000	-	-	E.B.	32.000	-
F3	PORHM	243.000	319.000	192.000	-	-	-	-	-
E2	LSGGR	207.000	4.676.000	83.000	-	-	-	14.000	-
E7	LSRON	127.000	246.000	155.000	-	-	-	16.000	-
O9	RGKTN	80.000	2.111.000	94.000	-	-	-	21.000	-
E9	NNKLR	74.000	384.000	77.000	-	-	-	12.000	-
E12	RVTST	26.000	-	100.000	200.000	-	-	-	-
E10	VVMKD	15.000	-	-	65.000	-	-	-	-
Sustrato de tipo quimotripsina									
<u>Kcat/Km (M-1.s-1)</u>									
G9	TVDYA	134.000	-	145.000	181.000	-	-	-	-
E1	AYGYK	24.000	129.000	618.000	-	-	-	-	-
F6	VGLYD	18.000	-	409.000	-	-	-	-	-
F10	YQSLN	12.000	-	134.000	49.000	-	-	-	E.B.
D7	TSYLN	9.000	-	266.000	90.000	-	-	-	-
L.C.: escisión baja, kcat/km no determinada; - escisión no detectable									

Ejemplo 2:

Materiales

5 Los siguientes materiales se obtuvieron de fuentes comerciales: elastasa, tripsina, quimotripsina y calicreína plasmática (Calbiochem), ADN ligasa de T4 (Invitrogen), polinucleótido quinasa de T4 (Qbiogene), perlas de agarosa de Ni²⁺-ácido nitrilotriacético (Qiagen), enzimas de restricción (Roche, Amersham Pharmacia, Promega) y anticuerpo anti-His y un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma). Los sustratos fluorescentes Z-Phe-Arg-AMC, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, Z-Gly-Gly-Arg-AMC y MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC se adquirieron en Calbiochem, Boc-Val-Pro-Arg-AMC en Bachem, Abz-Thr-Phe-Arg-Ser-Ala-Dap(Dnp)-NH₂ en Neosystem. La síntesis de los oligonucleótidos se realizó en Invitrogen y la secuenciación del ADN en Synergene Biotech GmbH. La calicreína humana 2, 5, 13 y 14 se produjo en un sistema de levadura (Yousef *et al.*, 03c; Kapadia *et al.*, 03; Borgono *et al.*, 03). La calicreína humana 6 se produjo en un sistema de células 293 de riñón embrionario humano y la calicreína humana 8 con un vector de baculovirus y células de insecto HighFive (Little *et al.*, 97; Kishi *et al.*, 03). La kK6 y la hK8 se activaron con Lys-C (Shimizu *et al.*, 98).

Construcción de vectores de expresión para AAT, ACT de tipo silvestre recombinante, y sus variantes

20 El ADNc de AAT humano (Invitrogen, UK) se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos 5'-TATGGATCCGATGATCCCCAGGGAGA-3' (SEQ ID NO 71) y 5'-CGCGAAGCTTTTATTTTGGGTGGGA -3' (SEQ ID NO 72). El fragmento *Bam*-HI-*Hind*III del gen AAT amplificado se clonó en el vector pQE9 (Qiagen, Alemania) dando como resultado el plásmido pAAT, que contenía una fase de lectura abierta de AAT maduro con una etiqueta His₆ en el extremo N terminal. Se introdujeron mutaciones silenciosas produciendo sitios de restricción *Kas*I y *Bsu*361 en pAAT 24 pb aguas arriba y 11 pb aguas abajo del codón P1 del dominio BSR, respectivamente. Los sitios de restricción se crearon usando los oligonucleótidos 5'-ACTGAAGCTGCTGGCGCCGAGCTCTTAGAGGCCATA-3' (SEQ ID NO 73) para el sitio *Kas*I y 5'-GTCTATCCCCCTGAGGTCAAGTTC-3' (SEQ ID NO 74) para el sitio *Bsu*361 siguiendo el protocolo de mutagénesis de QuikChange proporcionado por Stratagene. La construcción del plásmido que expresa ACT de tipo silvestre se describió anteriormente (Cloutier *et al.*, 2004).

Las variantes rAAT y rACT se produjeron por reemplazo de la región BSR con fragmentos de ADN correspondientes amplificados a partir de oligonucleótidos molde apropiados: rAAT_{E8},

35 5'-CCATGTTTCTAGAGGCTCTGCAGCGTGCTATCCCGCCTGAGGTCAAGTT-3'(SEQ ID NO 75); rAAT_{G9}, 5'-CCATGTTTCTAGAGACCGTTGACTACGCTATCCCGCCTGAGGTCAAGTT-3'(SEQ ID NO 76), rACT_{E8}, 5'-TACCGCGGTCAAATCCTGCAGCGTGCTATCCTGGTGGAGACGCGTGA-3' (SEQ ID NO 77) y rACT_{G9}, 5'-TACCGCGGTCAAACCGTTGACTACGCTGCTCTGGTGGAGACGCGTGA-3'(SEQ ID NO 78). Los moldes se amplificaron usando cebadores correspondientes en sus regiones flanqueantes respectivas, 5'-GCTGGCGCCATGTTTCTAGAG-3' (SEQ ID NO 79; variantes AAT 1) y 5'-TTGTTGAACCTGACCTCAGG-3' (SEQ ID NO 80; variantes AAT 2) para variantes de AAT y 5'-GTACCGCGGTCAA-3'(SEQ ID NO 81; variantes ACT 1) y 5'-TCACGCGTGTCCAC-3'(SEQ ID NO 82; variantes ACT 2) para variantes de ACT. Los fragmentos resultantes de la PCR se clonaron como fragmentos *Kas*I/*Bsu*361 en pAAT y como fragmentos *Mlu*I/*Sac*II en construcciones rACT_{TS} y se confirmaron por secuenciación de ADN. En la Tabla IX se muestran cambios en el bucle de sitio

reactivo entre las posiciones P4 y P2'.

Expresión y purificación de serpinas recombinantes

5 Se produjeron serpinas recombinantes en la cepa TG1 de *Escherichia coli*. Las células se cultivaron a 37°C en medio 2x TY (triptona 16 g, extracto de levadura 10 g, NaCl 5 g por l) que contenía ampicilina 100 µg/ml a una D.O.₆₀₀ = 0,5-0,7. Se añadió isopropil tio-β-galactósido (IPTG) a una concentración final de 0,5 mM para la producción de proteínas rACT y de 0,1 mM para la de proteínas rAAT y las serpinas recombinantes se expresaron durante 16 h a 18 °C. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en un volumen de 0,1 de PBS 2X frío. Después de 45 min de incubación con lisozima (0,5 mg/ml) en hielo, se extrajeron proteínas citoplasmáticas solubles totales mediante cuatro ciclos de congelación/descongelación y el ADN total se degradó con DNasa I. Los desechos celulares se retiraron por centrifugación (25 min, 17.500 g) y se añadieron al sobrenadante perlas de agarosa de afinidad de Ni²⁺-ácido nitrilotriacético durante 90 min a 4 °C para unir las serpinas recombinantes. La resina se lavó tres veces con Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, imidazol 20 mM y las proteínas unidas se eluyeron con Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, imidazol 150 mM. Las proteínas eluidas se dializaron contra Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tritón X-100 al 0,01 %, durante 16 h a 4 °C y la pureza de la proteína se evaluó mediante SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. Las concentraciones de las proteínas se determinaron mediante el método del ácido bicinonínico (Smith *et al.*, 1985), usando albúmina de suero bovino como patrón (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). La AAT_{E8}, ACT_{E8} y AAT_{G9}, ACT_{G9} se titularon con tripsina y quimotripsina, respectivamente.

Estequiometría de inhibición (EI)

25 Los valores de EI de rAAT, rACT y sus variantes se determinaron con hK14 incubando la proteasa con diversas concentraciones de inhibidor. Después de una incubación de 4 horas a 37 °C en tampón de reacción (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tritón X-100 al 0,05 %, BSA al 0,01 %), la actividad residual se detectó mediante la adición de sustrato fluorescente (Boc-Val-Pro-Arg-AMC). La fluorescencia se midió con excitación a 340 nm (± 15) y emisión a 485 nm (± 10) en placas de 96 pocillos negras usando un vector de fluorescencia de microplaca FL_x800 (Bio-Tek Instruments, Inc.). El valor EI corresponde a la intersección de abscisas del análisis de regresión lineal de la velocidad fraccional (velocidad de la reacción enzimática inhibida (v_i) / velocidad de la reacción enzimática no inhibida (v₀)) frente a la proporción molar del inhibidor con respecto a la enzima ([I₀]/[E₀]).

Análisis cinético

35 Las constantes de velocidad de asociación para las interacciones de hK14, con diferentes inhibidores se determinaron en condiciones de pseudo primer orden usando el método de la curva de progreso (Morrison y Walsh, 1988). En estas condiciones, una cantidad fija de enzima (2 nM) se mezcló con diferentes concentraciones de inhibidor (0-80 nM) y un exceso de sustrato (20 µM). Las reacciones se realizaron en tampón de reacción (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,05 %, BSA al 0,01 %) a 37 °C durante 45 min y la velocidad de formación del producto se midió usando un lector de microplaca de 96 pocillos de fluorescencia FL_x800 (Biotek, USA). Se consideró que la inhibición era irreversible durante el transcurso de la reacción y la progresión de la actividad enzimática se expresó como formación de producto (P), comenzando a una tasa (v_z) y se inhibió a lo largo del tiempo (t) a una velocidad de primer orden (k_{obs}), en el que la constante de velocidad solo depende de la concentración de inhibidor.

45

$$P = (v_z/k_{obs}) \times [1 - e^{-(k_{obs}t)}] \quad \text{ec 1}$$

50 Para cada inhibidor, se calculó una k_{obs} para cuatro concentraciones de inhibidor diferentes, mediante regresión no lineal de los datos usando la ecuación 1. Representando gráficamente la concentración de inhibidor frente a k_{obs} [I], se determinó una segunda constante de velocidad de segundo orden, k' igual a la pendiente de la curva (k' = Δ k_{obs} / Δ [I]). Debido a la competición entre el inhibidor y el sustrato, la ecuación 2 siguiente se usa para corregir la constante de velocidad de segundo orden k' teniendo en cuenta la concentración del sustrato [S] y la K_m de la enzima por su sustrato, dando la K_a.

55

$$K_a = (1 + [S] / K_m) \times k' \quad \text{ec 2}$$

La K_m de hK14 para MeOSuc-VPR-AMC fue de 8 µM. Sin embargo, se entenderá que, dependiendo del grado de pureza y de la actividad específica de la proteasa hK14, la K_m puede variar.

60 Análisis SDS-PAG de complejos enzima-inhibidor

Se incubó una cantidad constante de los diferentes inhibidores (que variaba de 1 a 2 µg) durante 4 h en tampón de reacción (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,05 %) con diferentes cantidades de hK14 correspondientes a 0,5, 1 y 2 veces el valor EI. Las muestras se calentaron a 90 °C durante 10 minutos, se

resolvieron en un gel SDS al 10 % en condiciones reductoras y se visualizaron mediante tinción con Azul de Coomassie.

Especificidad inhibidora de rAAT recombinante y variantes de rACT (Tabla IX)

Se incubaron 2 nM de tripsina, quimotripsina, calicreína plasmática, elastasa de neutrófilo humano y trombina y 10 nM de hK2, hK3, hK5, hK6, hK8, hK13 y hK14 durante 30 minutos a 37 °C con 100 nM y 500 nM de inhibidores recombinantes, respectivamente. Las actividades residuales se detectaron mediante la adición de sustratos fluorescentes (Z-Phe-Arg-AMC para tripsina y calicreína plasmática, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC para quimotripsina, Z-Gly-Gly-Arg-AMC para trombina y MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC para la elastasa de neutrófilo humano y Abz-Thr-Phe-Arg-Ser-Ala-Oap(Onp)-NH₂ para las calicreínas humanas).

Estabilidad del complejo

La hK14 (2 nM) se incubó con diferentes cantidades de inhibidores, correspondientes a 0, 1 y 2 veces la EI. Después de incubaciones durante 4, 8 y 24 h a 37 °C en tampón de reacción (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,05 %, BSA al 0,1 %), la actividad residual se detectó con la adición de 20 μM de sustratos fluorescentes Boc-Val-Pro-Arg-AMC. La pendiente (velocidad) de cada reacción inhibidora se dividió entre la pendiente de la reacción correspondiente sin inhibidor.

Diseño y producción de serpinas recombinantes solubles

Para desarrollar inhibidores específicos para hK14, los solicitantes sustituyeron cinco restos, adyacentes al enlace escindible de rAATs y rACTs, por dos pentapéptidos sustrato, previamente seleccionados con hK14 usando tecnología de presentación en fagos (Felber *et al.*, 05). El perfil de la actividad enzimática de hK14 demostró que hK14 tenía una doble actividad, de tripsina y similar a quimotripsina. Por lo tanto, los solicitantes decidieron desarrollar inhibidores con dos péptidos sustrato, E8 y G9, específicos para actividad de tripsina y similar a quimotripsina, respectivamente. El enlace escindible de estos sustratos se alineó de acuerdo con la P1-P'1 de la rAATs y rACTs. En la Tabla IX se muestran las regiones BSR de las variantes de serpina.

TABLA IX

Serpins	Péptido sustrato seleccionado ^a	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'
AAT _{TS}		L	E	A	I	P	M*	S	I	P	P	E
AAT _{E8}	LQR↓AI	L	E	A	L	Q	R*	A	I	P	P	E
AAT _{G9}	TVDY↓A	L	E	T	V	D	Y*	A	I	P	P	E
ACT _{TS}		V	K	I	T	L	L*	S	A	L	V	E
ACT _{E8}	LQR↓AI	V	K	I	L	Q	R*	A	I	L	V	E
ACT _{G9}	TVDY↓A	V	K	T	V	D	Y*	A	A	L	V	E

Comparación de secuencias de aminoácidos de la región del enlace escindible del bucle de serpina reactivo (BSR) de AAT, ACT de tipo silvestre y sus variantes.

^aPéptidos sustratos seleccionados por calicreína hK14 usando una biblioteca pentapeptídica aleatoria de presentación en fagos (Felber *et al.*, 2004). Los restos normales son comunes a la serpina de tipo silvestre, los restos en negrita corresponden a péptidos sustratos relocalizados en BSR de variantes de AAT y de ACT. El enlace escindible escindido con hK14 en los péptidos sustrato se indica mediante una ↓ y los supuestos sitios de escisión en las serpinas se marcan con * entre los restos P1-P1'.

Las serpinas recombinantes se produjeron como una forma activa, soluble, y se purificaron en condiciones nativas a partir de proteínas citoplasmáticas en un procedimiento de una etapa sobre una columna de afinidad de níquel. El análisis en SDS-PAGE en condiciones reductoras reveló una sola banda para cada inhibidor, para variantes rAAT y rACT, que migraban en sitios aparentes de 45 a 50 kDa, correspondientes con sus pesos moleculares, excepto para la proteína AAT_{E8}, que migraba ligeramente más rápido (datos no mostrados). Se calculó que la pureza de todos los inhibidores era mayor de 95 % mediante análisis densitométrico, con un intervalo de rendimiento de producción de 1 a 5 mg/ml.

