

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 358**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2014 PCT/PT2014/000018**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14148932**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2014 E 14715462 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2981278**

54 Título: **Uso de proteasas aspárticas vegetales para el tratamiento de afecciones de la piel**

30 Prioridad:

19.03.2013 GB 201305023

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

28.02.2019

73 Titular/es:

BIOCANT - ASSOCIAÇÃO DE TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA (100.0%)

**Centro de Inovacao em Biotecnologia Biocant
Park Parque Tecnologia de Cantanhede Nucleo
04., Lote 3
Cantanhede 3060-197, PT**

72 Inventor/es:

ALMEIDA, CARLA, SOFIA, GOMES MALAQUIAS DE;

SIMÕES, ISAURA, ISABEL, GONÇALVES y FARO, CARLOS, JOSÉ, FIALHO COSTA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 702 358 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 proteasas aspárticas vegetales para el tratamiento de afecciones de la piel

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteasas aspárticas y, particularmente, a proteasas aspárticas vegetales.

10 **Antecedentes de la invención**

10 La epidermis humana está compuesta por cinco capas de células epiteliales estratificadas y es un órgano en constante renovación. Se forman nuevas células en la capa basal y después de un proceso de diferenciación, las células alcanzan la capa más externa de la piel. La renovación y el mantenimiento requieren el desprendimiento de células de los corneocitos del estrato córneo (EC). El envejecimiento y ciertas enfermedades de la piel pueden 15 alterar este proceso, lo que lleva a una disminución en la tasa de descamación, lo cual tiene como resultado un aumento del grosor del EC y en formación de escamas cutáneas.

La descamación cutánea es el desprendimiento de corneocitos del estrato córneo (EC) y forma parte de la auto-renovación y el mantenimiento de la piel. La descamación o exfoliación de las capas epidérmicas de la piel humana induce una mayor tasa de renovación de células epidérmicas. La descamación de los corneocitos desde la epidermis requiere la degradación enzimática de las estructuras del corneodesmosoma, compuestas de proteínas corneodesmosina, desmogleína-1 y desmocolina-1. En este proceso de exfoliación participan varias proteasas de serina, cisteína y aspárticas incluyendo catepsina D, catepsina E y SASpasa. 20

Se han propuesto composiciones que comprenden la proteasa ácida pepsina y las proteasas de serina de tipo tripsina del estrato córneo para una serie de usos entre los que se incluyen mejorar la textura o el aspecto de la piel, potenciar la exfoliación epidérmica, inducir la descamación cutánea y provocar la renovación celular (documentos US 6.656.701; WO95/07688). Las proteasas ácidas descritas en el documento US 6.656.701 presentan actividad peptidil hidrolasa (proteolítica) por debajo del pH promedio de la superficie de la piel, pero que son significativamente inactivas a un pH por encima del pH promedio de la superficie de la piel (aproximadamente pH 5,5 para los seres humanos). Asimismo, se cree que la proteasa aspártica catepsina D facilita la degradación del desmosoma y ha sido explotada en algunas preparaciones cosméticas/cosmecéuticas, por ejemplo, se han utilizado oligosacáridos purificados extraídos de la fruta de la chumbera (*Opuntia ficus indicia*) en tratamientos de exfoliación con ácido facial para potenciar la actividad de catepsina D. 25 30

Las proteasas aspárticas son peptidasas presentes en animales, plantas, hongos y virus y presentan una amplia gama de funciones y actividades, que incluyen: la digestión de los mamíferos, p.ej., quimosina y pepsina A, la activación y degradación de hormonas polipeptídicas y factores de crecimiento, p.ej., catepsina D, la regulación de la presión arterial p.ej., renina, la degradación de la hemoglobina por parásitos, p.ej., plasmepsinas, el procesamiento proteolítico de la poliproteína del VIH, p.ej., retropepsina, la participación en las interacciones polen-pistilo en las plantas, p.ej., Cardosina A. 35 40

Las proteasas aspárticas se sintetizan como proenzimas y contienen un péptido señal, que se escinde dando como resultado una proenzima que puede secretarse y activarse de manera autocatalítica. Generalmente, las proteasas aspárticas consisten en una única cadena peptídica de aproximadamente 320-360 restos de aminoácidos, compuesta principalmente de estructuras de cadenas β dispuestas en dos lóbulos. El sitio catalítico de la enzima está situado entre estos dos lóbulos, conteniendo cada uno de ellos un resto de aspartato que se encuentran a una distancia de un enlace de hidrógeno entre sí y actúan juntos para activar una molécula de agua que tiene como resultado la escisión del enlace peptídico del sustrato (a través del ataque nucleófilo). 45 50

Las proteasas aspárticas vegetales se diferencian de otras proteasas aspárticas por comprender un inserto específico de la planta que se escinde durante la maduración de la proteína, además de un péptido señal (responsable de la translocación al RE); un prosegmento de 40-50 restos de aminoácidos (relacionados con el correcto plegamiento, estabilización y direccionamiento de la enzima); y una enzima madura que posee dos motivos de secuencia catalítica. Los dos restos de aspartato catalíticos en proteasas aspárticas vegetales están contenidos dentro de los motivos Asp-Thr-Gly y Asp-Ser-Gly. 55

Inserto específico de planta (IEP)

60 Muchas proteasas aspárticas vegetales se diferencian de sus equivalentes de mamíferos y microbios por la presencia de un inserto específico para plantas (IEP), que tiene normalmente aproximadamente 104 aminoácidos. En la fitepsina de la cebada, la eliminación de la IEP conlleva la secreción de la fitepsina mutada cuando se expresa en protoplastos de tabaco, al mismo tiempo que retiene la actividad enzimática⁴. Se ha demostrado que la presencia de IEP es al menos necesaria para el direccionamiento vacuolar⁴. 65

Direccionamiento Vacuolar

El destino final de una proteína tras la síntesis es un proceso muy complejo y regulado y depende generalmente de la presencia de información dirigida específica (por ejemplo, señales de direccionamiento, modificaciones después de la traducción) reconocida específicamente por los receptores que dirigen las proteínas nacientes a sus localizaciones finales en la célula.¹

Una de las rutas de biosíntesis más complejas es la vía secretora. De una manera muy simplificada, este sistema comprende varios compartimentos subcelulares unidos a la membrana y las proteínas se intercambian entre dichos compartimentos mediante el tráfico de vesículas. Las proteínas residentes en el retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi, las vacuolas o la membrana plasmática/matriz extracelular deben entrar en este sistema de endomembrana y algunas de ellas pasan por procesamiento y modificaciones postraduccionales en su paso a través de la red de RE y Golgi. El direccionamiento a RE se determina cotranslacionalmente por la presencia de un péptido señal en el extremo N de una proteína naciente¹. Aunque los últimos datos indican que el sistema puede ser más complejo de lo esperado en principio², se sigue aceptando de forma general que las proteínas se dirigen activamente a vacuolas, lo cual significa que contienen señales de direccionamiento vacuolar específicas (VSS por sus siglas en inglés).

Se han identificado diferentes tipos de señales de direccionamiento vacuolar (VSS).^{1,3} Aunque aún no se ha definido una secuencia de consenso para estas señales, actualmente se dividen en tres categorías: VSS específicas de secuencia (ssVSS) que comprenden propéptidos N-terminales (por ejemplo, esporamina) o secuencias internas (por ejemplo, ricina); propéptidos C-terminales (CTPP) (por ejemplo, lectina y quitinasa) y estructura física VSS (psVSS) [por ejemplo, inserto específico de la planta (IEP) de la fitepsina]³. Dado el número de proteínas vacuolares solubles que carecen de estos tipos de VSS, es de esperar que todavía no se hayan identificado nuevos motivos para el direccionamiento vacuolar.

La capacidad de manipular el direccionamiento de proteínas es particularmente importante si se considera la expresión de proteínas de alto valor en sistemas heterólogos u homólogos. El direccionamiento específico de una proteína seleccionada en vacuolas de almacenamiento puede ser muy ventajosa para la acumulación de grandes cantidades de proteínas recombinantes y, por lo tanto, para aumentar el valor alimenticio de una planta. Por el contrario, redirigir una proteína vacuolar nativa para la secreción puede ser particularmente útil considerando, por ejemplo, la expresión en sistemas heterólogos como las levaduras, en los que la secreción de proteínas en el medio facilita enormemente el manejo y purificación de proteínas recombinantes.

La relevancia de estas señales de direccionamiento vacuolar en diversas aplicaciones queda confirmado por diferentes patentes publicadas: las patentes estadounidenses US69723504, US73686285, US53607266 y US60546377, describiéndose en las dos últimas VSS de lectina y quitinasa, respectivamente.

Las proteasas aspárticas típicas están ampliamente distribuidas en las plantas y han sido purificadas desde varios tejidos. En general, estas enzimas comparten altos niveles de identidad de secuencia de aminoácidos (más del 60 %) y la mayoría de ellas se acumula dentro de vacuolas de las plantas. Sin embargo, hay excepciones en cuanto a esta localización intracelular y se ha demostrado que varias proteasas aspárticas vegetales son extracelulares.⁸

En la patente internacional WO95/07687 se describe una composición para aplicación tópica sobre la piel para aliviar o prevenir afecciones de piel escamosa y seca, caspa o acné que comprenden una o más enzimas de tipo catepsina-D del estrato córneo.