Estequiometría de inhibición, constantes de asociación y estabilidad de complejos

La determinación de la estequiometría de inhibición (EI) se realizó en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica. La EI indica el número de molécula inhibidora necesario para inhibir una molécula de hK14. Los solicitantes observaron que las curvas de titulación eran lineales, incluso para valores EI >>1, indicando que la reacción está completamente finalizada. Los valores EI calculados de las variantes de serpina variaban de ~1 a 1,5, excepto para rAAT_{E8} que dio como resultado una EI de 7,4 (Tabla X). Mientras que la ACT de tipo silvestre no reaccionó con hK14 en las condiciones ensayadas, se observó que la AAT_{TS} era un buen inhibidor de hK14 con una EI de 1. La sustitución de la región BSR de ACT con los péptidos sustrato hK14 no solamente permitió la generación de la reactividad hacia la enzima, sino que creaba inhibidores con alta afinidad. Por otro lado, usando AAT_{TS} como armazón, la modificación de BSR fue menos favorable ya que todos los inhibidores eran menos eficaces que la

versión de tipo silvestre (Tabla X).

TABLA X

Inhibidor	Péptido sustrato seleccionado ^a	EI	$k_a \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
AAT _{TS}	IPM*EI	1,0	263 000
AAT _{E8}	LQR↓AI	7,4	n.a.
AAT _{G9}	TVDY↓A	1,2	217 000
ACT _{TS}	TLL*SA	-	-
ACT _{E8}	LQR↓AI	1,2	575 000
ACT _{G9}	TVDY↓A	1,5	74000

Valores de estequiometría de inhibición (EI) y constantes de velocidad de segundo orden (k_a) para la reacción de rAATs, rACTs y sus variantes con hK14. a, Péptido sustrato seleccionado por tecnología de presentación en fagos con hK14 (Felber *et al.*, 2005) y usado para modificar rAATs y rACTs. -, Actividad inhibitora no detectable.

5 Los valores EI calculados eran coherentes con la proporción entre las formas de las serpinas escindidas y las que formaban complejo, después de la reacción con hK14 como se demuestra mediante análisis SDS-PAGE (datos no mostrados). Cada variante se incubó con concentraciones diferentes de hK14 correspondientes a una proporción de inhibidor con respecto a proteasa por debajo, igual y por encima del valor de EI. El análisis de SDS-PAGE mostró la formación de complejos (C) covalentes para cada par de hK14 variante de serpina, con una masa molecular aparente en consonancia con los valores esperados. Cuando la concentración de hK14 era de 0,5 veces el valor de EI, se observó que las formas degradadas del complejo se generaban realmente por la hK14 libre y formando complejo.

15 Además de la formación de un complejo inhibidor, la reacción con hK14 también produjo una fracción de inhibidor hidrolizado, con un peso molecular coherente con la serpina que se escinde en el sitio reactivo del BSR o cerca del mismo. La cantidad de esta fracción se redujo considerablemente cuando el valor de EI estaba cerca de 1 (AAT-G9, ACT-E8 y ACT-G9). En cambio, la única variante con valores EI $\gg 1$ (rAAT_{E8}) mostró un comportamiento de sustrato con hK14, resultante principalmente de la acumulación de la forma escindida del inhibidor en lugar de la formación de complejo irreversible. Como se esperaba, la presencia de inhibidor intacto se observó cuando la proporción $[I]_0 / [E]_0$ estaba por encima del valor EI con una banda de complejo débil.

20 Sorprendentemente, se descubrió que la mayoría de los complejos eran estables a SDS (datos no mostrados) incluso si se observaba una degradación relativamente baja del complejo con AATG9, dando como resultado la reaparición de la actividad de hK14 después de 8 horas de incubación.

25 El análisis cinético de la inhibición de la hK14 humana por serpinas recombinantes se realizó en condiciones de pseudo primer orden usando un exceso de inhibidor a diversas proporciones molares de hK14. La inactivación dependiente del tiempo de la enzima a través de la reacción con serpina se monitorizó continuamente, siguiendo la disminución en la tasa de renovación de sustrato. Las curvas de progreso para reacciones con diferentes concentraciones de serpina se ajustaron a la ecuación 1 para calcular valores que describen las constantes de velocidad (k_{obs}). Las constantes de velocidad de asociación (k_a) se determinaron a partir de la pendiente de valores k_{obs} frente a la concentración de inhibidores de hK14. Independientemente del armazón inhibidor (AAT o ACT), las serpinas recombinantes modificadas con el sustrato E8 mostraron valores k_a superiores en comparación con el inhibidor G9 equivalente.

35 Las serpinas modificadas con el sustrato similar a quimotripsina, rAAT_{G9} y rACT_{G9}, demostraron únicamente una actividad moderada por hK14, con constantes de asociación de 217.000 y 74.000 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ respectivamente, aunque rACT_{E8} poseía una constante de asociación de 575.000 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Especificidad inhibitora de las variantes rAAT y rACT recombinantes

40 Para definir la especificidad inhibitora de los inhibidores de hK14, los solicitantes investigaron la reacción de las variantes purificadas con un amplio panel de proteinasas. En primer lugar, se examinaron proteinasas con amplias especificidades, incluyendo la tripsina, quimiotripsina, caliceína plasmática, elastasa de neutrófilo humano y trombina. Adicionalmente, los solicitantes evaluaron la especificidad de los inhibidores de hK14 contra enzimas que pertenecían a la misma familia de proteasas, es decir hK2, hK3, hK5, hK6, hK8 y hK13 (Tabla XI). Después de 30 minutos de incubación de hK14 con un exceso de inhibidores ($[I]_0/[E]_0$ de 50:1), no se detectó actividad residual con todas las serpinas modificadas y rAATs. En estas condiciones, únicamente rACTs mostró una actividad inhibitora débil contra hK14, solo con un 17 % de inhibición. Las serpinas modificadas con el sustrato E8 mostraron una especificidad moderada ya que diversas otras enzimas se inhibieron con estos inhibidores. Se observó una especificidad muy alta con AAT_{G9} y ACT_{G9} y ninguna de las enzimas ensayadas se inhibió, excepto para quimiotripsina y a un grado más bajo para hK5.

TABLA XI

Proteasa	AAT _{ts}	AAT _{E8}	AAT _{G9}	ACT _{ts}	ACT _{E8}	ACT _{G9}
hK14	100	100	100	17	100	100
Tripsina	100	100	0	0	100	0
Chtr	100	19	100	100	14	100
PK	17	100	0	46	36	0
HNE	100	0	0	16	0	0
Trombina	4	0	0	18	0	0
hK2	0	19	0	0	100	0
hK3	0	0	0	100	0	0
hK4	na	na	na	na	100	0
hK5	28	100	30	7	100	0
hK6	33	100	0	24	72	0
hK8	0	36	0	0	34	0
hK13	0	30	0	0	0	0

Especificidad inhibitoria de inhibidores de hK14. Porcentaje de inhibición correspondiente a $100 \times [1 - (\text{velocidad en presencia de inhibidor} / \text{velocidad de control no inhibido})]$. Reacción de 30 min. de incubación con exceso de inhibidores ($[I]_0/[E]_0$ de 50:1).

Ejemplo 3:

5 Producción y purificación de hK14 activo

La calicreína 14 humana se produjo y purificó como se ha descrito anteriormente. Selección de péptidos sustrato para hK14 usando tecnología de presentación en fagos. La fagoteca de sustrato se exploró frente a hK14 para seleccionar sustratos hidrolizados por su actividad hidrolítica. Los fagos escindidos se amplificaron en células TG1 de *E. coli* y después se sometieron a cinco rondas más de digestión enzimática y cribado. La cantidad de fagos liberados aumentó con cada ronda, verificando de este modo un número más elevado de fagos susceptibles a hK14 después de cada ronda de selección. Las secuencias de aminoácidos de 32 péptidos de fago de la última ronda de selección se determinaron secuenciando y las secuencias obtenidas correspondientes a las regiones sustrato se indican en la Tabla 8. De todos los péptidos seleccionados y escindidos, un 69 % posee al menos un resto básico en la posición P1, como se esperaba con la supuesta actividad similar a tripsina de hK14, mientras que un 31 % de los péptidos tenía un resto de tirosina específico en la enzima similar a quimotripsina en P1.

Caracterización cinética de la hidrólisis de sustrato mediante hK14.

Para verificar que las secuencias del análisis de presentación en fagos eran verdaderos sustratos para hK14 y para identificar el sitio de escisión, todos los péptidos seleccionados se construyeron en forma de sustrato fluorescente. Todos los sustratos se hidrolizaron con hK14 con nivel de eficacia variable y k_{cat}/K_m varió de 2.000 a 481.000 $M^{-1}s^{-1}$. La especificidad de escisión se demostró mediante CFP-GGGGG-YFP que no se hidrolizó con hK14.

Los resultados indican claramente que el aminoácido P1 preferido para susceptibilidad de hK14 es Arg (Tabla XIII) dado que todos los mejores sustratos hK14 con k_{cat}/K_m superior a 200.000 $M^{-1}s^{-1}$ poseen una Arg en la posición P1. Cabe destacar que, los cuatro péptidos escindidos de un modo más eficaz por hK14, dos contenían Glu en la posición P2. Por otro lado, se produjo una amplia variedad de aminoácidos en la posición P1 demostrando preferencia no significativa en esa posición. Sin embargo, dos sustratos poseen un ácido aspártico en la posición P'1 y se escinden de un modo relativamente eficaz. Por otro lado, todos los sustratos con una Lys en la posición P1 se escindieron a una velocidad muy baja con una K_{cat}/K_m por debajo de 34.000 $M^{-1}s^{-1}$. De manera similar, la velocidad de escisión para el sustrato con una tirosina P1 era muy baja excepto un sustrato, el péptido G9, que tuvo un valor de K_{cat}/K_m de 134.000 $M^{-1}s^{-1}$. Con la excepción de la posición P'1, en la que el resto de glicina se recupera en casi el 50 % de los sustratos de lisina o tirosina en P1, ningún aminoácido particular se recuperó más frecuentemente en otras posiciones.

Dado que muchos de los sustratos seleccionados contenían algunos motivos susceptibles a escindir por otras proteasas, los solicitantes midieron el grado al cual la hK2, calicreína plasmática, PSA, quimotripsina, tripsina y elastasa podían escindir estos sustratos hK14 (Tabla XII). Cada sustrato se ensayó a una concentración enzimática dando una escisión específica en el enlazador de sustrato.

De manera no sorprendente, la mayoría de los sustratos similares a tripsina se escindieron por tripsina con una eficacia variable que no estaba estrictamente en consonancia con las preferencias de hK14. Por ejemplo, los dos pentapéptidos, VGSLR y RQTND, eran los mejores sustratos para hK14 pero no se escindieron de manera muy eficaz con tripsina en comparación con otros péptidos como el péptido LSGGR, dando un valor K_{cat}/K_m de casi 5.000.000 $M^{-1}s^{-1}$ con tripsina. En cambio, los péptidos que poseían una Gln en la posición P2 eran mejores sustratos tanto para hK14 así como para tripsina. Únicamente dos sustratos para hK14, RVTST y VVMKD, con la excepción de los sustratos similares a quimotripsina, no se escindían con tripsina.

Los sustratos similares a quimotripsina se escindieron con quimotripsina de un modo más eficaz que con hK14 exceptuando el sustrato TVDYA que dio casi el mismo valor K_{cat}/K_m con hK14, quimotripsina y elastasa. Esta última

enzima también proteolizó los dos péptidos seleccionados, YQSLN, que también se escindió débilmente con PSA, y TSYLN.

Los sustratos seleccionados presentaron una alta selectividad por hK14 en comparación con otras calicreínas humanas tales como kH1, kH2, PSA y PK. Únicamente la kH2 proteolizó la mayoría de los sustratos similares a tripsina con valores k_{cat}/K_m siempre al menos 5 veces inferiores en comparación con hK14. Por ejemplo, el péptido NQRSS es 27 y 78 veces más selectivo por hK14 que por hK2 y PK, respectivamente.

5

TABLA XII

Especificidad de sustratos seleccionados preferidos		
Clon	Secuencia	k_{cat}/K_m ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
G1	VGSLR	481.000
C11	RQTND	415.000
E5	NQRSS	388.000
E8	LQRAI	367.000
F11	QRLRD	307.000
F3	PDRHM	243.000
E2	LSGGR	207.000
G9	TVDYA	134.000
E7	LSRDN	127.000
D9	RGKTN	80.000
E9	NNKLR	74.000
E6	MQVKH	34.000
E4	TTDLR	27.000
E12	RVTST	26.000
E1	AYGYK	24.000
G3	STKGI	20.000
F5	KLKET	19.000
F6	VGLYD	18.000
E10	VVMKD	15.000
D11	RVDTG	15.000
F7	GHRIN	12.000
F10	YQSLN	12.000
C5	SDKVY	9.000
G11	HETLK	9.000
D7	TSYLN	9.000
F4	MQATK	8.000
G7	EAPAK	8.000
F12	PVHLY	7.000
F1	QPNGY	6.000
G5	AYGLA	6.000
C9	YQNSS	6.000
E11	SAVRP	5.000

Comparación de valores de constante de especificidad (k_{cat}/K_m) de sustratos CFP-X5-YFP basándose en sustratos seleccionados para hK14. (Las posiciones P1 de enlaces escindibles se indican en negrita).

10

TABLA XIII

Especificidad de sustratos de hK14 seleccionados en fagos hacia diferentes proteasas humanas

Péptido	Secuencia hK14	Tripsina	Quimotripsina	Elastasa	Calicreína hK1	hK2	PSA plasmática
Sustrato similar a tripsina							
		k_{cat}/K_m ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)					
G1	VGSLR	481.000	270.000	145.000	-	-	21.000 -
C11	RQTND	415.000	260.000	251.000	-	-	23.000 -
E5	NQRSS	388.000	2.070.000	-	-	5.000	14.000 -
E8	LQRAI	367.000	2.270.000	-	209.000	5.000	25.000 -
F11	QRLRD	307.000	1.420.000	168.000	-	-	E.B. 32.000 -
F3	PDRHM	243.000	319'000	192.000	-	-	- -
E2	LSGGR	207.000	4.676.000	83.000	-	-	14.000 -
E7	LSRDN	127.000	246.000	155.000	-	-	16.000 -
D9	RGKTN	80.000	2.111.000	94'000	-	-	21.000 -
E9	NNKLR	74.000	384.000	77.000	-	-	12.000 -
E12	RVTST	26.000	-	100.000	200.000	-	- -
E10	VVMKD	15.000	-	-	65.000	-	- -

Péptido	Secuencia hK14	Tripsina	Quimotripsina	Elastasa	Caliceína hK1 plasmática	hK2	PSA
Sustrato de tipo quimotripsina							
		$k_{cat}/K_m (M^{-1}.s^{-1})$					
G9	TVDYA	134.000	-	145.000	181.000	-	-
E1	AYGYK	24.000	129.000	618.000	-	-	-
F6	VGLYD	18.000	-	409.000	-	-	-
F10	YQSLN	12.000	-	134.000	49.000	-	E.B.
D7	TSYLN	9.000	-	266.000	90.000	-	-
						"	
E.B.: escisión baja, kcat/Km no determinada; - escisión no detectable							

Este estudio identificó dos clases de sustratos peptapéptídicos para hK14: sustratos similares a tripsina y similares a quimotripsina. Sin embargo, los solicitantes mostraron que la hK14 tenía especificidad de escisión similar a tripsina en lugar de similar a quimotripsina a pesar de la selección de diversos sustratos que contenían diversos restos aromáticos. Los sustratos con los valores Kcat/Km más altos tienen una arginina en la posición P1 lo que indica una preferencia por este aminoácido (Tabla XIV). Por otro lado, la lisina parece ser menos adecuada que la tirosina en la posición P1. Si los dos aminoácidos están presentes en el mismo péptido, hK14 escinde después del resto de tirosina. Además, uno de los sustratos similares a quimotripsina, TVDYA, dio un valor cinético significativamente más alto, $134.000 M^{-1}.s^{-1}$, en comparación con todos los sustratos P1 de lisina, con valores Kcat/km no mayores de $34.000 M^{-1}.s^{-1}$. No se observó selectividad de hK14 para la posición P1', en la que diferentes tipos de aminoácidos, tales como restos pequeños y no cargados, hidrófobos, con carga positiva o negativa, se habían recuperado en los mejores sustratos. El análisis de otras posiciones circundantes demostró que hK14 puede tener cabida en una gran variedad de aminoácidos. Esta observación no significa que hK14 tenga un gran espectro de actividades como tripsina o quimotripsina, sino que demuestra una capacidad para escindir diferentes secuencias dependiendo del contexto.

La actividad de hK14 similar a quimotripsina, incluso si esta es inferior a su actividad similar a tripsina, es interesante. Que sepan los solicitantes, excepto para el ligamiento Phe-Phe escindido con hK1 en calistatina y en algunos péptidos derivados, esta es la primera caliceína humana descrita con una doble actividad. La conformación del bolsillo de especificidad en **hK14** por tanto debe acomodarse a cadenas laterales de aminoácidos tanto aromáticos como básicos en el sustrato en la posición P1, para explicar la doble actividad similar a quimotripsina y a tripsina de hK14.

Desarrollo de inhibidores específicos de hK14

Se realizaron modificaciones del BSR de la $\alpha 1$ -antiquimotripsina (ACT) y de la $\alpha 1$ -antitripsina (AT o AAT) para cambiar la especificidad de este inhibidor. Después, sustratos seleccionados (G1, C11, E5, E8, F3, F11, G9) se trasplantaron en el bucle de sitio reactivo de las serpinas para generar nuevas variantes, con capacidad de inhibir la caliceína humana hK14. Usando secuencias a partir de los péptidos G1 y C11 se construyó más de una variante de inhibidor.

TABLA XIV

Alineamiento de la región BSR (bucle de serpina reactivo) de la serpina $\alpha 1$ -antiquimotripsina (ACT) recombinante y sus variantes.

Serpina	Péptido sustrato seleccionado ^a	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5
ACT _{TS}		V	K	I	T	L	<u>L</u> *	S	A	L	V	V
ACT _{G1}	vGSLR	V	K	<u>G</u>	<u>S</u>	L	<u>R</u> *	s	A	L	V	V
ACT _{G1g}	vGSLRG	V	K	<u>G</u>	<u>S</u>	L	<u>R</u> *	<u>G</u>	A	L	V	V
ACT _{G1V}	VGSLR	V	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>s</u>	L	<u>R</u> *	S	A	L	V	E
ACT _{C11}	RQTNd	V	K	I	T	L	<u>R</u> *	<u>Q</u>	T	<u>N</u>	V	V
ACT _{C11g}	gRQTNd	V	K	I	T	<u>G</u>	<u>R</u> *	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	V	V
ACT _{C11D}	gRQTND	V	K	I	T	L	<u>R</u> *	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	V
ACT _{E5}	NQRSS	V	K	I	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>R</u> *	S	<u>S</u>	L	V	V
ACT _{E8}	LQRAI	V	K	I	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>R</u> *	<u>A</u>	I	L	V	V
ACT _{F11}	QRLRD	V	K	<u>Q</u>	<u>R</u>	L	<u>R</u> *	<u>D</u>	A	L	V	V
ACT _{F3}	PDRHM	V	K	I	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>R</u> *	<u>H</u>	<u>M</u>	L	V	V
ACT _{G9}	TVDYA	V	K	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>Y</u> *	<u>A</u>	A	L	V	V

^a Péptidos sustrato seleccionados por caliceína hK14 usando una biblioteca pentapeptídica aleatoria presentada en fagos. Los restos normales son comunes para rACT_{ts}, los restos subrayados corresponden a péptidos sustrato relocalizados en BSR de variantes de ACT. El enlace escindible por hK14 en los péptidos sustrato se indica en negrita y el supuesto sitio de escisión en las serpinas se marca con asterisco entre los restos P1-P1'.

TABLA XV

Alineamiento de la región BSR (bucle de serpiente reactiva) de la serpiente alfa-1-antitripsina (AAT) recombinante y sus variantes.

Serpina	Péptido sustrato seleccionado ^a	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5
ACT _{TS}		L	E	A	I	P	M*	S	I	P	P	E
ACT _{G1}	VGSLR	L	E	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>R*</u>	S	I	P	P	E
ACT _{G1g}	VGSLRG	L	E	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>R*</u>	<u>G</u>	I	P	P	E
ACT _{G1V}	VGSLR	L	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>R*</u>	<u>S</u>	I	P	P	E
ACT _{C11}	RQTND	L	<u>E</u>	A	I	P	<u>R*</u>	Q	<u>T</u>	<u>N</u>	P	E
ACT _{C11g}	gRQTND	L	E	A	I	<u>G</u>	<u>R*</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>N</u>	P	E
ACT _{E5}	NQRSS	L	E	A	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>R*</u>	S	<u>S</u>	P	P	E
ACT _{E8}	LQRAI	L	E	A	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>R*</u>	<u>A</u>	I	P	P	E
ACT _{F11}	QRLRD	L	E	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>R*</u>	<u>D</u>	I	P	P	E
ACT _{F3}	PDRHM	L	E	A	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>R*</u>	<u>H</u>	<u>M</u>	P	P	E
ACT _{G9}	TVDYA	L	E	T	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>Y*</u>	<u>A</u>	I	P	P	E

^a Péptidos sustrato seleccionados por calicreína hK14 usando una biblioteca pentapeptídica aleatoria presentada en fagos. Los restos normales son comunes para rACT_{TS}, los restos subrayados corresponden a péptidos sustrato relocalizados en BSR de variantes de ACT. El enlace escindible por hK14 en los péptidos sustrato se indica en negrita y el supuesto sitio de escisión en las serpinas se marca con asterisco entre los restos P1-P1'.

- 5 La determinación de la estequiometría de inhibición (EI) y de la velocidad de reacción inhibitoria (ka) se realizó en condiciones fisiológicas a pH y fuerza iónica para garantizar una comparación más relevante. Casi todas las variantes recién construidas de ACT mostraron valores EI más bajos con hK14 que con ACT de tipo silvestre. De estas variantes, rACT_{C11}, rACT_{C11D}, rACT_{G9} y rACT_{E8} tuvieron los valores de inhibición de estequiometría más bajos para hK14 (4,8, 2,8, 1,5 y 1,2 respectivamente) y las constantes de asociación más altas (65000, 74000, 75000 y 575000 M⁻¹s⁻¹ respectivamente). Contraria a la ACT, la serpiente AATs es un buen inhibidor para hK14 con una constante de asociación de 263.000 M⁻¹s⁻¹. Todas las variantes de AAT tuvieron una constante de asociación más baja en comparación con AATs, pero algunas de ellas incluso reaccionaron a alta velocidad con hK14, como AAT_{G1}, AAT_{G9}, AAT_{E8}, AAT_{G1g} y AAT_{C11} exhibiendo una ka de 168.000, 217.000, 242.000, 257.000 y 63.000 M⁻¹s⁻¹ respectivamente. Solo dos variantes de AT no inhibieron hK14.

TABLA XVI

Comparación de valores de estequiometría de inhibición y constantes de velocidad (ka) de segundo orden para la reacción de variantes de ACT con hK14.

Clon	Péptido sustrato seleccionado ^a	EI	Ka M ⁻¹ S ⁻¹
ACT _{TS}		-	-
ACT _{G1}	VGSLR↓	13,3	3 200*
ACT _{G1g}	VGSLR↓G	-	-
ACT _{G1V}	VGSLR↓	11,7	22 000*
ACT _{C11}	R↓QTNd	4,8	65 000*
ACT _{C11g}	gR↓QTNd	13,8	7 600*
ACT _{C11D}	gR↓QTND	2,8	74 000*
ACT _{E5}	NQR↓SS	-	-
ACT _{E8}	LQR↓AI	1,2	575 000
ACT _{F11}	QRLR↓D	-	-
ACT _{F3}	PDR↓HM	-	-
ACT _{G9}	TVDY↓A	1,5	74 000

*Cálculos basados en las condiciones de reacción en las que [I₀] / [E₀] < 5*IE

- 20 TABLA XVII
Comparación de valores de estequiometría de inhibición y constantes de velocidad (ka) de segundo orden para la reacción de variantes de AT con hK14.

Clon	Péptido sustrato seleccionado ^a	EI	Ka M ⁻¹ S ⁻¹
AAT _{TS}		1,0	263 000
AAT _{G1}	VGSLR↓	3,6	168 00*
AAT _{G1g}	VGSLR↓G	2,3	257 000*
AAT _{G1V}	VGSLR↓	-	-
AAT _{C11}	R↓QTNd	2,8	63 000*
AAT _{C11g}	gR↓QTNd	9	42 000*

Clon	Péptido sustrato seleccionado ^a	EI	$K_a M^{-1}S^{-1}$
AAT _{E5}	NQR↓SS	10	28 000*
AAT _{E8}	LQR↓AI	7,4	242 000*
AAT _{F11}	QRLR↓D	-	-
AAT _{F3}	PDR↓HM	11,7	13 000*
AAT _{G9}	TVDY↓A	1,2	217 000

*Cálculos basados en las condiciones de reacción en las que $[I]_0/[E]_0 < 5 \cdot I_E$

Se exploró un panel de enzimas que incluía tripsina, elastasa de neutrófilo humano, quimotripsina, calicreína plasmática (PK), uroquinasa (uPA) y trombina para determinar la especificidad inhibitora de variantes de ACT y AAT con una IE para hK14 inferior a 10 (Tabla XVIII). Cuando se incubó durante 30 min con un exceso de inhibidor ($[I]_0/[E]_0$ de 50:1), la hK14 se inhibió por completo (100 %). En esta condición, la ACT de tipo silvestre mostró solo una actividad de inhibición del 17 % frente a hK14 contraria a AATs (100 % de inhibición). Entre las variantes de ACT, dos (rACT_{C11} y rACT_{C11D}) mostraron especificidad por hK14, no inhibiendo a ninguna otra enzima ensayada aparte de la tripsina y quimotripsina. Para las variantes de AAT, estos nuevos inhibidores mostraron claramente una especificidad más elevada hacia hK14 que hacia AATs. AAT_{G9} demostró ser altamente específica para hK14, no mostrando reactividad con ninguna proteasa similar a tripsina.

TABLA XVIII

Proteasa	Perfil inhibitor de ACT _{TS} , AAT _{TS} y sus variantes									
	ACT _{C11}	ACT _{C11D}	ACT _{E8}	ACT _{TS}	AAT _{G1}	AAT _{G1g}	AAT _{C11}	AAT _{E8}	AAT _{G9}	AAT _{TS}
	% de inhibición									
HK14	100	100	100	17	100	100	100	100	100	100
Tripsina	100	100	100	0	100	100	100	100	0	100
Chtr	84	83	14	100	27	17	18	19	100	100
PK	0	0	36	46	100	100	8	100	0	17
HNE	0	0	0	26	0	0	0	0	0	100
Uroquinasa	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0
Trombina	0	0	0	18	51	0	100	0	0	4

^a Las serpinas y las proteasas se incubaron durante 30 min a 37 °C a una proporción $[I]_0/[E]_0$ de 50:1. El porcentaje de inhibición corresponde a $100 \times (1 - (\text{velocidad en presencia de inhibidor} / \text{velocidad de control no inhibido}))$.

Se exploraron variantes adicionales de ACT que inhibían hK14 frente a un panel más grande de calicreínas de tejido relacionadas con hK14. Se observó inhibición parcial contra diferentes subconjuntos de calicreínas ensayadas.

TABLA XIX

Proteasa	ACT _{G1}	ACT _{G1g}	ACT _{C11g}	ACT _{E5}	ACT _{F11}
		% de inhibición ^a			
hK2	15	0	25	0	25
hK4	0	0	0	75	45
hK5	50	10	5	10	15
hK6	20	0	0	0	0
hK8	0	0	0	10	0

^a Las serpinas y las proteasas se incubaron durante 30 min a 37 °C (90 min a 37 °C) para PSA) a una proporción $[I]_0/[E]_0$ de 50:1. El porcentaje de inhibición corresponde a $100 \times (1 - (\text{velocidad en presencia de inhibidor} / \text{velocidad de control no inhibido}))$.

La permutación del sitio de escisión BSR por sustratos de hK14 seleccionados por presentación en fagos cambió las serpinas (ACT y AAT) de tipo silvestre en inhibidores altamente sensibles por hK14, especialmente AAT_{G9} que mostraba una reactividad única. Que sepan los solicitantes, este es el primer informe que describe el desarrollo de un inhibidor específico para hK14. El hecho de que algunos inhibidores recombinantes también inhiban otras enzimas distintas de hK14 no es sorprendente debido a la homología de sustrato entre las proteasas similares a tripsina. Además, la velocidad de reacción debe determinarse para inhibidores recombinantes contra otras enzimas.