En la patente estadounidense US2006/0240053 se describe el uso en productos cosméticos y terapéuticos de proteasa de ácido aspártico, al que se hace referencia como SASPasa.

Hiikoshi et al 1999 (British Journal of Dermatology 141: 453-459) describe el papel de proteólisis de tipo catepsina D endógena y quimotripsina en la descamación epidérmica humana.

Sumario de la invención

Los autores de la invención han descubierto que las proteasas aspárticas de las plantas, en particular las cardosinas y particularmente la cardosina B, presentan actividad de descamación cutánea sin afectar la viabilidad celular. Estas proteasas aspárticas vegetales tienen una mayor capacidad para inducir la descamación cutánea en comparación con las proteasas aspárticas de mamíferos, incluyendo la catepsina D.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método de tratamiento médico, comprendiendo dicho método la administración de una proteasa aspártica vegetal a un paciente que necesita dicho tratamiento. El método puede ser para el tratamiento de un trastorno de la piel. El método implica preferentemente inducir descamación cutánea en el paciente. El paciente es preferentemente aquel que padece al menos uno entre xerosis, eccema, acné, psoriasis o ictiosis, y el método implica el tratamiento de al menos uno entre xerosis, eccema, acné, psoriasis o ictiosis. La proteasa aspártica vegetal puede ser un mutante que carece de un dominio del inserto específico de plantas

funcional (IEP). La proteasa aspártica vegetal puede ser una cardosina, como, por ejemplo, una cardosina B o cardosina A o un mutante de la misma. La proteasa aspártica vegetal puede tener al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2.

5 La presente divulgación proporciona asimismo el uso de una proteasa aspártica vegetal en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno de la piel. El tratamiento implica preferentemente inducir descamación cutánea. El medicamento se puede proporcionar para tratar un trastorno de la piel, como xerosis, eccema, acné, psoriasis o ictiosis. La proteasa aspártica vegetal puede ser un mutante que carece de un dominio del inserto específico de plantas funcional (IEP). La proteasa aspártica vegetal puede ser una cardosina, como, por ejemplo, cardosina B o cardosina A o un mutante de la misma. La proteasa aspártica vegetal puede tener al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2.

15 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una proteasa aspártica vegetal para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. Esto puede implicar el tratamiento de un trastorno de la piel y puede implicar preferentemente la inducción de descamación cutánea. Siendo así, la proteasa aspártica vegetal puede proporcionarse para su uso en el tratamiento de al menos uno entre xerosis, eccema, acné, psoriasis o ictiosis. La proteasa aspártica vegetal puede ser un mutante que carece de un dominio del inserto específico de plantas funcional (IEP). La proteasa aspártica vegetal puede ser una cardosina, como, por ejemplo, cardosina B o cardosina A o un mutante de la misma. La proteasa aspártica vegetal puede tener al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2.

25 En otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona un método cosmético para mejorar el aspecto de la piel, comprendiendo dicho método la administración de una proteasa aspártica vegetal a la piel de un paciente. El paciente no requiere la inducción de descamación para fines terapéuticos en el sitio en el que se ha de aplicar el tratamiento cosmético. El método puede implicar la inducción de descamación cutánea. La proteasa aspártica vegetal puede ser un mutante que carece de un dominio del inserto específico de plantas funcional (IEP). La proteasa aspártica vegetal puede ser una cardosina, como, por ejemplo, una cardosina B o cardosina A o un mutante de la misma. La proteasa aspártica vegetal puede tener al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2.

30 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición, comprendiendo la composición una proteasa aspártica vegetal aislada. La proteasa aspártica vegetal puede carecer de un dominio del inserto específico de plantas funcional (IEP). La proteasa aspártica vegetal puede ser una cardosina, como, por ejemplo, cardosina B o cardosina A o un mutante de la misma. La proteasa aspártica vegetal puede tener al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2. La composición se formula para administración tópica y se prepara como una pomada, crema o emulsión. La composición puede formularse como una composición farmacéutica o medicamento. Alternativamente, la composición puede formularse como una composición cosmética.

40 Los autores de la invención han determinado asimismo que puede inactivarse la función VSS normal del inserto específico de plantas (IEP) de ~ 100 aminoácidos por manipulación de ADN recombinante para potenciar la secreción de proteasas aspárticas vegetales en sistemas de expresión homólogos o heterólogos (preferentemente sistemas de expresión no vegetales heterólogos) al mismo tiempo que se retiene la actividad proteasa aspártica de la proteína secretada. Por tanto, los autores de la invención han proporcionado un medio nuevo y ventajoso para producir altos volúmenes de proteasas aspárticas vegetales en una forma conveniente para su aislamiento y purificación.

50 Por consiguiente, la presente invención proporciona también métodos para la expresión en células de proteasas aspárticas vegetales mutantes modificadas de manera que el dominio IEP está inactivado, siendo la expresión preferentemente en células eucarióticas no vegetales. Preferentemente, las proteasas aspárticas vegetales mutantes retienen su actividad proteasa.

55 En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona una proteasa aspártica vegetal cardosina mutante aislada, en donde la proteasa aspártica vegetal cardosina se muta de manera que carece de un dominio de inserto específico de la planta funcional (IEP). La proteasa aspártica vegetal cardosina puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2.

60 En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para producir una proteasa aspártica vegetal mutante, comprendiendo dicho método expresar, en una célula que preferentemente no es una célula vegetal o protoplasto vegetal, una proteasa aspártica vegetal mutante, en donde la proteasa aspártica vegetal se muta de tal manera que carece de un dominio de inserto específico de plantas funcional (IEP).

65 El método implica preferentemente la secreción de la proteasa aspártica vegetal mutante de la célula, comprendiendo el método además la obtención o recogida de la proteasa aspártica vegetal mutante secretada de la célula. La obtención o recolección de la proteasa aspártica vegetal puede implicar la separación del material de proteína del medio de cultivo/caldo de fermentación y el aislamiento de la fracción de proteasa aspártica vegetal. La secuencia de nucleótidos que codifica la proteasa aspártica vegetal mutante puede proporcionarse en un vector

de manera que se exprese desde un vector contenido en la célula. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteasa aspártica vegetal mutante puede incorporarse en el genoma de la célula y expresarse a partir del genoma.

5 La célula es preferentemente una célula eucariota. En algunas realizaciones, es una célula fúngica, p.ej., una célula de levadura. Opcionalmente, la célula no es una célula vegetal o protoplasto vegetal.

10 El método puede comprender además la etapa de mezclar proteasa aspártica vegetal mutante obtenida de dicha célula con un vehículo, adyuvante o diluyente para formar un producto que comprende una composición que contiene dicha proteasa aspártica vegetal mutante.

15 En algunos aspectos, el vector comprende ácido nucleico que codifica un mutante de proteasa aspártica vegetal que carece de un dominio inserto específico de la planta funcional (IEP). Preferentemente, el mutante de la proteasa aspártica vegetal es (i) el polipéptido de la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2 o (ii) un polipéptido que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2. Preferentemente, el ácido nucleico de (i) o (ii) está unido operativamente a una secuencia reguladora para controlar la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora gracias a lo cual puede formar un casete de expresión. También se proporciona una célula que comprende el vector.

20 En otros aspectos, se proporciona una célula que tiene un genoma modificado para contener ácido nucleico que codifica un mutante de proteasa aspártica vegetal que carece de un dominio de inserto específico de plantas funcional (IEP). Preferentemente, el mutante de la proteasa aspártica vegetal es (i) el polipéptido de SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2 o (ii) un polipéptido que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2. Preferentemente, el ácido nucleico de (i) o (ii) está unido operativamente a una secuencia reguladora para controlar la expresión del ácido nucleico gracias a lo cual puede formar un casete de expresión.

30 En otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona un método para promover la acumulación de un polipéptido de interés en la vacuola de una célula, opcionalmente, una célula vegetal o protoplasto vegetal, comprendiendo dicho método expresar una construcción de polipéptido en la célula, comprendiendo la construcción de polipéptido la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de un dominio IEP. El dominio IEP puede tener al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 3 o la SEC ID NO: 4.

35 En algunos aspectos, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la construcción de polipéptido. Preferentemente, el ácido nucleico está unido operativamente a una secuencia reguladora para controlar la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora, gracias a lo cual puede formar un casete de expresión. También se proporciona una célula que comprende el vector.

40 En otros aspectos, se proporciona una célula que tiene un genoma modificado para contener ácido nucleico que codifica la construcción de polipéptido. Preferentemente, el ácido nucleico está unido operativamente a una secuencia reguladora para controlar la expresión del ácido nucleico en la célula, gracias a lo cual puede formar un casete de expresión.