TABLA XX

Acantosis nigricans,	Infecciones mucobacterianas	Papilomatosis confluyente y reticulada
Acné conglobata,	Balanitis circunscrita plasmocelular	Hipertrichosis congénita lanuginosa
Acné fulminante,	Plasma celular,	Nevo congénito
Acné queiloideo de la nuca,	Balanitis xerótica obliterante,	Onicodistrofia congénita del dedo índice

ES 2 604 215 T3

<p>Acné vulgar, Erupciones acneiformes, Fibroqueratoma digital adquirido,</p> <p>Fibroqueratoma digital adquirido,</p> <p>Linfoangioma progresivo adquirido Acrocordón, Acrodermatitis crónica atrófica Acrodermatitis enteropática</p>	<p>Balanopostitis, Carcinoma de células basales,</p> <p>Cirugía escisional básica</p> <p>Melanosis de Becker,</p> <p>Picaduras de chinches, Enfermedad de Behcet, Dermatitis de Berloque, Síndrome de Birt-Hogg-Dube,</p>	<p>Leucoderma congénito normalizado Nevo de tejido conectivo</p> <p>Dermatitis de contacto, (Alérgica) Dermatitis de contacto, (Alérgica) Dermatitis de contacto, (Irritativa)</p> <p>Estomatitis de contacto Callos Cosmecéuticos Cosméticos Enfermedad de Cowden (Síndrome de Harmartoma Múltiple) Infección por virus de la viruela humana Síndrome de CREST Síndrome de Cronkhite de Canadá,</p>
<p>Acrodinia Acroqueratoelastoidosis</p> <p>Acroqueratosis neoplásica, Acroqueratosis verruciforme de Hopf, Acromegalia, Acropustulosis de la infancia,</p>	<p>Talón negro (petequias del calcáneo), Mordedura de la araña viuda negra,</p> <p>Síndrome de Bloom (Eritema telangiectásico congénito),</p>	<p>Síndrome de Crouzon</p> <p>Crioterapia</p> <p>Linfoma cutáneo anaplásico de células grandes CD30+ (Ki-1) Embolismo cutáneo por colesterol, Quiste cutáneo columnar,</p>
<p>Queratosis actínica,</p> <p>Prurigo actínico,</p> <p>Púrpura actínico, Actinomicosis, Dermatosis neutrófila febril aguda, Edema hemorrágico agudo de la infancia, Enfermedad de Addison,</p>	<p>Nevo azul, Síndrome de Nevo azul gomoso</p> <p>Dermatología Botánica,</p> <p>Toxina botulínica, Fiebre botonosa</p> <p>Enfermedad de Bowen,</p> <p>Papulosis Bowenoide, Quiste de hendidura branquial,</p> <p>Bromhidrosis,</p>	<p>Crioterapia</p> <p>Linfoma cutáneo anaplásico de células grandes CD30+ (Ki-1) Embolismo cutáneo por colesterol, Quiste cutáneo columnar,</p> <p>Criptococo cutáneo</p> <p>Cerebro ectópico cutáneo,</p> <p>Cuerno cutáneo,</p> <p>Enfermedad cutánea de Kikuchi, Larva migrans cutánea, Rejuvenecimiento cutáneo con láser de dióxido de carbono, Rejuvenecimiento cutáneo con láser de erbio: YAG Manifestaciones cutáneas tras exposición a la vida marina,</p>
<p>Adiposis Dolorosa,</p>	<p>Mordedura de araña reclusa parda</p> <p>Agammaglobulinemia de Bruton,</p>	<p>Manifestaciones cutáneas de embolismo por colesterol, Manifestaciones cutáneas de hepatitis C,</p>
<p>Colgajos de avance</p>	<p>Enfermedad ampollosa por diabetes</p>	<p>Manifestaciones cutáneas de la enfermedad por VIH Manifestaciones cutáneas del tabaquismo, Melanoacantoma cutáneo Linfoma cutáneo de linfocitos T</p>
<p>Dactilosis (Ainhum)</p> <p>Albinismo</p> <p>Síndrome de Albright, Síndrome de Alezzandrini,</p>	<p>Enfermedad ampollosa por diálisis</p> <p>Pénfigo ampoloso, Quemaduras por productos químicos, Quemaduras por electricidad</p>	<p>Manifestaciones cutáneas de la enfermedad por VIH Manifestaciones cutáneas del tabaquismo, Melanoacantoma cutáneo Linfoma cutáneo de linfocitos T</p>
<p>Alopecia areata, Alopecia mucinosa,</p> <p>Amiloidosis, Liquen</p>	<p>Úlcera de Buruli Cutis calcinoso</p> <p>Úlcera de Buruli,</p>	<p>Tuberculosis cutánea Cutis Laxa (Elastolisis),</p>
<p>Amiloidosis, Macular</p>	<p>Calcifilaxis</p>	<p>Cutis marmorata telangiectatica congénita</p>

Amiloidosis, nodular localizada cutánea,	Cáncer de la mucosa bucal	Cutis verticis gyrata,
Amiloidosis primaria sistémica	Candidiasis mucocutánea crónica	Cilindroma,
Efluvio anagénico	Candidiasis cutánea,	Tumor Dabska del síndrome de Lange
Anatomía en cirugía cutánea,	Candidiasis, mucosa,	Enfermedad de Degos
Alopecia androgénica	Malformación capilar,	Delirio de parasitosis
Anetodermia	Síndrome de Carney,	Dengue,
Angina bullosa hemorrágica	Carotenemia	Estomatitis de Denture
Angioedema adquirido,	Enfermedad de Catscratch,	Dermoabrasión
Angioedema hereditario,	Celulitis,	Cargas dérmicas
Angioendoteliomatosis,	Chancro	Dermatitis artefacta
Linfoadenopatía angioinmunoblástica con disproteinemia,	Síndrome de Chediak-Higashi,	Dermatitis herpetiformis,
Angioqueratoma circunscrito	Reconstrucción de mejilla,	Dermatofibroma
Angioqueratoma de cuerpo difuso (Síndrome de Fabry)	Queilosis glandular	Dermatofibrosarcoma
Angioqueratoma del escroto,	Queilosis granulomatosa	Dermatofibrosis lenticular protuberante
Hiperplasia angiolofoide con eosinofilia,	(Síndrome de Miescher-Melkersson-Rosenthal),	(Síndrome de Buschke-Ollendorf)
	Exfoliación química	Aspectos dermatológicos de agentes por bioterrorismo,
	Mucositis bucal inducida por quimioterapia	Aspectos dermatológicos de agentes por bioterrorismo, ántrax
Angioma serpiginoso,		Manifestaciones dermatológicas de enfermedad cardíaca
Mordeduras por animales,	Hemangioma de Cherry,	Manifestaciones dermatológicas de enfermedad gastrointestinal,
Estomatitis aftosa	Varicela,	Manifestaciones dermatológicas de enfermedad hematológica,
Aplasia cutis congénita,	Síndrome de CHILD	Manifestaciones dermatológicas de enfermedad neurológica,
Hidrocistoma apocrino,	Enfermedad de VIH juvenil,	Manifestaciones dermatológicas de enfermedad pulmonar,
Arcanobacterium haemolyticum	Condrodermatitis nodular del hélix	Sitios de internet de dermatología
Argirosis	Cromohidrosis	Dermatomiositis
Queratosis arsenicales,	Cromoblastomycosis	Dermatopatía pigmentosa reticularis,
Aspergilosis,	Enfermedad granulomatosa crónica	Dermatosis papulosa nigra,
Eczema asteatósico,	Síndrome de Churg-Strauss (Granulomatosis Alérgica),	Quiste dermoide
Exantema asimétrico periflejural de la infancia	Pénfigo cicatricial,	Dermoscopia,
Ataxia-Telangiectasia,	Callo,	Tumor desmoide, Síndrome de DiGeorge
Dermatitis Atópica,	Cierre de heridas complicadas	Intértrigo
Atrofia maculosa varioliformis cutis	Callo,	Picaduras de medusa
Atrofodermia de Pasini y Pierini	Cierre de heridas complicadas	Infiltración linfocítica cutánea de Jessner
Fibroxioma atípico,	Engrosamiento de uñas,	Síndrome de Job
		Xantogranuloma juvenil (Nevoxantotelomioma)
		Sarcoma de Kaposi
		Erupción Variceliforme de Kaposi

Lunar atípico (nevo displásico)	Síndrome de Cobb,	Enfermedad de Kawasaki
Enfermedades micobacterianas atípicas,	Coccidioidomicosis,	Cicatriz hipertrófica y queloides
Avitaminosis A,	Síndrome de Cockayne,	Queratoacantoma
Paraqueratosis granular axilar,	Paniculitis Cold,	Queratosis folicular (Enfermedad de Darier)
Angiomatosis bacilar,	Milium Coloide,	Queratosis palmar y plantar
Quiste mucoso digital,	Inmunodeficiencia variable común,	Queratosis pilar
Fotografía Digital,	Deficiencia del receptor del complemento,	Enfermedad de Kimura
Poros dilatados de Winer,	Complicaciones por cirugía láser dermatológica,	Síndrome de Kindler
Foliculitis infundibular diseminada y recurrente,	Papilomatosis florida cutánea	Síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber
Síndrome de Down	Síndrome de hipoplasia dérmica focal,	Enfermedad de Knuckle Pads Kyrle
Erupciones por fármacos,	Fogo Selvagem,	Histiocitosis de células de Langerhans
Trastornos bullosos inducidos por fármacos	Tumor folicular del infundíbulo,	Revisión Láser de Cicatrices
Hiperplasia gingival inducida por fármacos	Foliculitis,	Tratamiento láser de lesiones vasculares adquiridas y congénitas
Fotosensibilidad inducida por fármacos,	Foliculoma,	Tratamiento láser de lesiones pigmentadas benignas
Pigmentación inducida por fármacos,	Reconstrucción de frente y sien	Tratamiento láser de venas de la pierna
Síndrome de pseudolinfoma inducido por fármacos	Enfermedad de Fox-Fordyce,	Depilación con láser
Contractura de Dupuytren	Ampollas por fricción,	Síndrome de Laugier-Hunziker
Eczema dishidrótico,	Congelación	Síndrome de Lawrence-Seip
Disqueratosis congénita	Síndrome de Gardner	Leiomioma
Dismorfofobia,	Telangiectasia esencial generalizada	Leishmaniosis
Reconstrucción de oreja,	Lengua geográfica	Léntigo
Carcinoma ecrino,	Síndrome de Gianotti-Crosti (Acrodermatitis papular de la infancia)	Síndrome de LEOPARD
Espiradenoma ecrino,	Condiloma acuminado gigante de Buschke y Lowenstein	Lepra
Ectima	Glomangioma	Leucemia de Cutis
Ectima gangrenoso	Síndrome de glucogonoma	Leucoplaquia bucal
Displasia ectodérmica	Enfermedad del almacenamiento de glucógeno de tipos I-VII	Piojos
Síndrome de Ehlers-Danlos,	Gonococcemia	Liquen mixedematoso
Elastofibroma,	Enfermedad de injerto contra huésped	Liquen nítido
Elastosis perforante serpiginosa	Síndrome de Graham-Little-Piccardi-Lasseur	Liquen plano
Síndrome de Elejalde,	Foliculitis gramnegativa	Liquen escleroso y atrófico
Sífilis endémica,		Liquen simple crónico
Infecciones enterovíricas,		Liquen espinuloso
Síndrome de eosinofilia-Mialgia,		Liquen estriado
Fascitis eosinófila,		Dermatosis IgA lineal
Foliculitis pustular eosinófila,		Reconstrucción de labio
Úlcera eosinófila,		Lipodistrofia,
Eférides (Pecas)		Lipodistrofia por VIH,
		Lipodistrofia localizada,
		Proteinosis lipoidea progresiva
		Lipomas

Quiste de Inclusión epidérmica, Infección Toe Web gramnegativa		Liposarcoma
Síndrome de nevo epidérmico,		Vasculopatía livedoide
Epidermodisplasia,	Granuloma anular	Lobomycosis
Epidermolísis ampollosa verruciforme		Anestesia local y regional
Epidermolísis ampollosa adquirida	Granuloma facial	Anestesia de bloqueo de nervios
Hiperqueratosis epidermolítica (eritrodermia ictiosiforme congénita ampollosa),	Granuloma gluteal de la infancia	Síndrome del cabello anágeno suelto
Épulis fisurado,	Granuloma inguinal (Donovanosis)	Lupus eritematoso, agudo
Quiste vellosa eruptivo,		Lupus eritematoso, ampollosa
Erisipeloide	Granulosis roja de la nariz	Lupus eritematoso discoide,
		Lupus eritematoso inducido por fármacos
Eritema ab igne	Síndrome de Griscelli	Lupus eritematoso, subagudo y cutáneo
	Síndrome de Haberland	Lupus miliaris disseminatus
Eritema Anular Centrífugo	Trasplante de pelo	Facies
Eritema discrómico	Trasplante de pelo: método de trasplante de unidad Folicular	Enfermedad de Lyme
	Lengua pilosa	Linfangiectasia
Perstans	Nevo melanocítico	Linfangioma
Eritema diutinum elevatum	Halogenoderma	Linfocitoma de cutis
Eritema gyratum repens	Enfermedad de mano, pie y boca	Linfogranuloma venéreo
Eritema indurado (Vasculitis nodular)		Papulosis linfomatoide
Eritema infeccioso (Enfermedad de Fifth)	Ordenadores manejados en dermatología	Síndrome de Maffucci
Eritema multiforme	Enfermedad de Hartnup	Granuloma de Majocchi
Eritema nodoso	Hemocromatosis	Malacoplaquia
Eritema tóxico Neonatal	Púrpura de Henoch-Schönlein (Purpura Anafilactoide)	Melanoma maligno
Eritrasma,	Síndrome de Hermansky-Pudlak	Mastocitosis
Eritrodermia (Dermatitis Exfoliativa Generalizada),		Hiperpigmentación post-inflamatoria
Eritroqueratodermia variabilis,	Herpes Simple	Senos preauriculares
Eritroplasia de Queyrat (enfermedad De Bowen del glande del pene),	Herpes Zoster	Tumor fibroepitelial premaligno (tumor de Pinkus)
Porfiria eritropoyética,	Hidradenitis supurativa	Evaluación y control preoperatorio
Protoporfiria eritropoyética, Esencial de	Hirsutismo	Mixedema pretibial
movimiento tisular,	Homocistinuria	Tumor pilar proliferante
Eumicetona (micetoma fúngico)	Mordeduras humanas,	Síndrome de desgaste proteico y malnutrición
	Herpesvirus 6 Humano	Prototecosis cutánea
Fotoféresis extracorpórea,	Progeria de Hutchinson-Gilford	Prurigo nodular
Enfermedad de Paget extramamaria,	Hidroa vaciniforme	Pápulas y placas urticarianas pruriginosas del embarazo
	Síndrome hipereosinofílico	Prurito y enfermedad sistémica
Pénfigo benigno familiar (enfermedad de Hailey-Hailey),	Hiperhidrosis	Sarcoma pseudo-Kaposi
Síndrome de Favre-Racouchot (elastosis nodular con quistes y comedones),	Hiperqueratosis lenticularis pertans (enfermedad de Flegel)	(Acroangiodermatitis)
	Hiperqueratosis del pezón y de la areola	Pseudoatrofodermia Colli
		Pseudoquiste auricular,