45 Por lo tanto, la presente divulgación proporciona también una proteasa aspártica vegetal que se modifica para que carezca de un dominio de inserto específico de plantas funcional (IEP). El dominio IEP se puede suprimir por completo o parcialmente. Por ejemplo, se pueden suprimir al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100 o más aminoácidos del dominio IEP. El número de aminoácidos suprimidos puede calcularse comparando la secuencia de la proteasa aspártica vegetal o la secuencia del dominio IEP con la secuencia de una proteasa aspártica vegetal sin modificar, como pueda ser una planta aspártica de tipo silvestre. El dominio IEP se puede reemplazar total o parcialmente con un engarce, como por ejemplo un engarce de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos de aminoácidos. Los aminoácidos del engarce pueden ser todos iguales, por ejemplo, pueden ser todos restos de glicina. Alternativamente, el engarce puede comprender una pluralidad de diferentes aminoácidos. Sin embargo, este engarce no comprende todos o sustancialmente todos, los restos de aminoácidos del dominio funcional IEP. La modificación del dominio IEP puede conferir la alteración del tráfico en la proteasa aspártica vegetal. Por ejemplo, puede modificarse el tráfico de la proteasa aspártica vegetal dentro de una célula en comparación con el tráfico de una proteasa aspártica vegetal que no tiene un dominio IEP modificado, como pueda ser una proteasa aspártica vegetal de tipo silvestre. Las proteasas aspárticas vegetales de acuerdo con la invención tienen actividad caseinolítica.

60 La proteasa aspártica vegetal según la invención puede tener un pro segmento. El extremo N- de la proteasa aspártica vegetal puede estar no modificado con respecto a la proteasa aspártica vegetal de tipo silvestre o diferente a ella.

65 La proteasa aspártica vegetal de acuerdo con la invención puede modificarse en el extremo C-. Por ejemplo, es posible que la proteasa aspártica vegetal de acuerdo con la invención no tenga la secuencia AEAA o AEA V en el extremo C-.

La proteasa aspártica vegetal de la invención puede ser una cardosina, ciprosina, cenprosina, fitepsina o cinasa modificada. Puede tener una secuencia de al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % de identidad de secuencia con una secuencia de una cardosina, ciprosina, cenprosina, fitepsina o cinasa conocida. En algunos casos, la proteasa aspártica vegetal puede ser una cardosina, como cardosina A o cardosina B. En algunos casos, la proteasa aspártica vegetal según la invención es cardosina B.

En algunos casos, la proteasa aspártica vegetal según la invención tiene al menos un 70 % de identidad con la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2. En algunos casos, tiene al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad con la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2.

Es posible expresar una proteasa aspártica vegetal de acuerdo con la invención en una célula eucariótica. Por ejemplo, se puede expresar la proteasa aspártica vegetal en una célula de levadura, por ejemplo, una célula de *Kluyveromyces lactis*. En algunos casos, la proteasa aspártica vegetal de acuerdo con la invención no se ha producido en un protoplasto vegetal. En algunos casos, la planta de la proteasa aspártica no se ha producido en *E. coli*.

La divulgación también proporciona un ácido nucleico que codifica una proteasa aspártica vegetal de acuerdo con la invención. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica una proteasa aspártica vegetal que carece de un dominio IEP funcional; un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o un polipéptido que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, en donde el polipéptido carece de dominio de inserto específico de plantas funcional (IEP). Se proporciona asimismo un vector que comprende el ácido nucleico, por ejemplo un vector de expresión de levadura.

Se proporciona asimismo una célula que codifica una proteasa aspártica vegetal de acuerdo con la invención. La célula puede tener un genoma modificado para codificar la proteasa aspártica vegetal o puede incluir un vector que codifica la proteasa aspártica vegetal. La célula puede tener ácido nucleico, por ejemplo, puede modificarse su genoma para incluir ácido nucleico, que codifica una proteasa aspártica vegetal que carece de un dominio IEP funcional; el polipéptido de la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2 o un polipéptido que tenga al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2, en donde el polipéptido codificado carece de un dominio inserto específico de planta funcional (IEP). La célula puede ser una célula de levadura, como *Kluyveromyces lactis*.

La divulgación proporciona también un método para producir una proteasa aspártica vegetal en la que una célula, preferentemente, una célula que no es una célula vegetal o un protoplasto vegetal o un *E. coli*, que expresa una proteasa aspártica vegetal que carece de una planta funcional específica. Insertar dominio (IEP).

En algunos métodos, la proteasa aspártica vegetal se secreta de la célula y el método puede comprender la recogida de la proteasa aspártica vegetal que se ha secretado de la célula, por ejemplo, separando la proteasa aspártica vegetal secretada y otros componentes secretados de la célula o contenidos de otra manera dentro de los medios en los que crecen las células. El método puede comprender expresar la proteasa aspártica vegetal desde un vector contenido dentro de la célula o desde el genoma de la célula. La célula puede ser una célula eucariota. La célula puede ser una célula fúngica como una célula de levadura, por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*.

Descripción detallada

La invención incluye la combinación de los aspectos y características preferentes descritas, excepto cuando dicha combinación es claramente inadmisibles o se evita expresamente.

Los encabezamientos de cada sección utilizados en el presente documento tienen un fin organizativo simplemente y no debe interpretarse que limiten la materia objeto descrita.

A continuación, se ilustran aspectos y realizaciones de la presente invención a modo de ejemplo, haciendo referencia a las figuras adjuntas. Otros aspectos y realizaciones serán evidentes para las personas expertas en la materia.

Breve descripción de las figuras

A continuación, se explican las realizaciones y experimentos que ilustran los principios de la invención haciendo referencia a las figuras adjuntas en las que:

Figura 1. Electroforesis en gel de SDS-PAGE de enzima purificada de *K. lactis* (pC Δ IEP, denominado pAP).

Figura 2. Efecto de la actividad enzimática pAP en la descamación de células epidérmicas. Se aplicó a la superficie modelo la proteasa aspártica a una concentración final de 1 mg/ml durante 30 minutos, 3 horas, 6 horas y 12 horas. Se hizo el recuento de las células desprendidas en un hemocitómetro.

5 **Figura 3.** Estudio de la descamación enzimática de modelos de piel. Los modelos de piel se expusieron a pAP en las concentraciones finales 0,1 % y 0,5 %, a pH 4,5 y pH 5,5 durante tiempos de incubación: 30 min, 3 h y 6 h. Se hizo el recuento de las células desprendidas utilizando una cámara Neubaur.

10 **Figura 4.** Efecto del pH sobre la actividad de descamación enzimática de pAP. Se analizó la pAP a una concentración final de 0,1 %, a diferentes pH. Al cabo de 1 hora de incubación, se recogieron las muestras de la superficie de los modelos y se hizo el recuento de las células desprendidas.

15 **Figura 5.** Determinación de la viabilidad celular. Se sometieron a un ensayo de MTT los modelos de piel expuestos a la actividad enzimática de pAP para determinar la viabilidad celular del tejido. Después de los experimentos de desprendimiento, los modelos se incubaron durante 42 horas a una atmósfera de 37 ° C con 5 % de CO₂. Los modelos se incubaron en reactivo de ensayo MTT durante 3 h, el tinte formado se solubilizó en isopropanol y la absorbancia se midió a 570 nm. Para el cálculo de la viabilidad celular, se tomó la absorbancia del modelo incubado con PBS como 100 %.

20 **Figura 6.** Efecto de diferentes proteasas aspárticas sobre la descamación de células epidérmicas. Se aplicaron las proteasas aspárticas a la superficie del modelo y al cabo de 4 horas de incubación, se hizo el recuento de las células desprendidas con un hemocitómetro. Se probaron aproximadamente 10 HUT de cada enzima en tampón de citrato pH 5,0, a excepción de la renina que se probó a pH 6,0.

25 **Figura 7.** Secuencias de cardosinas B y A con y sin secuencia de IEP, secuencias de IEP y secuencias utilizadas en los ejemplos.

Realizaciones preferentes de la invención

30 Los autores de la invención han descubierto que las proteasas aspárticas vegetales, en particular las cardosinas, y en particular la cardosina B, presentan actividad de descamación cutánea, sin afectar la viabilidad celular.

35 La descamación es el desprendimiento de la piel, en particular el estrato córneo, la capa más externa de la epidermis. La descamación ocurre normalmente, en condiciones no patológicas y también puede ser el resultado de una lesión o enfermedad de la piel, por ejemplo, después del sarpullido del sarampión o la quemadura del sol.

40 La descamación de los corneocitos desde de la epidermis requiere la degradación enzimática de las estructuras del corneodesmosoma, compuestas de las proteínas corneodesmosina, desmogleina-1 y desmocolina-1. Se cree que el proceso de descamación implica la degradación proteolítica de los desmosomas, lo cual provoca la ruptura de las uniones cohesivas entre las células, permitiendo así el desprendimiento de corneocitos periféricos desde la superficie del estrato. En este proceso de exfoliación participan varias proteasas de serina, cisteína y aspárticas, incluyendo catepsina D, catepsina E y SASpasa. Por ejemplo, la patente internacional WO95/07688 divulga el papel de las enzimas de tipo tripsina del estrato córneo (proteasas serina) de la piel en la inducción de descamación cutánea.

45 Los autores de la invención han demostrado que las proteasas aspárticas de las plantas, particularmente las cardosinas y, particularmente, la cardosina B, tienen una mejor capacidad para inducir la descamación cutánea en comparación con las proteasas aspárticas de los mamíferos, incluyendo la catepsina D. Las proteasas aspárticas vegetales de la invención inducen a una mayor descamación cutánea durante un período tiempo determinado que el nivel de descamación cutánea inducido por la catepsina D. La cantidad de descamación cutánea se puede medir a través de cualquier método adecuado conocido en la técnica, como, por ejemplo, el recuento del número de células desprendidas en un hemocitómetro. El número de células desprendidas puede medirse al cabo de 1 hora, al cabo de 2 horas, al cabo de 3 horas, al cabo de 4 horas, al cabo de 5 horas o al cabo de 6 horas o más de exposición a la proteasa aspártica.

50 Preferentemente, las proteasas aspárticas vegetales de acuerdo con la invención no reducen la viabilidad celular, es decir, la viabilidad celular no es significativamente diferente de la viabilidad celular observada cuando las células no son expuestas a una proteasa aspártica vegetal de acuerdo con la invención. Por lo tanto, las proteasas aspárticas vegetales de acuerdo con la invención no presentan una actividad citotóxica significativa. La viabilidad celular puede medirse a través de cualquier método conocido en la técnica, como, por ejemplo, por un ensayo MTT.

60 Las proteasas aspárticas vegetales de la presente invención presentan actividad de descamación cutánea en un amplio intervalo de valores de pH. Preferentemente, las proteasas aspárticas vegetales de acuerdo con la invención son activas a un pH ligeramente ácido. Las proteasas aspárticas vegetales de acuerdo con la invención pueden ser activas a un pH de entre aproximadamente 3 y aproximadamente pH 7, entre aproximadamente pH 4 y aproximadamente pH 7, entre aproximadamente pH 4 y aproximadamente pH 5, entre aproximadamente pH 4 y

aproximadamente pH 6, entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 7, entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 6 o entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente pH 7.

Aplicaciones terapéuticas

5 Los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades y afecciones. En particular, los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles en el tratamiento de trastornos, enfermedades y afecciones de la piel y encuentran aplicación en el tratamiento de fibrosis (incluyendo fibrosis postquirúrgica), formación de adherencias tisulares y formación de cicatrices. Los compuestos y las composiciones de la invención son útiles en el tratamiento de acné, eccema, ictiosis y psoriasis. Los compuestos, composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse para potenciar la exfoliación epidérmica y/o potenciar la renovación de células epidérmicas, y para mejorar la textura y/o el aspecto de la piel.

15 Las proteasas aspárticas vegetales y las composiciones divulgadas en el presente documento son útiles para el tratamiento de cualquier afección para la que sería beneficiosa la inducción o la potenciación de la descamación cutánea. En particular, para tratar xerosis (sequedad de la piel, como la piel seca derivada de un tratamiento de VIH con Indinavir), acné, psoriasis, eccema y proliferaciones dérmicas o epidérmicas, ciertas lesiones tumorales benignas o malignas, hiperqueratosis reactiva, prevenir la atrofia epidérmica y/o dérmica, combatir la disfunción de la proliferación y/o diferenciación celular y evitar los efectos de los medicamentos contra el VIH como Indinavir.

Acné

25 El acné es una afección de la piel que tiene relación con los poros tapados (puntos negros y puntos blancos), granos inflamados (pústulas) y bultos más profundos (nódulos). El acné tiene lugar en la cara, así como en el cuello, el pecho, la espalda, los hombros y la parte superior de los brazos. Aunque la mayoría de los adolescentes desarrollan algún tipo de acné, es posible también que adultos de 20, 30, 40 años o incluso más, desarrollen acné. A menudo, el acné desaparece con el paso de los años, incluso sin tratamiento. El acné no tratado puede dejar cicatrices permanentes. Tratar el acné es importante para evitar las cicatrices del acné. Hay tres importantes factores que contribuyen a la formación y exacerbación del acné, la sobreproducción de aceite (sebo), la eliminación irregular de las células muertas de la piel provocando la irritación de los folículos pilosos de la piel y la acumulación de bacterias.

35 El acné es la enfermedad cutánea más común de la adolescencia, que afecta a más del 80 % de los adolescentes (de 13 a 18 años) en algún momento.¹² Las estimaciones de su frecuencia varían según las poblaciones de estudio y el método de evaluación empleado. En el Reino Unido se ha registrado una frecuencia de acné en una muestra de población de 14 a 16 años en un 50 %.¹³ En una muestra de adolescentes de escuelas de Nueva Zelanda, el acné estuvo presente en el 91 % de los hombres y el 79 % de las mujeres, y en una población similar en Portugal, la frecuencia fue del 82 %.¹⁴ El número de adultos con acné, incluyendo las personas mayores de 25 años, es cada vez mayor, si bien las razones de este aumento son inciertas.¹⁵

Eccema

45 El eccema (dermatitis atópica) es un tipo particular de reacción inflamatoria de la piel en la que aparecen normalmente vesículas (pequeñas zonas elevadas de tipo ampolla) en la primera etapa tras un eritema (enrojecimiento), edema (hinchazón), pápulas (protuberancias) y costras de la piel que van seguidas finalmente de la liquenificación (engrosamiento) y la descamación cutánea. El eccema causa característicamente prurito y ardor en la piel.

50 El eccema es muy común y puede ocurrir por primera vez a cualquier edad. Suele ser crónico y difícil de tratar y tiende a desaparecer y reaparecer. El prurito puede ser extremo y grave. Existen diversos tipos de eccema. La frecuencia de eccema es alta, con una estimación de 33 millones de personas afectadas solo en Estados Unidos.

Ictiosis

55 La ictiosis vulgar es una enfermedad genética de la piel que se caracteriza por la presencia de cantidades excesivas de escamas superficiales secas en la piel, causadas por una diferenciación epidérmica o un metabolismo anormales. Por lo general, es más grave en las piernas, pero también puede afectar a los brazos, las manos y el tronco en algunos casos. También puede estar asociada con dermatitis atópica, queratosis pilaris (pequeñas protuberancias en la parte posterior de los brazos) u otros trastornos de la piel. Por lo general, desaparece durante la edad adulta, pero puede repetirse en edad avanzada.

60 Otros tipos de ictiosis incluyen la ictiosis ligada al X, ictiosis laminar, hiperqueratosis epidermolítica, ictiosis tipo arlequín, síndrome de Netherton y síndrome de Sjogren-Larsson, aunque la ictiosis vulgar representa el 95 % de todos los casos de ictiosis. La ictiosis vulgar hereditaria (congénita) representa más del 95 % de los casos de ictiosis vulgar. Aparece por primera vez en la primera infancia. Se ha cartografiado el gen responsable de la ictiosis vulgar en la banda cromosómica 1q21. El producto de este gen es una sustancia llamada filagrina (FLG) que puede actuar como la "proteína de matriz de queratina" en las células del estrato córneo. El patrón de herencia es autosómico

dominante. La ictiosis vulgar adquirida, se desarrolla normalmente en la edad adulta y deriva de una enfermedad interna o el uso de ciertos medicamentos. La ictiosis vulgar hereditaria es una enfermedad común en Estados Unidos, con frecuencia de aproximadamente 1 caso por cada 300 personas. Dado que los síntomas mejoran con la edad, probablemente la verdadera frecuencia sea mayor. La ictiosis adquirida es extremadamente rara. Su frecuencia en Estados Unidos es desconocida. En el Reino Unido, se registró una incidencia de ictiosis vulgar de 1 de cada 250. En China, la ictiosis vulgar tiene una frecuencia del 2,29 %.

Psoriasis

La psoriasis es un trastorno de la piel crónico, genético, no contagioso que se caracteriza por prurito o dolor en los parches de piel gruesa y roja con escamas plateadas. Los parches escamosos causados por la psoriasis, conocidos como placas psoriásicas, son áreas de inflamación y producción excesiva de piel. El trastorno es una afección crónica recurrente que varía en gravedad desde parches menores localizados hasta cobertura completa del cuerpo. La psoriasis también puede causar inflamación de las articulaciones, lo cual se conoce como artritis psoriásica. Hay varias formas de enfermedad. Según los Institutos Nacionales de la Salud (NIH, por sus siglas en inglés), hasta 7.500.000 de estadounidenses (aproximadamente el 2,2 por ciento de la población) tienen psoriasis, con una estimación de 125 millones de afectados a nivel mundial. Cada año se producen entre 150.000 y 260.000 nuevos casos de psoriasis. La incidencia de la psoriasis suele verse afectada por el clima y la herencia genética de la población. Es menos común en los trópicos y en las personas de piel oscura y es sobre todo común en los caucásicos. Los costes totales, directos e indirectos de la psoriasis para la atención sanitaria de los pacientes se calculan en 11.250 millones de dólares americanos anuales a lo que se suma un 40 % por bajas laborales.¹⁶ Aproximadamente el 60 % de los pacientes con psoriasis solicitaron la baja laboral con promedio de 26 días al año debido a su enfermedad.¹⁷

Sujetos

El sujeto que se vaya a tratar (ya sea nivel terapéutico o estético) puede ser cualquier animal o ser humano. El sujeto es preferentemente mamífero, más preferentemente un ser humano. El sujeto puede ser un mamífero no humano, pero es más preferentemente un ser humano. El sujeto puede ser de sexo masculino o femenino. El sujeto puede ser un paciente. Los usos terapéuticos y cosméticos pueden ser en seres humanos o animales (uso veterinario).