Tiña fávica (Favus), Fibrodisplasia Osificante, Pápula fibrosa de la cara, Filariasis, Mordeduras de hormigas de fuego, Lengua fisurada, Materiales para el cierre de heridas Sarampión, Rubeola Neuroectoderma melanótico	Hipersensibilidad por vasculitis (Vasculitis leucocitoclástica) Hipnosis: Aplicaciones en dermatología y cirugía dermatológica Hipomelanosis de Ito	Pseudofoliculitis de la barba, Pseudolinfoma, cutáneo Foliculitis por pseudomonas Pseudopelade de Brocq, Pseudoporfiria,
Tumor de la infancia Melasma Meningococemia Enfermedad de Menkes de cabello enortijado Carcinoma de células de Merkel Carcinoma metastásico de la piel Neoplasmas metastásicos de la cavidad bucal Carcinoma anexial microquístico Carcinoma anexial microquístico Milia Miliaria Nódulos de Milker Enfermedad del Tejido conectivo mixto Cirugía micrográfica de Mohs Cremas hidratantes Molusco contagioso	Ictiosis fetal Ictiosis vulgar, Ictiosis hereditaria y adquirida, Ictiosis lamelar, Reacción Id ligada al cromosoma X (Autoeccematización) Hipomelanosis guttata idiopática	Pseudoxantoma elástico Soriasis en gotas Onicosoriasis Soriasis en placa Soriasis pustular Artritis soriásica Pólipo pulpar Biopsia de punzón y biopsia de escalpelo Pioderma gangrenoso
Enfermedad de Mondor Mancha mongólica Moniletrix Viruela del mono (Monkeypox) Morfea Mucocele y ránula Mucopolisacaridosis Tipos I-VII Quiste mucoso Quiste mucoso Líneas de Muehrcke de las uñas de las manos Síndrome de Muir-Torre Reticulohistiocitosis multicéntrica Angiohistiocitoma de células multinucleadas Neoplasia endocrina múltiple Micetoma de tipo 1 Infección intracelular por <i>Mycobacterium avium</i> Infección de la piel por <i>Mycobacterium marinum</i>	Impétigo Incontinencia pigmentaria Fibromatosis digital infantil Hemangioma infantil Mordeduras de insecto Repelentes de insecto Teledermatología interactiva Examen bucal Fibromas bucales y Fibromatosis Papilomatosis florida bucal Hiperqueratosis friccional bucal Tumores de células granulares bucales Hemangiomas bucales Liquen plano bucal Linfangiomas bucales Melanoma maligno bucal Manifestaciones bucales de enfermedades ampollasas autoinmunitarias Manifestaciones bucales de reacciones farmacológicas Manifestaciones bucales de enfermedades sistémicas Melanoacantoma bucal Neurofibroma bucal Nevo bucal	Granuloma piogénico (Hemangioma lóbulo capilar) Artritis reactiva Colagenosis perforante reactiva Enfermedad de Refsum Policondritis recidivante Anomalía pigmentada reticulada Rinoscleroma Melanosis de Riehl Fiebre maculosa de las Montañas Rocosas Rosácea Roséola infantil Colgajos de rotación Síndrome de Rothmund-Thomson Rubeola Síndrome de Rubinstein-Taybi Síndrome de Rud Sarcoidosis Sarna Reconstrucción del cuero cabelludo Revisión de cicatrices Fiebre escarlata Síndrome de Schnitzler Escleredema Escleredema neonatal Tifus de la maleza Escorbuto

Síndrome de Naegell-Franceschetti-Jadassohn	Granuloma piogénico bucal	Erupción del bañista
Productos cosméticos para uñas	Fibrosis submucosa bucal	Adenoma sebáceo
Cirugía de uñas	Virus Orf	Carcinoma sebáceo
Síndrome de uña-rótula	Síndrome de Osler-Weber-Rendu	Hiperplasia sebácea
Reconstrucción nasal	Osteoma cutis	Dermatitis seborreica
Quiste del conducto nasopalatino	Conjunto quirúrgico ambulatorio	Queratosis seborreica
	Paquidermoperiostosis	Inmunodeficiencia combinada grave
	Paquioniquia congénita	Signo de Leser-Trélat
Necrobiosis lipóidica	Enfermedad de Paget,	Síndrome de Sjogren
Eritema acral necrolítico	Urticaria papular mamaria	Síndrome de Sjogren-Larsson
	Tubercúlida papulonecrótica	Geles y champús
Fascitis necrotizante	Enfermedades paraneoplásicas	Injerto de piel
Sialometaplasia necrotizante	Parasoriasis	Agentes blanqueantes y despigmentantes cutáneos
Lupus eritematoso neonatal		Viruela
Dermopatía fibrosante nefrogénica	Paroniquia	Colgajos de transposición
	Pápulas perladas del pene	
	Colgajos pediculares/de interpolación	Úlceras traumáticas
Neurilemoma	Pelagra	Triquilemona
Neurofibromatosis	Penfigoide gestacional	Tricoepitelioma
Excoriaciones neuróticas	Pénfigo eritematoso	Tricofoliculoma
Hidradenitis ecrina neutrófila	Pénfigo foliáceo	Tricomiosis axilar
Nevus de Ota e Ito	Pénfigo herpetiforme	Tricomiosis púbica
Nevus melanocítico,	Pénfigo vulgar	Trichorrhexis Invaginata (Síndrome de Netherton o piel de bambú)
Síndrome del carcinoma nevoide de células basales	Pénfigo,	Trichorrhexis Nodosa
Nevus anémico	Pénfigo inducido por fármacos,	Tricostasis espinulosa
Nevus aracniforme (Nevus araña)	Pénfigo IgA,	Tricotilomanía
Nevus comedoniano	Carcinoma de células escamosas paraneoplásicas de pene	Esclerosis tuberosa
Nevus sebáceo	Foliculitis perforante	Angioma en penacho
Estomatitis por nicotina	Perifoliculitis capitis,	Foliculitis en penacho
Enfermedad de Niemann-Pick		Liposucción tumescente
Síndrome de rotura de Nijmegen	Dermatitis peribucal, abscesos y sufodios,	Tungiasis
	Granuloma periférico de células gigantes	Uleritema
Nocardiosis	Sabañones	Telangiectasia nevoide Unilateral
Restauración no ablativa		
Infecciones fúngicas no por candida de la boca	Enfermedad de Peyronie	Urticaria
Técnicas de depilación no láser	Fenilcetonuria	Melanosis pustular neonatal transitoria aguda
Dermatitis numular	Terapia fotodinámica del dermatólogo	Tiña corporal
Ocronosis		Tiña crural
Oncocercosis (ceguera de los ríos)	Fitofotodermatitis	Tiña facial
Onicólisis	Piebaldismo	Tiña negra
Onicomiosis	Piedra	Tiña del pie (pie de atleta)
Biopsia bucal por cepillado con análisis		
asistido por ordenador	Pápulas piezogénicas podales	Tiña versicolor

ES 2 604 215 T3

Fistulas orocutáneas	Dermatitis purpúrica pigmentada	Decoloración de los dientes
Lesiones por tabaco sin humo	Quiste tricolémico Pilomatricoma	Síndrome de choque tóxico Alopecia por tracción
Melanosis del fumador		
Blastomicosis sudamericana	Queratolitis de Pitted	Dermatosis acantolítica transitoria
Nevus lentiginoso moteado	Pitiriasis alba	
Nevus de Spitz		
Esporotricosis	Pitiriasis liquenoide	
Carcinoma de células escamosas	Pitiriasis rosada	
Síndrome de la piel escaldada por estafilococos	Pitiriasis rotunda Pitiriasis Rubra Pilaris Foliculitis Ptirosporum Fibromatosis Plantar Síndrome de POEMS	
Dermatitis por estasis	Poiquilodermia de Civatte	
Esteatocistoma múltiple	Erupción polimorfa lumínica	
Síndrome de Stevens-Johnson y necrólisis epidérmica tóxica	Poroqueratosis	
Síndrome de Stewart-Treves	Poroma	
Teledermatología de almacenamiento y retransmisión	Porfiria cutánea tarda	
Estrías distensas	Urticaria,	
Estrongiloidiasis	Urticaria colinérgica,	
Estucoqueratosis	Urticaria crónica, Síndrome de urticaria de contacto,	
Paniculitis migratoria nodular subaguda (enfermedad de Vilanova)	Dermografismo,	
Dermatosis pustulosa subcórnea	Urticaria por presión,	
Necrosis de la grasa subcutánea del recién nacido	Vasculitis urticarial solar	
Protectores solares y fotoprotección		
Dígito supernumerario	Tratamiento de vena varicosa con terapia láser endovenosa Venas varicosas y arañas vasculares	
Mamas supernumerarias		
Complicaciones quirúrgicas		
Apósitos quirúrgicos	Venas varicosas tratadas con feblectomía ambulatoria	
Técnicas de sutura	Venas varicosas tratadas con terapia de ablación por radiofrecuencia	
Sífilis	Porfiria variegata Insuficiencia venosa	
Siringoma	Laguna venosa	
Esclerosis sistémica	Xantoma verruciforme	
Hemangioma hemosiderótico targetoide	Carcinoma verrucoso	
Láseres para tatuajes	Eccema palmoplantar vesicular Infección por <i>Vibrio vulnificus</i>	
Reacciones a tatuajes	Fiebres hemorrágicas por virus	
Teledermatología	Infecciones bucales por virus	
Efluviotelogénico	Vitíligo	

Arteritis Temporal (células gigantes)	Síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada
El papel de los antibióticos en la cirugía cutánea	Síndrome de Vohwinkel Síndrome de Waardenburg
El papel de la biopsia de ganglio centinela en cáncer de piel	Verrugas,
Quemaduras por calor	Verrugas genitales, Disqueratoma verrugoso no genital
Quemaduras térmicas	Granulomatosis de Wegener
Tromboflebitis	Síndrome de Wells
Tiña de la barba	(Celulitis eosinofílica)
Tiña de la cabeza	Síndrome de Werner Síndrome de Winchester Síndrome de Wiskott-Aldrich Xantomas Xeroderma pigmentoso Mal de pinto (pian)

Ejemplo 4:

5 En un modelo de ratón de síndrome de Netherton, se ensayó un posible efecto terapéutico de MDPK67b (rACT_{6,7}) en enfermedades de la piel como una aplicación tópica.

Diseño del ensayo

10 La molécula se formuló a 2 mg/ml en natrosol 2% (p/v). La formulación se seleccionó siguiendo los criterios de difusión *in vitro* que conservan la propiedad de inhibición de MDPK67b sobre la tripsina (sustrato sustituido *in vitro*). La MDPK67b 2 mg/ml, preparada como una solución, se formuló en natrosol 2% (p/v), PBS1X pH 7,4 a 4 °C con una suave agitación para impedir la cizalladura de la molécula. La preparación se homogeneizó cuidadosamente con agitación a 4 °C para garantizar un reparto adecuado de inhibidor dentro del hidrogel. El natrosol ha de añadirse como un polvo a la solución de MDPK67b para evitar grumos y para obtener una formulación homogénea sin cizalladuras.

15 Para mantener la esterilidad, las soluciones se esterilizaron en autoclave o se filtraron a través de un filtro de 0,22 u. La formulación de MDPK67b 2 mg/ml/hidroxietilcelulosa contenía MDPK67b 4 mg, PBS1x 2 ml, pH 7,4 y natrosol 0,04 g. La formulación se conservó después a 4 °C o se liofilizó durante una noche y se conservó a -20 °C. Las propiedades de inhibición de proteasa de MDPK67b se ensayaron *in vitro* después de la formulación antes de su uso *in vivo*.

20 El posible efecto terapéutico de MDPK67b se evaluó en un grupo de 12 ratones transgénicos KLK5 con diferente gravedad del grado de lesión, comenzando desde un grado de gravedad bajo (grado 1) a un grado más grave (grado 4) (Fig. 30). El grupo 1 se había tratado una vez al día con 0,3 ml de vehículo, natrosol 2% y el grupo 2 una vez al día con 0,3 ml de MDPK67b formulada a 2 mg/ml en natrosol 2% durante 28 días. Este periodo de tiempo corresponde a dos renovaciones de la epidermis en el modelo de ratón. Los cambios del grado de lesión en los ratones se monitorizaron, así como los fenotipos del tamaño de la lesión. El tamaño de la lesión se midió cada 3 días y el grado de la lesión se monitorizó diariamente.

30 Resultados (Fig. 31)

35 La comparación del desarrollo de las lesiones de la piel en ratones transgénicos KLK5 de ratones tratados con MDPK67b frente a ratones no tratados, mostró una disminución del tamaño de las lesiones dentro del grupo tratado con MDPK67b (grupo 2) en comparación con el grupo tratado con vehículo (grupo 1). Mientras que el tamaño de las lesiones aumentó en gran parte del grupo de control tratado con vehículo, la mayor parte del grupo tratado con MDPK67b mostró una disminución en el tamaño de las lesiones.

40 Se observó un claro aumento del tamaño en 3 animales de ensayo del grupo 1 y en 1 dentro del grupo 2. Se observó un ligero aumento del tamaño de la lesión en 1 animal del grupo 2. No se indicó ningún cambio en 1 animal del grupo 1. Se observó una disminución en el tamaño de la lesión en 1 animal de ensayo del grupo 1 y en 3 dentro del grupo 2. El efecto protector parece ser mayor en ratones con síntomas de grado bajo.

Tabla XXI

Evolución del tamaño de la lesión	Grupo 1 (control)	Grupo 2 (MDPK67b)
Evolución	3	1
Evolución Ligera	0	1
Estable	1	0
Disminución	1	3

El desarrollo del grado de la lesión también se vio positivamente afectado por la aplicación tópica de MDPK67b. Un animal de ensayo tratado con MDPK67b mostró una reversión completa del fenotipo. En un segundo animal tratado con MDPK67b se observó una reversión parcial. El efecto protector parece ser mayor en ratones con síntomas de grado bajo.

- Barrett. In: Proteinase Inhibitors. Ed. Barrett, A.J. *et al*, Elsevier, Amsterdam, páginas 3-22 (1986)
- Blasi. In: Human Genes y Diseases. Ed. Blasi, F., John Wiley & Sons, Ud., páginas 377-414 (1986) Borgono *et al*. Cancer Res. 63, 9032-9041 (2003)
- Borgono *et al*. J.Biol.Chem 282(6):3640-52 (2007)
- Brattsand y Egelrud. J.Biol.Chem. 274, 30033-40 (1999)
- Brattsand *et al*. J Invest Dermatol. 124, 198-203 (2005)
- Carrell *et al*. Trends Biochem Sci. 10:20-24 (1985)
- Carrell *et al*. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 52:527-35 (1987)
- Caubet *et al*. J.Invest Dermatol. 122, 1235-1244 (2004)
- Chavanas *et al*. Nat.Genet. 25,141-142 (2000)
- Cloutier *et al*. Eur J Biochem 271, 607-613 (2004)
- Cloutier *et al*. Eur J Biochem. 269, 2747-2754 (2002)
- Cooley *et al*. Biochemistry 40, 15762-70 (2001)
- Deraison *et al*. Mol Biol Cell. 18(9): 3607-19 (2007).
- Descargues *et al*. J Invest Dermatol. 126(7): 1622-32 (2006)
- Descargues *et al*. Nat Genet. 37(1): 56-65 (2005)
- Egelrud *et al*. Br.J.Dermatol. 153, 1200-1203(2005)
- Ekholm y Egelrud. Arch Dermatol Res. 291, 195-200. (1999)
- Felber *et al*. Biol Chem. 386(3):291-8 (2005)
- Felber *et al*. Biotechniques 36, 878-885 (2004)
- Felber *et al*. FEBS J. 273(11):2505-14 (2006)
- Frenette *et al*. Biochim Biophys Acta 1334, 109-115 (1997)
- Frenette *et al*. J Urol 159, 1375-8 (1998)
- Gerard *et al*. Mol Biol Med. 2:449-457 (1986)
- Hachem *et al*. J.Invest Dermatol. 126, 1609-1621 (2006)
- Hansson *et al*. J.Biol.Chem. 269,19420-19426 (1994)
- Hansson *et al*. J.Invest Dermatol. 118, 444-449. (2002)
- Huang *et al*. Oncol Res. 14,387-397. (2004).
- Hunt y Dayhoff. Biochem Biophys Res Commun. 95(2): 864-71 (1980)
- Kapadia. Clin Chem 49, 77-86 (2003)
- Ketcham *et al*. In: Atlas of Protein Sequence y Structure. Ed. Dayhoff, páginas 131-143 (1978)
- Kishi *et al*. Clin Chem 49, 87-96 (2003)
- Kishibe *et al*. J.Biol.Chem. 282(8):5834-41 (2007)
- Komatsu *et al*. Br.J.Dermatol. 153,274-281 (2005)
- Komatsu *et al*. J.Invest Dermatol. 118,436-443. (2002)
- Komatsu *et al*. J.Invest Dermatol. 125, 1182-1189. (2005)
- Komatsu *et al*. J.Invest Dermatol. 126,2338-2342. (2006)
- Kraut *et al*. Z Physiol Chem 192: 1-21 (1930)
- Laemml. Nature 227, 680-5 (1970)
- Laskowski *et al*. Annu Rev Biochem. 49:593-626 (1980)
- Laskowski *et al*. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 545-553 (1987)
- Levin *et al*. Proc Natl Acad Sci USA. 80:6804-6808 (1983)
- Little *et al*. J Biol Chem 272, 25135-25142 (1997)
- Lowman *et al*. Biochemistry 12,10832-8 (1991)
- Luo *et al*. Clin. Chem. 47,237-246 (2001)
- Mahajan *et al*. Chem Biol 6, 401-9
- Mitra *et al*. Gene 173, 13-17 (1996)
- Mize *et al*. Mol Cancer Res. 6(6):1043-51.2008
- Morrison y Walsh. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 61, 201-301 (1988)
- Nin *et al*. J Dermatol Sci. 2008 (2008).
- Oikonopoulou *et al*. J. Biol. Chem. 281,32095-32112. (2006).
- Paine *et al*. J. Invest. Dermatol. 116, 587-595. (2001).