Aplicaciones cosméticas

En algunos aspectos, la invención se refiere a un tratamiento cosmético que comprende la administración de una proteasa aspártica vegetal. "Cosmético" tal como se emplea en el presente documento no es terapéutico. El tratamiento cosmético se puede utilizar para mejorar el aspecto y/o la textura de la piel. El tratamiento cosmético puede utilizarse para mejorar el aspecto y/o textura de la piel. El tratamiento cosmético puede emplearse para mejorar la exfoliación epidérmica y/o mejorar la renovación de las células epidérmicas.

En algunos aspectos, la invención se refiere a un método de tratamiento cosmético que comprende la administración de una proteasa aspártica vegetal. "Cosmético", tal como se emplea en el presente documento es no terapéutico. Dichos métodos no implican el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.

Tal como se emplea en el presente documento, el término "método cosmético" no incluye un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia o un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal de acuerdo con el Artículo 53 (c) EPC.

El sujeto tratado a través de los métodos cosméticos divulgados en el presente documento puede ser un mamífero no humano, pero es más preferentemente un ser humano. El sujeto puede ser de sexo masculino o femenino. El sujeto no requiere inhibición de la inducción de descamación cutánea para beneficio terapéutico. En algunos casos, el sujeto no requiere descamación cutánea terapéutica en el sitio donde se aplicará el tratamiento cosmético.

La invención también proporciona una composición cosmética que comprende una proteasa aspártica vegetal. La composición se puede utilizar para mejorar el aspecto de la piel. Las composiciones cosméticas pueden formularse de manera similar a las composiciones farmacéuticas, tal como se describe más adelante. Se puede administrar al sujeto una cantidad cosméticamente eficaz de una proteasa aspártica vegetal. Es decir, una cantidad de proteasa aspártica vegetal efectiva para inducir un beneficio cosmético. Esto dependerá del sólido criterio del facultativo correspondiente, quien apreciará que las dosis apropiadas del compuesto activo o una composición que contiene el compuesto activo pueden variar de un paciente a otro.

Administración

El compuesto de la invención puede formularse para administración farmacéutica. Se puede utilizar cualquier vía de administración conveniente, ya sea de forma sistémica, periférica o tópica (es decir, en el lugar de la acción deseada). Preferentemente, el compuesto se formula para administración tópica. En realizaciones particulares de la

invención, los compuestos se administran en la piel.

El compuesto de la invención puede formularse para administración cosmética. Se puede utilizar cualquier vía de administración conveniente, ya sea de forma sistémica, periférica o tópica (es decir, en el lugar de la acción deseada). Preferentemente, el compuesto se formula para administración tópica. En realizaciones particulares de la invención, los compuestos se administran en la piel.

Para aplicaciones terapéuticas, la administración es preferentemente de una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esto suficiente para mostrar un beneficio para el individuo. La cantidad real administrada y la velocidad y el tiempo de administración dependerán de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, p.ej., las decisiones sobre la dosis, etc., es responsabilidad de los facultativos generales y otros médicos y normalmente tiene en cuenta el trastorno que se vaya a tratar, la afección del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos entre los facultativos. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins se pueden encontrar ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados.

Aunque es posible administrar el compuesto activo solo, preferentemente se presenta como una formulación farmacéutica o cosmética (p.ej., composición, preparación, medicamento) que comprende al menos un compuesto activo, tal como se ha definido, junto con uno o más otros ingredientes farmacéutica o cosméticamente aceptables perfectamente conocidos entre las personas expertas en la materia, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, vehículos, adyuvantes, excipientes, diluyentes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes de enmascaramiento, agentes colorantes, agentes aromatizantes y agentes edulcorantes farmacéuticamente o cosméticamente aceptables. La formulación puede comprender además otros agentes activos, por ejemplo, otros agentes terapéuticos o profilácticos.

Por lo tanto, la presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas y cosméticas, tal como se ha definido, y métodos para preparar una composición farmacéutica o cosmética que comprende mezclar al menos un compuesto activo, tal como se ha definido, junto con otro u otros ingredientes farmacéuticamente o cosméticamente aceptables perfectamente conocidos entre las personas expertas en la materia, p.ej., vehículos, adyuvantes, excipientes, etc. Si se formulan como unidades discretas (p.ej., comprimidos, etc.), cada unidad contiene una cantidad predeterminada (dosis) del compuesto activo.

Las expresiones "farmacéuticamente aceptable" y "cosméticamente aceptable", tal como se emplean en el presente documento, se refieren a compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas farmacéuticas, etc., que están dentro del alcance sólido criterio del facultativo correspondiente, que son adecuados para su uso en contacto con los tejidos del paciente en cuestión (p. ej., seres humanos) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, medidos con una relación de riesgo de beneficio razonable. Cada vehículo, adyuvante, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación.

Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica incluyen geles, pastas, pomadas, cremas, lociones y aceites, así como parches, emplastos adhesivos, vendajes, apósitos, formulaciones de liberación prolongada y depósitos.

La formulación puede prepararse para proporcionar una liberación rápida o lenta; una liberación inmediata, retardada, cronometrada o sostenida; o una combinación de las mismas.

Las pomadas se pueden preparar utilizando la proteasa aspártica vegetal y una base para pomada parafínica o miscible con agua.

Se pueden preparar cremas a partir del compuesto activo y una base de crema de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 % p/p de un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo, como propilen glicol, butano-1,3- diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilen glicol y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir deseablemente un compuesto que mejora la absorción o penetración del compuesto activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Entre los ejemplos de dichos potenciadores de penetración dérmica se incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados.

Las emulsiones pueden prepararse a partir del compuesto activo y una fase oleosa, que puede comprender opcionalmente simplemente un emulsionante (también conocido como un agente emulgente) o puede comprender una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o tanto una grasa como un aceite. Preferentemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizante. Asimismo, preferentemente se incluye tanto un aceite como una grasa. En combinación, el (los) emulsionante(s) con o sin estabilizador(es) forman lo que se conoce como cera emulsionante y la cera, en combinación con el aceite y/o la grasa forman lo que se conoce como base de pomada emulsionante que forma la

fase dispersa oleosa de las formulaciones en crema.

Los autores de la invención han demostrado que las proteasas aspárticas vegetales de la invención son activas a lo largo de un intervalo de pH. Siendo así, los compuestos y las composiciones de la presente invención pueden formularse y/o administrarse en tampones, diluyentes, aditivos o adyuvantes neutros, ligeramente alcalinos o ácidos.

Un tampón es una composición que, cuando se administra tópicamente en la piel, altera temporalmente el pH de la superficie de la piel. Un tampón ácido puede disminuir el pH de la piel a pH 6,0 o inferior, pH 5,5 o inferior, pH 5,0 o inferior, pH 4,5 o inferior, pH 4,0 o inferior, pH 3,5 o inferior o pH 3,0 o inferior. Preferentemente, el pH de la superficie de la piel no es inferior a pH 2,5 o inferior a pH 3,0. Un tampón neutro puede ajustar el pH de la piel entre aproximadamente pH 6 y 8. Un tampón ligeramente alcalino puede ajustar el pH de la piel entre aproximadamente pH 8 y 10. El tampón contiene un componente de tampón ácido, neutral o alcalino y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. El tampón puede neutralizar el pH normal promedio de la superficie de la piel con el tiempo a través de procesos cutáneos normales, como la transpiración. Los tampones ácidos pueden ser un ácido orgánico, ácido inorgánico o una mezcla de los mismos. Los tampones ácidos adecuados incluyen ácido láctico, ácido cítrico, ácido sórbico, ácido glicólico, ácido málico, ácido glucónico, ácido glucorónico, ácido succínico, citrato de sodio, sulfato de sodio, ácido fosfórico, bisulfato de sodio, bisulfato de potasio y mezclas de los mismos.

Las personas expertas en la materia apreciarán que la posología apropiada de los compuestos activos y las composiciones que comprenden los compuestos activos pueden variar de un paciente a otro.

Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultánea o secuencialmente dependiendo de la afección que se vaya a tratar.

Proteasas aspárticas vegetales

En la presente memoria descriptiva, una "proteasa aspártica vegetal" se refiere e incluye proteasas aspárticas que pueden obtenerse de células o tejidos vegetales, incluyendo plantas completas. Las proteasas aspárticas de las plantas incluyen cardosinas, ciprosinas, cenprosinas, fitepsinas y cinasas. En algunos casos, la proteasa aspártica vegetal de acuerdo con la invención no es una fitepsina. Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "proteasa aspártica vegetal" incluye mutantes de dichas proteasas, particularmente mutantes en los que el dominio IEP se ha hecho no funcional. Preferentemente, la mutación no desactiva la función de proteasa aspártica de la proteína. En realizaciones preferentes, la mutación es tal que el polipéptido resultante retiene al menos 50 %, más preferentemente uno entre al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la proteasa aspártica de tipo silvestre.

La expresión "proteasa aspártica vegetal modificada", tal como se emplea en el presente documento, describe una proteasa aspártica vegetal que contiene una o más modificaciones en comparación con una proteasa aspártica vegetal de tipo silvestre. Por ejemplo, puede contener una o más supresiones, sustituciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la proteasa aspártica vegetal tal como se produce en una planta.

Las cardosinas son ejemplos de proteasas aspárticas vegetales, obtenidas de cardo (*Cynara cardunculus*). La secuencia de aminoácidos de cardosina A y cardosina B es conocida (ver SEQ ID NO: 5 y 6).

Los autores de la invención han desarrollado un método de producción heterólogo para proteasas aspárticas vegetales en una levadura GRAS (*K. lactis*) que podría transferirse de manera efectiva para la producción a gran escala. Han utilizado el sistema de expresión de proteínas *K. lactis* de New England Biolabs y se realizaron varios procedimientos de optimización para mejorar la expresión de proteínas y los niveles de secreción. Se usaron cardosina A y cardosina B (proteasa aspártica vacuolar y extracelular del cardo (*Cynara cardunculus*), respectivamente) como modelos de trabajo.

Si bien algunos mecanismos de tráfico en las plantas parecen ser similares a los de las levaduras, existen varias variaciones, en particular con respecto a la presencia en plantas de múltiples tipos de vacuolas, que podrían resultar en que los receptores de direccionamiento vacuolar de levadura no reconozcan los VSS de proteasa aspártica. De hecho, se ha demostrado anteriormente que otras VSS de plantas del tipo CTPP no se reconocen en la levadura.⁹ Por el contrario, los resultados descritos en el presente documento indican que algunas VSS identificadas en proteasas aspárticas vegetales son reconocidas a través de los mecanismos de tráfico de la levadura y se pueden utilizar para redirigir el direccionamiento de proteínas. Estos resultados demuestran que el dominio IEP es funcional en plantas y levaduras.

Inserto específico de planta (IEP)

Cuando los autores de la invención generaron una construcción de Cardosina B (localizada normalmente extracelularmente), que carece del dominio IEP y la expresaron en levadura *K. lactis*, se observaron mayores niveles de expresión y secreción en ausencia del IEP, en comparación con la construcción de tipo silvestre de longitud

completa. Estos resultados demuestran que la eliminación del dominio IEP de todas las proteasas aspárticas de la planta (ya sea vacuolar o secretada) puede tener un impacto positivo en su secreción, en levaduras o en plantas.

El IEP es una inserción de aproximadamente 100 aminoácidos situada entre el dominio N-terminal y un dominio C-terminal de las "preproenzimas" precursoras de la mayoría de las proteasas aspárticas vegetales identificadas hasta ahora. El IEP solo se identifica en las proteasas aspárticas vegetales y es muy similar a las saposinas y proteínas de tipo saposina, cuya función biológica no se ha establecido completamente. Estructuralmente, el IEP comprende cinco α -hélices anfipáticas plegadas en un dominio globular compacto y unidas entre sí por tres puentes disulfuro (tal como se explica en Simoes y Faro 2004³). La secuencia de IEP no presentó homología con las proteasas aspárticas de mamíferos o microbianas, pero es muy similar a la de las proteínas de tipo saposina (SAPLIP). Una característica única del IEP es el intercambio de las porciones N y C terminales del dominio de tipo saposina, en el que la porción C-terminal de una saposina está unida a la porción N-terminal de la otra saposina. Por lo tanto, el IEP no es una verdadera saposina sino una swaposina.

Las proteasas aspárticas vegetales descritas en el presente documento pueden carecer de un dominio IEP funcional. El dominio IEP puede estar suprimido total o parcialmente o mutado de tal modo que se haga no funcional. La mutación puede implicar la modificación de una secuencia de oligonucleótidos que codifica la proteasa aspártica. Por ejemplo, la modificación puede ser una adición, supresión, inserción o sustitución en la secuencia de codificación.

Un dominio IEP puede tener una sustancial identidad con la SEC ID NO: 3 o la SEC ID NO: 4. Un dominio IEP puede tener al menos 70 % de identidad, al menos 75 % de identidad, al menos 80 % de identidad, al menos 85 % de identidad, al menos 90 % de identidad, al menos 95 % de identidad, al menos 98 % de identidad o 100 % de identidad con la SEC ID NO: 3 o la SEC ID NO: 4.

El dominio IEP puede tener una longitud cualquiera entre 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 120, 121, 122, 123, 24, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 o 150, aminoácidos. El dominio IEP puede tener una longitud en el intervalo de 80, a 120 aminoácidos o de 90 a 110 aminoácidos o de 95 a 105 aminoácidos o de 98 a 108 aminoácidos. El dominio IEP puede tener una longitud mínima de aproximadamente 80 aminoácidos, más preferentemente una entre 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105 o 106 aminoácidos. El dominio de IEP puede tener una longitud máxima de aproximadamente 130 aminoácidos, más preferentemente 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 120, 121, 122, 123, 24, 125, 126, 127, 128, 129 aminoácidos.

El dominio IEP de una proteasa aspártica vegetal funciona para regular el tráfico de cardosinas en la célula, por ejemplo, dirigiendo la proteína a la vacuola. De este modo, las proteasas aspárticas vegetales de acuerdo con la invención que carecen de un dominio IEP funcional tienen un tráfico alterado, por ejemplo, en comparación con las proteasas aspárticas vegetales que contienen un dominio IEP completo. Por ejemplo, una proteasa aspártica modificada que carece de un dominio IEP funcional puede no estar dirigida a la vacuola, mientras que la proteasa aspártica no modificada, como la proteína de tipo silvestre, podría dirigirse a la vacuola.

Las personas expertas en la materia pueden determinar fácilmente si una proteasa aspártica carece de un dominio IEP funcional a través de cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden aplicar agentes conocidos por afectar el tráfico de proteínas (por ejemplo, glicosidasas) a una célula para determinar si el tráfico de la proteasa aspártica modificada es afectado por el agente de la misma manera o de manera similar que la proteasa aspártica vegetal completa o de tipo silvestre. . Alternativamente o adicionalmente, se puede recurrir al fraccionamiento subcelular para determinar si están presentes las proteasas aspárticas modificadas y completas o de tipo silvestre, en una distribución similar dentro de una célula. Alternativamente o adicionalmente, se puede recurrir a inmunocitoquímica para determinar si la proteína se secreta de la célula o está presente en un compartimento celular diferente a una proteasa aspártica vegetal completa o de tipo silvestre.

La ausencia de un dominio IEP funcional puede ser suficiente para detener la recogida de proteasa aspártica vegetal en la vacuola y/o para aumentar la secreción de la proteasa aspártica vegetal desde la célula. En algunos casos, la ausencia de un dominio IEP funcional puede evitar por completo que la proteasa aspártica vegetal se localice en la vacuola, de manera tal que toda la proteasa aspártica vegetal producida por la célula se secrete sustancialmente de la célula.

El ácido aspártico de la planta que carece de un dominio IEP funcional puede ser cualquier ácido aspártico vegetal. Preferentemente, el ácido aspártico vegetal es de la familia Cardosina de proteasas aspárticas vegetales, es decir, una Cardosina mutante o modificada que carece de un dominio IEP funcional. En algunos casos, la proteasa aspártica vegetal puede mutarse posteriormente.

La modificación del dominio IEP para hacerla no funcional puede afectar las propiedades cinéticas de la proteasa aspártica vegetal. Por ejemplo, la proteasa aspártica vegetal modificada puede ser menos caseinolítica en comparación con la proteasa aspártica vegetal natural o de tipo silvestre. En algunos casos, la modificación de la IEP puede aumentar la especificidad de la proteasa aspártica vegetal para un sustrato. Por ejemplo, puede aumentar la especificidad de la proteasa aspártica vegetal para α -caseína.

Pro segmento

El prosegmento está situado en la terminal N de proteasas aspárticas vegetales. Está presente en la proteína precursora y normalmente se elimina por proteólisis durante la producción de la enzima activa madura desde el zimógeno inactivo. En algunos casos, las proteasas aspárticas vegetales de acuerdo con la invención se expresan con un prosegmento. El prosegmento comprende aproximadamente 40 aminoácidos.

Secuencia C-terminal

La secuencia C-terminal es una supuesta señal de direccionamiento de enzimas. Ciertas proteasas aspárticas vegetales pueden carecer de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos de aminoácidos, preferentemente 4 aminoácidos, del extremo C, en comparación con la forma natural de la proteasa aspártica. Por ejemplo, la cardosina A modificada de acuerdo con la invención puede carecer de AEAA del término C y la cardosina B puede carecer de AEAV.