Papamokos *et al.* J Mol Biol. 158(3):515-37 (1982)
 Potempa *et al.* J Biol Chem. 269(23):15957-60 (1994)
 Read, R.J. *et al.*, In: Proteinase Inhibitors. Ed. Barrett, Elsevier, Amsterdam, páginas 301-336 (1986)
 5 Remold-O'Donnell. FEBS Lett. 315(2):105-8 (1993)
 Shimizu *et al.* J Biol Chem 273, 11189-11196 (1998)
 Smith y Scott. Methods Enzymol. 217, 228-57 (1993)
 Sommer *et al.* Biochemistry. 26(20):6407-10 (1987)
 Sondell *et al.* J.Invest Dermatol. 104,819- 823. (1995)
 Sprecher *et al.* J.Invest Dermatol. 117, 179-187(2001)
 10 Sprengers *et al.* Blood. 69(2):381-7 (1987)
 Stefansson *et al.* Biol.Chem. 387, 761-768 (2006)
 Stefansson *et al.* J Invest Dermatol. 128(1):18-25 (2008)
 Stump *et al.* J Biol Chem. 261(27):12759-66 (1986)
 Suzuki *et al.* J Biol Chem. 262(2):611-6 (1987)
 15 Travis *et al.* Annu Rev Biochem. 52:655-709 (1983)
 Vandell *et al.* J Neurochem. 107(3):855-70 (2008)
 Voegeli *et al.* Int. J. Cosm. Sci. 29,191-200. (2007).
 Werle. Biochem Z. 269:415-34.
 Yamasaki *et al.* LFASEB J. 20, 2068-2080. (2006)
 20 Yousef *et al.* Cancer Res 63, 3958-3965 (2003)

REIVINDICACIONES

1. Uso de un inhibidor de serina proteasa recombinante seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53, SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 55, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO 57, SEQ ID NO 58 y SEQ ID NO 59, o un fragmento biológicamente activo del mismo que tiene una actividad inhibidora de serina proteasa, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de la piel.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la serina proteasa se selecciona del grupo que comprende las enzimas calicreína, plasmina, quimotripsina (Chtr), uroquinasa (uPA), triptasa y elastasa de neutrófilo (HNE) y/o una combinación de las mismas.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la calicreína se selecciona del grupo que comprende hK2, hK3, hK4, hK5, hK6, hK7, hK8, hK9, hK10, hK11, hK12, hK23, hK14 o hK15 y/o una combinación de las mismas.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la calicreína se selecciona del grupo que comprende hK2, hK5, hK7 y hK14 y/o una combinación de las mismas.
5. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en el que la enfermedad de la piel se selecciona del grupo que comprende el síndrome de Netherton, la dermatitis atópica, la soriasis y el síndrome de descamación de la piel.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la enfermedad de la piel es el síndrome de Netherton.
7. Una composición que comprende un inhibidor de serina proteasa recombinante seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53, SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 55, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO 57, SEQ ID NO 58 y SEQ ID NO 59, o un fragmento biológicamente activo del mismo, que tiene una actividad inhibidora de serina proteasa, para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad de la piel en un mamífero que comprende su administración a dicho mamífero.
8. Una composición para el uso de la reivindicación 7, en el que la serina proteasa se selecciona del grupo que comprende las enzimas calicreína, plasmina, quimotripsina (Chtr), uroquinasa (uPA), triptasa y elastasa de neutrófilo (HNE) y/o una combinación de las mismas.
9. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la calicreína se selecciona del grupo que comprende hK2, hK3, hK4, hK5, hK6, hK7, hK8, hK9, hK10, hK11, hK12, hK13, hK14 o hK15 y/o una combinación de las mismas.
10. Una composición para el uso de la reivindicación 9, en la que la calicreína se selecciona del grupo que comprende hK2, hK5, hK7 y hK14 y/o una combinación de las mismas.
11. Una composición para el uso de la reivindicación 10, en la que la enfermedad de la piel se selecciona del grupo que comprende el síndrome de Netherton, la dermatitis atópica, la soriasis y el síndrome de descamación de la piel.
12. Una composición para el uso de la reivindicación 11, en la que la enfermedad de la piel es el síndrome de Netherton.
13. Un kit para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad de la piel que comprende una serina proteasa recombinante seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53, SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 55, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO 57, SEQ ID NO 58 y SEQ ID NO 59, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones para su uso.
14. Una composición cosmética para la mejora de una afección no deseable de la piel que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de serina proteasa recombinante seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53, SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 55, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO 57, SEQ ID NO 58 y SEQ ID NO 59, o un fragmento biológicamente activo del mismo que tiene una actividad inhibidora de serina proteasa.

15. La composición cosmética de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la serina proteasa se selecciona del grupo que comprende las enzimas calicreína, plasmina, quimotripsina (Chtr), uroquinasa (uPA), triptasa y elastasa de neutrófilo (HNE) y/o una combinación de las mismas.
- 5 16. La composición cosmética de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la calicreína se selecciona del grupo que comprende hK2, hK3, hK4, hK5, hK6, hK7, hK8, hK9, hK10, hK11, hK12, hK13, hK14 o hK15 y/o una combinación de las mismas.
- 10 17. La composición cosmética de acuerdo con la reivindicación 16, en la que la calicreína se selecciona del grupo que comprende hK2, hK5, hK7 y hK14 y/o una combinación de las mismas.
- 15 18. Uso de un inhibidor de serina proteasa recombinante seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53, SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 55, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO 57, SEQ ID NO 58 y SEQ ID NO 59, o un fragmento biológicamente activo del mismo, que tiene una actividad inhibidora de serina proteasa, en una composición cosmética para la mejora no terapéutica de una afección no deseable de la piel que afecta a la piel o al aspecto de la piel, que no se considera una enfermedad.
- 20 19. Un ensayo de detección para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad de la piel en una muestra de tejido, que comprende poner en contacto la muestra de tejido con un inhibidor de serina proteasa recombinante seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53, SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 55, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO 57, SEQ ID NO 58 y SEQ ID NO 59, y que tiene un marcador detectado, determinar y medir la cantidad de dicho marcador detectado y correlacionar esta cantidad con la presencia o ausencia de una enfermedad en dicha muestra de tejido.
- 25

FIG. 1

Cursiva: codón de inicio ATG

Negrita: Etiqueta de His

Sin subrayado: Mutación de ADN

Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

Secuencia de ADN de variantes ACT: MP 820

SEQ ID N° 1

ATG**GAGAGGATCCC**ATCACCATCACCATCACT**CTAGACACCCTAACAGCCC**ACTTGACGAGGAGA**
 ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
 GGACTTCGCTTT**CAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGT**CATCTTC
 TCCC**CACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCTGA**
 CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAAT**CACCAGAG**
 CTTCAGCACCTCCTGCGCACCC**CAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT**
 GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGG**TTCACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT**
 ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTT**CAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA**
 CTACGTGAAGAATGGA**ACTAGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTACTCGCAGACA**
 ATGATGGTCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCAAG
 ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAGTGGTAAATGGTCCCATGATGAGTTT
 GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
 TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
 CCATGCTGCTCC**CAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA**
 GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
 GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGT**CAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG**
 CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTT**GATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC**
 TGCCACCGCGGTCAA**ATCACCTCCGTTCTCGAGCAGTGGAGACCGTACCATTGTGCGTTTC**
 AACAGGCCCTTCTGATGATCATTTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
 TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA**

Secuencia de proteínas de variantes ACT: MP 820

SEQ ID N° 2

MRGS**H**H**H**H**H**H**S**R**H**P**N**S**P**L**D**E**E**N**L**T**Q**E**N**Q**D**R**G**T**H**V**D**L**G**L**A**S**A**N**V**D**F**A**F**S**L**Y**K**Q**L**V**L**K**A**P**D**K**N**V**I**F
 S**P**L**S**I**S**T**A**L**A**F**L**S**L**G**A**H**N**T**T**L**T**E**I**L**K**G**L**K**F**N**L**T**E**T**S**E**A**E**I**H**Q**S**F**Q**H**L**L**R**T**L**N**Q**S**S**D**E**L**Q**L**S**M**G**N**
 A**M**F**V**K**E**Q**L**S**L**D**R**F**T**E**D**A**K**R**L**Y**G**S**E**A**F**A**T**D**F**Q**D**S**A**A**A**K**L**I**N**D**V**K**N**G**T**R**G**K**I**T**D**L**I**K**D**L**S**Q**T**
 M**M**V**L**V**N**Y**I**F**F**K**A**K**W**E**M**P**F**D**P**Q**D**T**H**Q**S**R**F**Y**L**S**K**K**K**W**V**M**V**P**M**S**L**H**H**L**T**I**P**Y**F**R**D**E**E**L**S**C**T**V**V**E**L**K
 Y**T**G**N**A**S**A**L**F**I**L**P**D**Q**D**K**M**E**E**V**E**A**M**L**L**P**E**T**L**K**R**R**D**S**L**E**F**R**E**I**G**E**L**Y**L**P**K**F**S**I**S**R**D**Y**N**L**N**D**I**L**L**Q**L
 G**I**E**E**A**F**T**S**K**A**D**L**S**G**I**T**G**A**R**N**L**A**V**S**Q**V**V**H**K**A**V**L**D**V**F**E**E**G**T**E**A**S**A**A**T**A**V**K**I**T**L**R**S**R**A**V**E**T**R**T**I**V**R**F**
 N**R**F**L**M**I**I**V**P**T**D**T**Q**N**I**F**F**M**S**K**V**T**N**P**K**Q**A*

FIG. 2

Cursiva: codón de inicio ATG

Negrita: Etiqueta de His

Sin subrayado: Mutación de ADN

Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

Secuencia de ADN de variante ACT: MD 62

SEQ ID N° 3

ATG*GAGAGGATCCCATCACCATCACCATC***ACT**CTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGAGA
 ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
 GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
 TCCCCACTGAGCATCTCACC GCCTTGCCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
 CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
 CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
 GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
 ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
 CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
 ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
 AACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAGTGGGTAATGGTGGCCATGATGAGTTT
 GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
 TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAAG
 CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
 GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
 GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
 CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
 TGCCACCGCGGTCAAATCACCAGGAGGCTATCGATGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
 AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
 TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Secuencia de proteínas de variante ACT: MD 62

SEQ ID N° 4

MRGSHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVI F
 SPLSISTALAFLSLGAHNNTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNOSSDELQLSMGN
 AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDSQT
 MMVLVNIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTIPIYFRDEELSCTVVVELK
 YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
 GIEEFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLVDVFEEGTEASAATAVKITRRSIDVETRTIVRF
 NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 3

Cursiva: codón de inicio ATG

Negrita: Etiqueta de His

Sin subrayado: Mutación de ADN

Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

Secuencia de ADN de variante ACT: MD 83

SEQ ID N° 5

ATG***GAGAGGATCCCATCACCATCACCATC*****ACT*****CTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA***
ATCTG***ACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT***
GGACT***TCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC***
TCCCC***ACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA***
CAGAGAT***TCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG***
CTTCC***CAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT***
GCCATG***TTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGTGGACAGGTTACGGGAGGATGCCAAGAGGCTGT***
ATGGCT***CCGAGGCCTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA***
CTACGT***GAAAGATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA***
ATGATG***GTCCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG***
ATACT***CATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAGTGGGTAATGGTGGCCATGATGAGTTT***
GCATC***ACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG***
TACAC***AGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGGAAG***
CCATG***CTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA***
GCTCT***ACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG***
GGCATT***GAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG***
CAGTCT***CCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC***
TGCC***ACCGCGGTCAAAAATCAGGGGGAGATCTGAGTTAGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC***
AACAG***GCCCTTCTGATGATCATTTGCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG***
TCACCA***ATCCCAAGCAAGCCTAA***

Secuencia de proteínas de variante ACT: MD 83

SEQ ID N° 6

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVVLKAPDKNVI F
 SPLSISTALAFLSLGAHNTTLEILKGLKFNLTETSEAEIHQS FQHLLRTL NQSSDELQLSMGN
 AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAA KKLINDYVKNGRGKITDLIKDLDSQT
 MMVLVNYI FFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
 YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISR DYNLNDILLQL
 GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKIRGRSELVETRTIVRF
 NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 4

Cursiva: codón de inicio ATG

Negrita: Etiqueta de His

Sin subrayado: Mutación de ADN

Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

Secuencia de ADN de variante ACT: MD 67

SEQ ID N° 7

ATG***GAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACT****CTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGAGA*
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTCTACTTGGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCAAGCTTAGAACAACATTAGTGGAGACCGGTACCATTTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Secuencia de proteínas de variante ACT: MD 67

SEQ ID N° 8

MRGSHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
 SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNQSSDELQLSMGN
 AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNTRGKITDLIKDLDLDSQT
 MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTIIPYFRDEELSCTVVELK
 YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
 GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVKAVLDVFEEGTEASAATAVKIKLRLTLVETRTIVRF
 NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 5

Cursiva: codón de inicio ATG

Negrita: Etiqueta de His

Sin subrayado: Mutación de ADN

Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

Secuencia de ADN de variante ACT: MD 61**SEQ ID N° 9**

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGCCCTTCCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTC AACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTGGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTGACCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTCATCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCATGACAAGATCTAACGCAGTGGAGACCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Secuencia de proteínas de variante ACT: MD 61**SEQ ID N° 10**

MRGSHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFSLGHNHTLLEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNOSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPDQTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTI PYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKIMTRSNAVETRTIVRF
NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 6

Cursiva: codón de inicio ATG

Negrita: Etiqueta de His

Sin subrayado: Mutación de ADN

Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

Secuencias de ADN de variantes ACT: MD 518**SEQ ID N° 11**

ATG***GAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGAGA***
ATCTG***ACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT***
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCACCGAGCGTGTCTCGCCCGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Secuencia de proteínas de variantes ACT: MD 518**SEQ ID N° 12**

MRGSHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVI
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNGTTRGKITDLIKDLSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIIPYFRDEELSCTVVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVKAVLDVFEEGTEASAATAVKITERVSPVETRTIVRF
NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 7

Cursiva: codón de inicio ATG

Negrita: Etiqueta de His

Sin subrayado: Mutación de ADN

Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

Secuencia de ADN de variantes ACT: MDCI**SEQ ID N° 13**

ATG*GAGAGGATCCCATCACCATCACCATCAC***T**CTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGCCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATCACCAGAG
CTTCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACCGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGGCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCACCTTTAGATCTGCATTAGTGGAGACCGGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGTATGATCATTGTCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCAAGCAAGCCTAA

Secuencia de proteínas de variantes ACT: MD CI**SEQ ID N° 14**

MRGSHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNOSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPIYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVKAVLDVFEEGTEASAATAVKITFRSALVETRTIVRF
NRPFLEMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 8

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 16: SECUENCIA DE ADN DE ACT-MS: ACT-TIPO SILVESTRE (TS)

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAGTGGGTAATGGTGGCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTFTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGGTCAAAAATCACCCCTCCTTTCTGCATTAGTGGAGACCGTTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTTGCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR

SEQ ID N° 38: SECUENCIA DE PROTEÍNAS DE ACT-MS: ACT-TS

MRGSHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRRLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKITLLSALVETRTIVRF
NRPFLLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 9

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR

SEQ ID N° 17: SECUENCIA DE ADN: ACT-G1

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGCCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGGCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAAGGTTCTCTGCGTCTGCTCTGGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 39: SECUENCIA DE PROTEÍNA: ACT-G1

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR

M*R******G******S******H******H******H******H******H******S******R******H******F******N******S******P******L******D******E******E******N******L******T******Q******E******N******Q******D******R******G******T******H******V******D******L******G******L******A******S******A******N******V******D******F******A******F******S******L******Y******K******Q******L******V******L******K******A******P******D******K******N******V******I******F***
S***P******L******S******I******S******T******A******L******A******F******L******S******L******G******A******H******N******T******L******T******L******E******I******L******K******G******L******K******F******N******L******T******E******T******S******E******A******E******I******H******Q******S******F******Q******H******L******L******R******T******L******N******Q******S******S******D******E******L******Q******L******S******M******G******N***
A***M******F******V******K******E******Q******L******S******L******L******D******R******F******T******E******D******A******K******R******L******Y******G******S******E******A******F******A******T******D******F******Q******D******S******A******A******K******K******L******I******N******D******Y******V******K******N******G******T******R******G******K******I******T******D******L******I******K******D******L******S******Q******T***
M***M******V******L******V******N******Y******I******F******F******K******A******K******W******E******M******P******F******D******P******Q******D******H******Q******S******R******F******Y******L******S******K******K******K******W******M******V******P******M******S******L******H******H******L******T******I******P******Y******F******R******D******E******E******L******S******C******T******V******V******E******L******K***
Y***T******G******N******A******S******A******L******F******I******L******P******D******Q******D******K******M******E******E******V******E******A******M******L******L******P******E******T******L******K******R******W******R******D******S******L******E******F******R******E******I******G******E******L******Y******L******P******K******F******S******I******S******R******D******Y******N******L******N******D******I******L******L******Q******L***
G***I******E******E******A******F******T******S******K******A******D******L******S******G******I******T******G******A******R******N******L******A******V******S******Q******V******H******K******A******V******L******D******V******F******E******E******G******T******E******A******S******A******A******T******A******V******K******G******S******L******R******S******A******L******V******E******T******R******T******I******V******R******F***
N***R******P******F******L******M******I******I******V******P******T******D******T******Q******N******I******F******F******M******S******K******V******T******N******P******K******Q******A************

FIG. 10

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 18: SECUENCIA DE ADN: ACT-G1G

ATG**GAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACT**CTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGAGA
 ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
 GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
 TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
 CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
 CTTCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
 GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACCGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
 ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
 CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
 ATGATGGTCCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCAAG
 ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
 GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
 TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
 CCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
 GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
 GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGCCAGGAACCTAG
 CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
 TGCCACCGCGGTCAAAGGTTCTCTGCGTGGTCTGCTGCTGGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
 AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
 TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 40: SECUENCIA DE PROTEÍNAS: ACT-G1G

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR

MRGSHHHHHSSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
 SPLSISTALAFSLGAHNNTLTELKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNQSSDELQLSMGN
 AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDSQT
 MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPDTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
 YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
 GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLVDVFEEGTEASAATAVKGSLRGALVETRTIVRF
 NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 11

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG

Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His

Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)

Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 19: SECUENCIA DE ADN: ACT-C11

ATG***GAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCC******ACTTGACGAGGAGA***
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAGTGGTAATGGTGGCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCACCTGCGTCAGACCAACGTGGAGACCGGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTCCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 41: SECUENCIA DE PROTEÍNA: ACT-C11

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio

Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His

Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido

Sin subrayado y en gris: mutación de BSR

MRGSHHHHH***SRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF***
SPLSISTALAFSLSLGAHNTTLEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNOSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPODTHQSRFYLSKKKVMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKITLROINVETRTIVRF
NRPFELMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 12

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 20: SECUENCIA DE ADN: ACT-C11G

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
 ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
 GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
 TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
 CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
 CTTCACGACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
 GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
 ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
 CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
 ATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
 AACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
 GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
 TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
 CCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
 GCTCTACCTGCCAAAGTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
 GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
 CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
 TGCCACCGCGGTCAAATCACCGGTGCTCAGACCAACGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
 AACAGGCCCTTCCTGATGATCATTTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
 TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 42: SECUENCIA DE PROTEÍNAS: ACT-C11G

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR

MRGSHHHHHSRHPNSPLDEENLTOENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
 SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQS FQHLLRTL NQSSDELQLSMGN
 AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDLDSQT
 MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVVELK
 YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDLSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
 GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVHVHKAFLDVFEEGTEASAATAVKITGRQTNVETRTIVRF
 NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 13

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 21: SECUENCIA DE ADN: ACT-E5

ATG**GAGAGGATCCCATCACCATCACCATC****ACT****CTAGACACCCTAACAGCCC****ACTT****GACGAGGAGA**
ATCTG**ACCCAGGAGAACCAAGACCCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT**
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAGTGGGTAATGGTGGCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTGAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCAACCAGCGTTCTTCCCTGGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 43: SECUENCIA DE PROTEÍNAS: ACT-E5

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR

MRGSHHHHH**SRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF**
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNGTGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPDTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPIYFRDEELSCTVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLVDVFEEGTEASAATAVKINQRSSLVETRTIVRF
NRPFELMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 14

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 22: SECUENCIA DE ADN: ACT-E8

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTGGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCCCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCCTGCAGCGTGCTATCCTGGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 44: SECUENCIA DE PROTEÍNA: ACT-E8

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR

***M*RGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF**
***S*PLSISTALAFLSLGAHNNTLTELKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNQSSDELQLSMGN**
***A*MFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLSQT**
***M*MLVLVNYIFFKAKWEMPFDPDQTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTIIPYFRDEELSCTVVELK**
***Y*TGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNLDILLQL**
***G*IEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKILQRAILVETRTIVRF**
N*RPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA

FIG. 15

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 23: SECUENCIA DE ADN: ACT-F11

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCACTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTGGCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGSTCAAACAGCGTCTGCGTGACGCTCTGGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCCCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 45: SECUENCIA DE PROTEÍNAS: ACT-F11

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR

MRGSHHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQS FQHLLRTL NQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRETEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNIYIFFKAKWEMPFPDQDTHQSRFYLSKKKVVMPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELK
YTNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
GIEEFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVALDVFEEGTEASAATAVKQLRLDALVETRTRIVRF
NRFPLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 16

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 24: SECUENCIA DE ADN: ACT-F3

ATG**GAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGAGA**
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACCGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGGAAG
CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCCCGGACCGTACATGCTGGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 46: SECUENCIA DE PROTEÍNAS: ACT-F3

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR

MRGSHHHHH**SRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVI**
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNTRGKITDLIKDLDSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPODTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVVELK
YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKI**PDRHMLVETRTIVRF**
NRFFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 17

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 25: SECUENCIA DE ADN: ACT-G9

ATG**GAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGAGA**
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGCCCTTCCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACCGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGTCAAACCGTTGACTACGCTGCTCTGGTGGAGACGCGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCAGAACATCTTCTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 47: SECUENCIA DE PROTEÍNAS: ACT-G9

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR

MRGSHHHHHS**RHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF**
SPLSISTALAFLSLGAHNTTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLLRTLNOSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLSQT
MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPODTHQSRFYLSKKKWMVPMMSLHHLTIPIYFRDEELSCTVVVELK
YIGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEEGTEASAATAVKTVDYAALVETRTIVRF
NRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 18

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)

SEQ ID N° 26: SECUENCIA DE ADN: AAT-TS

ATG***GAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA***
AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCAACCTGGC
TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCAGG
ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAACCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
GGCCTGTTCCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTGT
ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
GTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGG
ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCCTGCCTGATGAGGGGAACTACAGCACCTGGAAAATG
AACTCACCCACGATATCATACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCCCTGGGTCAACTGGGCATC
ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCAT
GTTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTC
TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAA
AATAA

SEQ ID N° 48: SECUENCIA DE PROTEÍNA: AAT-TS

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido

M***R******G******S******H******H******H******H******H******H******G******S******D******D******P******Q******G******D******A******A******Q******K******T******D******T******S******H******D******Q******D******H******P******T******F******N******K******I******T******F******N******L******A******E******F******A******F******S******L******Y******R******Q******L******A******H******Q******S******N******S******T******N******I******F***
S***P******V******S******I******A******T******A******F******A******M******L******S******L******G******T******K******A******D******H******D******E******I******L******E******G******L******N******F******N******L******T******E******I******P******E******A******Q******I******H******E******G******F******Q******E******L******L******R******T******L******N******Q******P******D******S******Q******L******Q******L******T******T******G***
G***L******F******L******S******E******G******L******K******L******V******D******K******F******L******E******D******V******K******K******L******Y******H******S******E******A******F******T******V******N******F******G******D******T******E******E******A******K******Q******I******N******D******Y******V******E******K******G******T******Q******G******K******I******V******D******L******V******K******E******L******D******R******D******T***
V***F******A******L******V******N******Y******I******F******F******K******G******K******W******E******R******P******F******E******V******K******D******T******E******E******E******D******F******H******V******D******Q******A******T******T******V******K******V******P******M******K******R******L******G******M******F******N******I******Q******H******C******K******L******S******S******W******V******L******L******M******K***
L***G******N******A******T******A******I******F******F******L******P******D******E******G******K******L******Q******H******L******E******N******E******L******T******H******D******I******I******T******K******F******L******E******N******E******D******R******R******S******A******S******L******H******L******P******K******L******S******I******T******G******T******Y******D******L******K******S******V******L******G******Q******L******G******I***
T***K******V******F******S******N******G******A******D******L******S******G******V******T******E******E******A******P******L******K******L******S******K******A******V******H******K******A******V******L******T******I******D******E******K******G******T******E******A******A******G******A******M******F******L******E******A******I******P******M******S******I******P******P******E******V******K******F******N******K******P******F******V***
L***M******I******E******Q******N******T******K******S******P******L******F******M******G******K******V******V******N******P******T******Q**********

FIG. 19

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 27: SECUENCIA DE ADN: AAT-G1

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA
 AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCAACCTGGC
 TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
 TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCAGG
 ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
 CTTCCAGGAACCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
 GGCCTGTTCCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
 ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
 TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
 GTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCCTTGAAGTCAAGG
 ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
 TTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
 CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTCCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATG
 AACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
 TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATC
 ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
 CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
 GTTCTAGAGGGTTCTCTGCGTTCTATCCCGCCTGAGGTCAAGTTCACAAACCCTTTGTCTTC
 TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAA
 AATAA

SEQ ID N° 49: SECUENCIA DE PROTEÍNAS: AAT-G1

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR.

MRGSHHHHHHSDDPOGDAAQKTDTSHHDDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFF
 SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNENLTEIPEAQIHEGFQELLRLNQPSQLQLTTGN
 GLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFVFGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDT
 VFALVNYIFFKGWERPFEVKDTEEDFHVDQATTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY
 LGNATAIFFLPDEGKLOHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGI
 TKVFSNGADLSGVTEEAPLKLKAVHKAVLTIIDEKGTEAAGAMFLEGSLSRIPPEVKFNKPFVF
 LMIEQNTKSPFMGKVVNPTQK*

FIG. 20

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 28: SECUENCIA DE ADN: AAT-G1G

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA
 AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGC
 TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
 TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCAG
 ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAG
 CTTCCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
 GGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
 ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
 TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
 GTTTTTGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGG
 ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
 TTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
 CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATG
 AACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
 TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATC
 ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
 CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
 GTTTCTAGAGGGTTCTCTGCGTGGTATCCCGCCTGAGGTCAAGTTCACAAACCCTTTGTCTTC
 TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAA
 AATAA

SEQ ID N° 50: SECUENCIA DE PROTEÍNA: AAT-G1G

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR.

MRGSHHHHHGSDDPOGDAAQKTDTSHHQDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIF
 SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGFQELLRTLNOQPSQLQLTTGN
 GLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTEEAQKQINDYVEKGTQGIKIVDLVKELDRDT
 VFALVNYIFFKWKWERPFVVDTEEEDEHVDQATTVKVPMKRLGMFNIOHCKKLSWVLLMKY
 LGNATAIFFLPDEGLQHLLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGLGI
 TKVFSNGADLSGVTEEAPLKLKSKAVHKAVLTIIDEKGTAAAGAMFLESSLRGIPPEVKFNKPFVF
 LMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK*

FIG. 21

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 29: SECUENCIA DE ADN: AAT-C11

ATG***AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA***
AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCAACCTGGC
TGAGTTCGCCTTACGCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCAGG
ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
GGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
GTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCCTTGAAGTCAAGG
ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCCCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAAATG
AACTCACCCACGATATCATACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCCCTGGGTCAACTGGGCATC
ACTAAGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCCACCCCTGAAGCTCT
CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
GTTTCTAGAGGCTATCCCGCGTCAGACCAACCCCTGAGGTCAAGTTC AACAAACCCCTTTGTCTTC
TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAA
AATAA

SEQ ID N° 51: SECUENCIA DE PROTEÍNA: AAT-C11

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR.

MRGSHHHHHGSDDPQGDAAQKTDTSHHQDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFF
SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGFQELLRLNQPDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFVFGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDT
VFALVNYIFFKWKWERPFEVKDTEEEDFHVDQATTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSWVLLMKY
LGNATAIFFLPDEGKLQHLLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGI
TKVFSNGADLSGVTEEAPLKLKAVHKAVLTI DEKGTEAAGAMFLEAI PROTNPEVKFNKPFVF
LMIEQNTKSPLEFMGKVVNPTQK*

FIG. 22

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 30:

SECUENCIA DE ADN: AAT-C1 1G

ATG***AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA***
AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCAACCCCAACCTGGC
TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACG
ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
GGCCTGTTCCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
GTTTTTGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGG
ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCCCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATG
AACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCCCTGGGTCAACTGGGCATC
ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
GTTTCTAGAGGCTATCGGTCGTCAGACCAACCCTGAGGTCAAGTCAACAAACCCCTTTGTCTTC
TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAA
AATAA

SEQ ID N° 52:

SECUENCIA DE PROTEÍNA: AAT-C11G

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR.