Engarces

Tal como se emplea en el presente documento, el término "engarce" se refiere a una serie de restos de aminoácidos que se introducen en una secuencia de proteínas para reemplazar los restos de aminoácidos que se han eliminado. Por ejemplo, las proteasas aspárticas vegetales de la presente invención carecen de un dominio IEP funcional. Cuando se suprime total o parcialmente el dominio IEP de la proteasa aspártica vegetal de la invención, los aminoácidos suprimidos pueden reemplazarse por un engarce. El engarce puede permitir que dos o más regiones de la proteína que lo contienen se plieguen en la configuración tridimensional correcta.

El engarce puede comprender uno o más aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser todos iguales, por ejemplo, una pluralidad de restos de glicina. Alternativamente, los aminoácidos pueden ser diferentes. El engarce puede comprender una secuencia correspondiente a una secuencia desordenada del dominio IEP.

El engarce puede comprender entre 1 y 100, entre 1 y 50, entre 1 y 25 o entre 1 y 10 aminoácidos. El engarce puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos. En algunos casos, el engarce consiste en 1 a 7 restos de aminoácidos.

La presencia de un engarce puede afectar a las propiedades cinéticas de la proteasa aspártica vegetal. Por ejemplo, la introducción de un engarce puede hacer que la proteasa aspártica vegetal sea menos caseinolítica en comparación con la proteasa aspártica vegetal natural o de tipo silvestre. En algunos casos, el engarce puede aumentar la especificidad de la proteasa aspártica vegetal para un sustrato. Por ejemplo, la introducción de un engarce puede aumentar la especificidad de la proteasa aspártica vegetal para α -caseína.

Cardosinas

En la presente memoria descriptiva, un ácido nucleico de Cardosina puede ser cualquier ácido nucleico (ADN o ARN) que tenga una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido que tenga un grado especificado de identidad de secuencia con una de las SEC ID No. 5 y 6 de un transcrito de ARN de una cualquiera de estas secuencias, con un fragmento de una cualquiera de estas secuencias o con la secuencia complementaria de una cualquiera de estas secuencias o fragmentos. Alternativamente, un ácido nucleico de cardosina puede ser uno que se hibride con una de estas secuencias en condiciones de rigurosidad alta o muy alta. El grado especificado de identidad de secuencia puede ser de al menos 60 % a 100 % de identidad de secuencia. Más preferentemente, el grado especificado de identidad de secuencia puede ser uno entre al menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad.

En la presente memoria descriptiva, un polipéptido de cardosina puede ser cualquier péptido, polipéptido o proteína que tenga una secuencia de aminoácidos que tenga un grado especificado de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO. 1, 2, 5 o 6 o con un fragmento de una de estas secuencias. La cardosina puede ser o tener un grado especificado de identidad de secuencia con la cardosina A depositada en GenBank con el número de acceso Q9XFX3.1 (GI: 75267434). La cardosina puede ser o tener un grado especificado de identidad de secuencia con la cardosina B depositada en GenBank con el número de acceso Q9XFX4.1 (GI: 75338567).

El grado especificado de identidad de secuencia puede ser de al menos 60 % a 100 % de identidad de secuencia. Más preferentemente, el grado especificado de identidad de secuencia puede ser uno de al menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad.

Identidad de secuencia

5 El porcentaje de identidad de la secuencia (%) se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos en la secuencia enumerada dada después de alinear las secuencias e introducir huecos si es necesario, para conseguir la máxima identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La identidad de secuencia se calcula preferentemente en toda la longitud de las correspondientes secuencias.

10 El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras conocidas entre las personas expertas en la materia, por ejemplo, utilizando un software informático de dominio público como el software ClustalW 1.82, T-coffee o megalign (DNASTAR). Cuando se utiliza dicho software, los parámetros por defecto son: Penalización por hueco abierto de proteína = 10,0, penalización por extensión de hueco de proteína = 0,2, Matriz de proteína = Gonnet, Proteína/ADN ENDGAP = -1, Proteína/ADN GAPDIST = 4.

15 En ciertos aspectos, la invención se refiere a compuestos que son péptidos/polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 60 % con una secuencia dada. Alternativamente, esta identidad puede ser cualquiera entre un 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad de secuencia.

20 La identidad de las secuencias de ácido nucleico puede determinarse de una manera similar que implica el alineamiento de las secuencias y la introducción de huecos, si es necesario, para conseguir la máxima identidad de la secuencia, así como el cálculo de la identidad de la secuencia en toda la longitud de las secuencias correspondientes.

25 En ciertos aspectos, la invención se refiere a compuestos que son ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 60 % con una secuencia dada. Alternativamente, esta identidad puede ser cualquiera entre un 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad de secuencia.

30 Ciertos aspectos de la invención se refieren a proteasas aspárticas vegetales completas (es decir, que comprenden sustancialmente todos los dominios presentes en la proteína de tipo silvestre). Por ejemplo, la cardosina A puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene un grado especificado de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 3 o la cardosina B puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene un grado especificado de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 4.

35 Preferentemente, las Cardosinas de la invención carecen de un dominio IEP funcional. Por ejemplo, la Cardosina B puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene un grado especificado de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 1, y la Cardosina A puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene un grado especificado de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 2.

40 En ciertos aspectos de la invención, el compuesto de la invención puede ser un fragmento de proteína que retiene las propiedades y/o los efectos terapéuticos o cosméticos de las proteasas aspárticas vegetales descritas en el presente documento. Por ejemplo, el compuesto puede ser un fragmento de Cardosina A o B que tiene actividad proteasa y/o induce la descamación cutánea.

45 Un fragmento puede comprender una secuencia de nucleótidos o aminoácidos que codifica una porción de la secuencia de longitud completa correspondiente. En la presente memoria descriptiva, la secuencia de longitud completa correspondiente puede ser una de las SEC ID No. 1, 2, 5 o 6. Dicha porción puede tener una longitud definida y puede tener una longitud mínima y/o máxima definida.

50 Por consiguiente, el fragmento puede comprender al menos, es decir, tener una longitud mínima de, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % de la secuencia de longitud completa correspondiente. El fragmento puede tener una longitud máxima, es decir, no más largo que, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % de la secuencia de longitud completa correspondiente. El fragmento puede tener una longitud en cualquier lugar entre dicha longitud mínima y máxima.

55 El fragmento puede comprender al menos, es decir, tener una longitud mínima de, al menos 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 360, 377, 380, 383, 400, 420, 440, 460, 480 o 500 aminoácidos. El fragmento puede tener una longitud máxima, es decir, no más de 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 377, 380, 383, 400, 420, 440, 460, 480 o 483 aminoácidos.

60 Aunque las proteasas aspárticas vegetales de tipo silvestre serán útiles en las aplicaciones terapéuticas y cosméticas descritas en el presente documento, en algunas realizaciones, la proteasa aspártica vegetal puede ser una proteasa aspártica vegetal modificada o mutante, como, por ejemplo, una Cardosina mutante o modificada. La

proteasa aspártica vegetal se puede mutar en relación con la proteasa aspártica vegetal genómica o de tipo silvestre, que lleva una o más alteraciones al ácido nucleico que codifica la proteasa aspártica vegetal y/o a la secuencia de aminoácidos de la proteasa aspártica vegetal. La alteración puede adoptar la forma de una adición, inserción, sustitución o supresión.

5 En algunas realizaciones de la invención, la proteasa aspártica vegetal está mutada de manera que no tiene un dominio IEP funcional. En algunos casos, el dominio IEP está total o sustancialmente ausente. En otros, la al menos una mutación está incluida en la proteína y/o la secuencia de ácidos nucleicos, de manera que el dominio IEP de la proteasa aspártica no se transcribe completamente, se transcribe incorrectamente o no es funcional de otra forma. Las mutaciones pueden ser mutaciones puntuales o mutaciones mayores, en donde se añaden, sustituyen, suprimen o insertan uno o más pares de bases de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteasa aspártica. En algunos casos, la mutación es aquella que hace que los ácidos nucleicos subsiguientes se transcriban fuera del marco, dando lugar así a un producto de proteína no funcional. En otros casos, la mutación de un solo par de bases causa una alteración en la secuencia de la proteína de tal manera que el producto de proteína no es funcional. Cuando la mutación hace que los ácidos nucleicos subsiguientes se transcriban fuera de marco, puede ser necesario incluir un cambio adicional aguas abajo de la primera mutación para restaurar la transcripción de una parte subsiguiente de la proteína, p.ej., después de algunos o todos los dominios IEP, de vuelta hacia el marco.

20 Los métodos para introducir mutaciones son conocidos en la técnica y las personas expertas podrán apreciar enseguida los métodos adecuados para crear una proteasa aspártica vegetal modificada o mutante de acuerdo con la invención. Preferentemente, las mutaciones se introducen por mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo a través de mutagénesis por PCR. La mutagénesis por PCR es un método para generar mutaciones puntuales en un plásmido bicatenario e implica el uso de dos cebadores de oligonucleótido sintéticos que contienen la mutación deseada, cada uno complementario de las cadenas opuestas de un vector que contiene la proteasa aspártica vegetal que se va a mutar.