MRGSHHHHHHSDDPQGDAAQKTDTSHHDDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIEF
SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGFQELLRLNQPDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEFTVNFQDTEEAKKQINDYVEKGTQKIVDLVKELDRDT
VFALVNYIFFKGKWERPFVVKDTEEDFHVDQATTVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSWVLLMKY
LGNATAIFFLPDEGKQLQHLENELTHDIITKLENEEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGI
TKVESNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIGRQTNPEVKFNKPFVF
LMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK*

FIG. 23**Leyenda**

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG

Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His

Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)

Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 31: SECUENCIA DE ADN: AAT-E5

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA
AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCAACCTGGC
TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACG
ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTCCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
GGCCTGTTCCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
GTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGG
ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATG
AACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATC
ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGCTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
GTTTCTAGAGGCTAACAGCGTTCTTCCCCGCTGAGGTCAAGTTCAACAAACCTTTGTCTTC
TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAA
AATAA

SEQ ID N° 53: SECUENCIA DE PROTEÍNAS: AAT-E5**Leyenda**

Cursiva y negrita: Metionina de inicio

Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His

Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido

Sin subrayado y en gris: mutación de BSR.

MRGSHHHHHHSDDPQGDAAQKTDTSHHDDQDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIF
SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFQDTEEAKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDT
VFALVNYIFFKWKWERPFVVKDTEEDFHVDQATTVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSWVLLMKY
LGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGLGI
TKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEANQRSSPPEVKFNKPFVF
LMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK*

FIG. 24

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 32:

SECUENCIA DE ADN: AAT-E8

ATG***AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA***
AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGC
TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCAGG
ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
GGCCTGTTCCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
GTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTPCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCPTTGAAGTCAAGG
ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCCCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATG
AACTCACCCACGATATCATACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCCCTGGGTCAACTGGGCATC
ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCCAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
GTTTCTAGAGGCTCTGCAGCGTGTATCCCGCCTGAGGTCAAGTCAACAAACCCTTTGTCTTC
TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAA
AATAA

SEQ ID N° 54:

SECUENCIA DE PROTEÍNAS: AAT-E8

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR.

MRGSHHHHHGSDDPQGDAAQKTDTSHHHQDHPFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFF
SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRLTLNQPDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFQDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDT
VFALVNYIFFKWKWERPFVVKDTEEEDEFHVDQATTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSWVLLMKY
LGNATAIFFLPDEGKLQHLLENELTHDIITKLENEEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGI
TKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIIDEKGTEAAGAMFLEALQRAIPPEVKFNKPFVF
LMIEQNTKSPFLFMGKVVNPTQK*

FIG. 25

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 33: SECUENCIA DE ADN: AAT-F11

ATG***GAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA***
 AGACAGATAACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGC
 TGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
 TCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCAGC
 ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
 CTCCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
 GGCCTGTTCCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTAAAAAGTTGT
 ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
 TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
 GTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGG
 ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGGCACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
 TTTAGGCATGTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
 CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCCCTGCCTGATGAGGGGAACTACAGCACCTGGAAAATG
 AACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
 TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCCCTGGGTCAACTGGGCATC
 ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
 CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
 GTTCTAGAGCAGCGTCTGCGTGACATCCCGCCTGAGGTCAAGTTCACAAACCCTTTGTCTTC
 TTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAA
 AATAA

SEQ ID N° 55: SECUENCIA DE PROTEÍNAS: AAT-F11

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR.

M***RGS******HHHHH******HS******DDP******QGDAAQKTDTS******HH******DD******QH******PT******FNKIT******PNLAE******FAF******SLYRQLAHQ******SNST******NIFF***
 SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTPEIPEAQIHEGFQELLRTLNLQPDSQLQLTTGN
 GLFLSEGLKLVDFLEDVKLYHSEFTVNFQDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDT
 VFALVNYIFFKKGWERPFVVDTEEEDFHVDQATTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY
 LGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGI
 TKVFSNGADLSGVTEEAPLKLKSAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEQLRLDIPPEVKFNKPFVF
 LMIEQNTKSPLEMGKVVNPTQK*

FIG. 26

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 34:

SECUENCIA DE ADN: AAT-F3

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGATGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGA
 AGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGC
 TGAGTTCGCCTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTC
 TCCCAGTGAAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACG
 ATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
 CTCCAGGAACCTCCCGTACCCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAAT
 GGCCTGTTCCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGT
 ACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGA
 TTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACA
 GTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGG
 ACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
 TTTAGGCATGTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATAC
 CTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATG
 AACTCACCCACGATATCATACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACA
 TTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATC
 ACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT
 CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGCGCCAT
 GPTTCTAGAGGCTCCGGACCGTCACATGCCGCTGAGGTCAAGTTCAACAACCCCTTTGTCTTC
 TTAATGATTGAACAAAATAACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAA
 AATAA

SEQ ID N° 56:

SECUENCIA DE PROTEÍNAS: AAT-F3

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR.

***M*RGSHHHHHGSDDPQGDAAQKTDTSHHQDHPTEFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFF**
 SPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGFQELLRLNLNQPDSQLQLTTGN
 GLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFVDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDT
 VFALVNYIFFFKGWERPFVEVKDTEEDFHVDQATTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY
 LGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGI
 TKVFSNGADLSGVTEEAPLKLKSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAPDRHMPPEVKFNKPFVF
 LMIEQNTKSPLEFMGKVVNPTQK*

FIG. 28

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 36: SECUENCIA DE ADN: ACT-G1V

ATG**GAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCC****ACTTGACGAGGAGA**
 ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGCTGGACCTCGGATTAGCCTCCGCCAACGT
 GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
 TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCCTGA
 CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
 CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
 GCCATGTTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
 ATGGCTCCGAGGCCTTTGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
 CTACCTGAAGAATGGAAGTGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
 ATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTTGACCCCCAAG
 ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGCCCATGATGAGTTT
 GCATCACCTGACTATACCTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
 TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGGAAAG
 CCATGCTGCTCCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
 GCTCTACCTGCCAAAGTTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
 GGCATTGAGGAAGCCTTCACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
 CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
 TGCCACCGCGGTCGTTGGTTCTCTGCGTTCCTGCATTAGTGGAGACCGGTACCATTGTGCGTTTC
 AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
 TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 58: SECUENCIA DE PROTEÍNAS: ACT-G1V

Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR.

MRGSHHHHHS**SRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVIF**
 SPLSISTALAFSLGAHNTTLLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNOSSDELQLSMGN
 AMEVKEQLSLLDRETEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKNTRGKITDLIKDLDLDSQT
 MMVLVNYIFFKAKWEMPFDPQDTHQSRYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPIYFRDEELSCTVVELK
 YTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQL
 GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKAVLDVFEETEAASAATAVVGSLRSALVETRTIVRF
 NRPELMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 29

Leyenda

Cursiva y negrita: codón de inicio ATG
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: Mutación de ADN (codón añadido)
 Sin subrayado y en gris: Secuencia de ADN que codifica la mutación de BSR.

SEQ ID N° 37

SECUENCIA DE ADN: ACT-C11D

ATGAGAGGATCCCATCACCATCACCATCACTCTAGACACCCTAACAGCCCCTTGACGAGGAGA
ATCTGACCCAGGAGAACCAAGACCGAGGGACACACGTGGACCTCGGATTAGCTCCGCCAACGT
GGACTTCGCTTTCAGCCTGTACAAGCAGTTAGTCTGAAGGCCCTGATAAGAATGTCATCTTC
TCCCCACTGAGCATCTCCACCGCCTTGGCCTTCCTGTCTCTGGGGGCCATAATACCACCCTGA
CAGAGATTCTCAAAGGCCTCAAGTTCAACCTCACGGAGACTTCTGAGGCAGAAATTCACCAGAG
CTTCCAGCACCTCCTGCGCACCCCTCAATCAGTCCAGCGATGAGCTGCAGCTGAGTATGGGAAAT
GCCATGTTTGTCAAAGAGCAACTCAGTCTGCTGGACAGGTTACGGAGGATGCCAAGAGGCTGT
ATGGCTCCGAGGCCTTGGCCACTGACTTTCAGGACTCAGCTGCAGCTAAGAAGCTCATCAACGA
CTACGTGAAGAATGGAAGTAGGGGGAAAATCACAGATCTGATCAAGGACCTTGACTCGCAGACA
ATGATGGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGCCAAATGGGAGATGCCCTTGACCCCAAG
ATACTCATCAGTCAAGGTTCTACTTGAGCAAGAAAAAGTGGGTAATGGTGGCCATGATGAGTTT
GCATCACCTGACTATACTTACTTCCGGGACGAGGAGCTGTCTGCACCGTGGTGGAGCTGAAG
TACACAGGCAATGCCAGCGCACTCTTCATCCTCCCTGATCAAGACAAGATGGAGGAAGTGAAG
CCATGCTGCTCCAGAGACCCTGAAGCGGTGGAGAGACTCTCTGGAGTTCAGAGAGATAGGTGA
GCTCTACCTGCCAAAGTTTCCATCTCGAGGGACTATAACCTGAACGACATACTTCTCCAGCTG
GGCATTGAGGAAGCCTTACCAGCAAGGCTGACCTGTCAGGGATCACAGGGGCCAGGAACCTAG
CAGTCTCCAGGTGGTCCATAAGGCTGTGCTTGATGTATTTGAGGAGGGCACAGAAGCATCTGC
TGCCACCGCGGTCAAATCACCCCTCCGTCAGACCAACGACGAGACCGGTACCATTGTGCGTTTC
AACAGGCCCTTCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTTCTTCATGAGCAAAG
TCACCAATCCCAAGCAAGCCTAA

SEQ ID N° 59:

SECUENCIA DE PROTEÍNAS: ACT-C11P

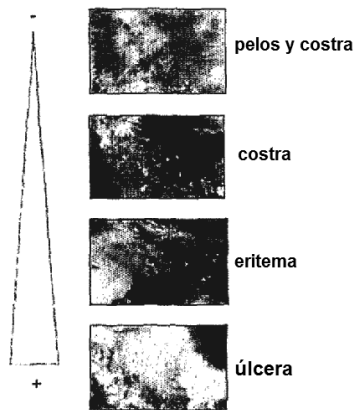
Leyenda

Cursiva y negrita: Metionina de inicio
 Negrita y sin subrayado: Etiqueta de His
 Sin subrayado: mutación (añadida) de aminoácido
 Sin subrayado y en gris: mutación de BSR.

MRGSHHHHHSRHPNSPLDEENLTQENQDRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVI
SPLSISTALAFLSLGAHN^TTLTEILKGLKFNLTETSEAEIHQSFQHLRLTLNQSSDELQLSMGN
AMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDYVKN^GTRGKITD^LIKDLDSQT
MMVLVNYIEFFKAKWEMPFD^PQDTHQSRFYLSKKKWVMPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVV^ELK
YTGNASALEFILPDQDKMEEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISR^DYNLNDILLQL
GIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVHKA^VLDVFEEGTEASAATAVKITL^RQTND^ETRTIVRF
NRPF^LMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA*

FIG. 30

Fenotipo de la lesión en ratones Tg-KLK5



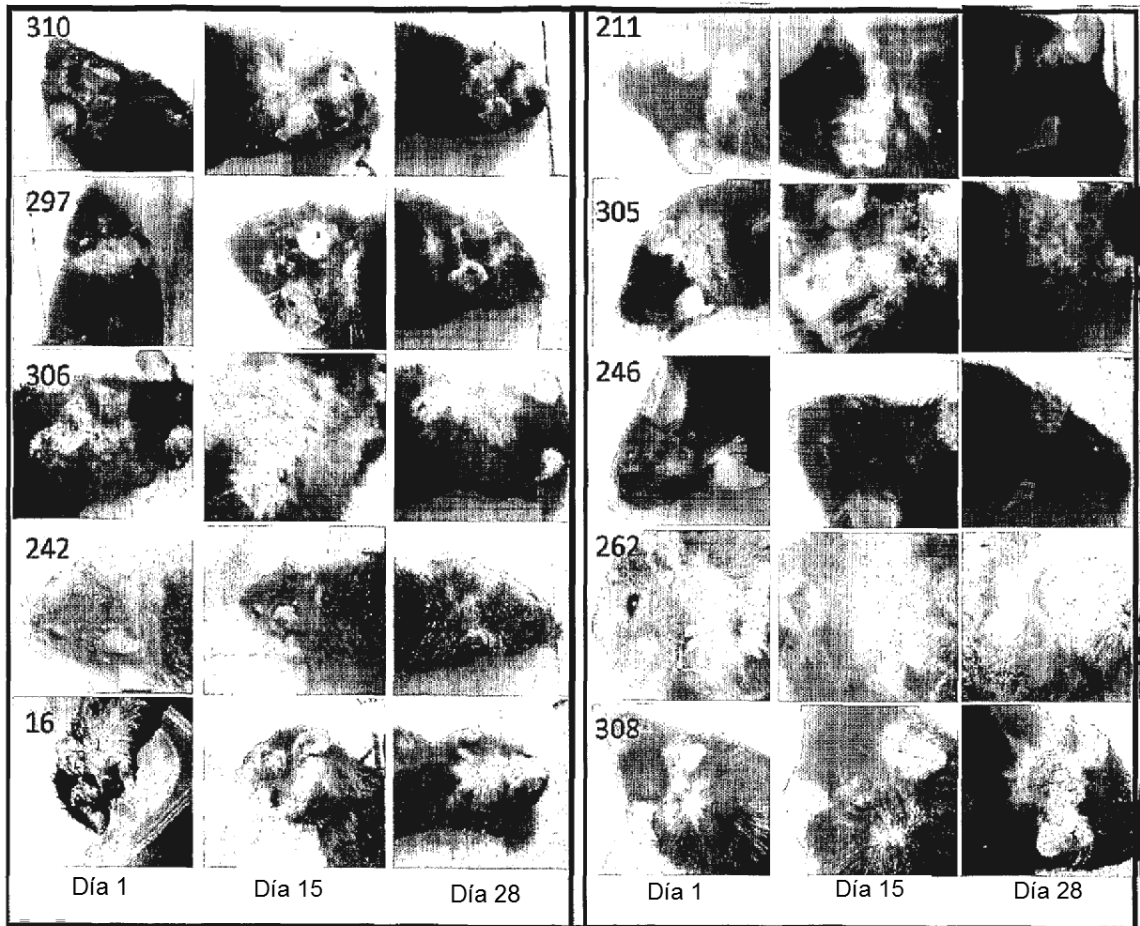
Grado 1: Valor de gravedad bajo = 1

Grado 2: Valor de gravedad bajo a medio = 2

Grado 3: Valor de gravedad medio a alto = 3

Grado 4: Valor de gravedad alto = 4

FIG. 31



Grupo 1

Grupo 2