Métodos para producir una proteasa aspártica vegetal

30 Las proteasas aspárticas vegetales se pueden producir de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica, como, por ejemplo, la fermentación microbiana, cultivo de células de mamíferos, insectos o plantas.

Ciertos métodos de acuerdo con la invención implican la expresión de una proteasa aspártica vegetal que carece de un dominio IEP funcional en una célula. El método comprende opcionalmente además la etapa de recogida de la proteasa aspártica vegetal que ha sido secretada desde la célula.

35 Las técnicas de biología molecular adecuadas para la producción de proteasas aspárticas vegetales de acuerdo con la invención en células son muy conocidas en la técnica, como, por ejemplo, las expuestas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

40 La proteasa aspártica vegetal puede expresarse a partir de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteasa aspártica vegetal. La secuencia de nucleótidos puede estar contenida en un vector presente en la célula o puede incorporarse en el genoma de la célula.

45 Un "vector", tal como se utiliza en el presente documento, es una molécula de oligonucleótido (ADN o ARN) utilizada como vehículo para transferir material genético extraño a una célula. El vector puede ser un vector de expresión para la expresión del material genético extraño en la célula. Dichos vectores pueden incluir una secuencia promotora unida operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia del gen que se va a expresar. Un vector también puede incluir un codón de terminación y potenciadores de expresión. Puede emplearse cualquier vector, promotor, potenciador y codón de terminación adecuado conocido en la técnica para expresar proteasas aspárticas vegetales a partir de un vector de acuerdo con la invención. Entre los vectores adecuados se incluyen plásmidos, vectores binarios, vectores virales y cromosomas artificiales (por ejemplo, cromosomas artificiales de levadura).

55 En la presente memoria descriptiva, la expresión "unido operativamente" puede incluir la situación en la que una secuencia de nucleótidos seleccionada y una secuencia de nucleótidos reguladora (por ejemplo, un promotor y/o un potenciador) están unidas covalentemente de tal manera que se sitúa la expresión de la secuencia de nucleótidos bajo la influencia o control de la secuencia reguladora (formando así un casete de expresión). Por lo tanto, una secuencia reguladora está unida operativamente a la secuencia de nucleótidos seleccionada si la secuencia reguladora es capaz de efectuar la transcripción de la secuencia de nucleótidos. Cuando sea apropiado, la transcripción resultante se puede traducir a una proteína o polipéptido deseado.

60 Puede utilizarse cualquier célula adecuada para la expresión de polipéptidos para producir proteasas aspárticas vegetales de acuerdo con la invención. La célula puede ser un procariota o eucariota. Preferentemente, la célula es una célula eucariótica como, por ejemplo, una célula de levadura, una célula vegetal, una célula de insecto o una célula de mamífero. En algunos casos, la célula no es una célula procariota porque algunas células procariotas no permiten las mismas modificaciones postraduccionales que los eucariotas. Por otra parte, son posibles niveles de

expresión muy altos en eucariotas y es más fácil purificar las proteínas a partir de eucariotas utilizando etiquetas apropiadas. Pueden utilizarse asimismo plásmidos específicos que mejoran la secreción de la proteína en el medio.

En algunas realizaciones, la célula no es una célula vegetal o una célula protoplasto vegetal.

5 En algunas realizaciones preferentes, la célula es un hongo (que incluye levaduras y mohos) o un eucariota microbiano o un eucariota de una sola célula, preferentemente una levadura del género *Kluyveromyces*, *Rhizomucor*, *Endothia*, *Aspergillus* o *Saccharomyces*.

10 Las células de levadura adecuadas incluyen *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhizomucor meihei*, *Endothia parasitica*, *Rizomucor pusillus*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura puede ser una levadura GRAS (considerada generalmente como segura), es decir, una levadura calificada como GRAS según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).

15 Los métodos para producir la proteasa aspártica vegetal pueden implicar el cultivo o la fermentación de una célula eucariota modificada para expresar la proteasa aspártica vegetal. El cultivo o la fermentación se puede realizar en un biorreactor provisto de un suministro adecuado de nutrientes, aire/oxígeno y/o factores de crecimiento. Las proteínas secretadas se pueden recoger separando el medio de cultivo/caldo de fermentación de las células, extrayendo el contenido de proteínas y separando proteínas individuales para aislar proteasa aspártica secretada. Las técnicas de cultivo, fermentación y separación son muy conocidas entre las personas expertas en la materia.

20 Los biorreactores incluyen uno o más vasos en los que se pueden cultivar células. El cultivo en el biorreactor puede tener lugar de forma continua, introduciendo un flujo continuo de reactivos y saliendo un flujo continuo de células cultivadas desde el reactor. Alternativamente, el cultivo puede tener lugar de forma discontinua. El biorreactor lleva un seguimiento y controla las condiciones del entorno como el pH, el oxígeno, los caudales de entrada y salida y la agitación dentro del vaso, de manera que se proporcionan condiciones óptimas para las células que se están cultivando.

30 Después del cultivo de células que expresan una proteasa aspártica vegetal, preferentemente, se aísla la proteasa aspártica vegetal. Se puede aplicar cualquier método adecuado para separar proteínas del cultivo de células conocido en la técnica. Para aislar una proteína de interés de un cultivo, puede ser necesario separar primero las células cultivadas de los medios que contienen la proteína de interés. Si la proteína de interés se secreta desde las células, se pueden separar las células del medio de cultivo que contiene la proteína secretada por centrifugación. Si la proteína de interés se acumula dentro de la célula, por ejemplo, en la vacuola de la célula, será necesario romper las células antes de la centrifugación, por ejemplo, utilizando sonicación, congelación-descongelación rápida o lisis osmótica. La centrifugación producirá un aglomerado que contiene las células cultivadas o los residuos celulares de las células cultivadas y un sobrenadante que contiene el medio de cultivo y la proteína de interés.

40 Puede ser deseable entonces aislar la proteína de interés del sobrenadante o del medio de cultivo, que puede contener otras proteínas y componentes que no son proteína. Un enfoque común para separar componentes de proteína de un sobrenadante o medio de cultivo es por precipitación. Se hace precipitar las proteínas de diferentes solubilidades a diferentes concentraciones de agente de precipitación, como el sulfato de amonio. Por ejemplo, a bajas concentraciones de agente de precipitación, se extraen proteínas solubles en agua. De este modo, al agregar diferentes concentraciones crecientes de agente de precipitación, se pueden distinguir proteínas de diferentes solubilidades. Posteriormente se puede emplear diálisis para eliminar el sulfato de amonio de las proteínas separadas.

50 Otros métodos para distinguir diferentes proteínas son conocidos en la técnica, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de tamaño, que pueden utilizarse como una alternativa a la precipitación o pueden realizarse después de la precipitación.

Una vez que se ha aislado la proteína de interés del cultivo, puede ser necesario concentrar la proteína. Se conocen en la técnica diversos métodos para concentrar una proteína de interés, como ultrafiltración o liofilización.

55 Puede mezclarse una proteasa aspártica vegetal que se ha aislado de una célula con un vehículo, adyuvante o diluyente para formar un producto que comprende una composición que contiene la proteasa aspártica vegetal. El producto formado puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, líquido, sólido, polvo, crema y puede ser adecuado para al menos cualquiera de los siguientes usos: como una preparación cosmética o terapéutica, como un detergente o jabón en polvo, como modificador de alimentos, como un ablandador de carne, como quitamanchas, como suavizante de cuero, como sustituto de cuajo.

Métodos para promover la acumulación de un polipéptido de interés

65 La invención proporciona también métodos para promover la acumulación de un polipéptido de interés en la vacuola de una célula, particularmente una célula vegetal. Dichos métodos implican expresar una construcción de polipéptido

en la célula, comprendiendo la construcción la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés y la secuencia de aminoácidos de un dominio IEP. Las secuencias de aminoácidos están preferentemente unidas covalentemente para formar una única secuencia de aminoácidos contigua que forma la construcción de polipéptido. Siendo así, en algunas realizaciones, la construcción de polipéptido puede ser una proteína de fusión.

5 El dominio IEP puede incluirse en la secuencia de aminoácidos de la construcción en cualquier posición. En algunas realizaciones, el dominio IEP puede añadirse en uno cualquiera entre el extremo N, el extremo C o una posición entre los extremos N y C.

10 El polipéptido de interés puede ser cualquier polipéptido, pero preferentemente no es un polipéptido que codifica normalmente (es decir, en la secuencia de tipo silvestre) un dominio IEP. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido de interés no es una proteasa aspártica, y en algunas realizaciones el polipéptido de interés no es una proteasa aspártica vegetal.

15 El polipéptido de interés es preferentemente un polipéptido que forma una proteína que tiene una actividad medible, p.ej., la unión a otra molécula o actividad enzimática. La construcción de polipéptido retiene preferentemente dicha actividad medible, si bien el nivel de actividad puede reducirse o aumentarse en comparación con el polipéptido de interés de tipo silvestre. Como tal, el polipéptido tendrá normalmente una longitud mínima de al menos aproximadamente 50 aminoácidos, y más preferentemente uno entre aproximadamente 60, 70, 80, 90, 100, 110, 20 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 o 300 aminoácidos.

En algunas otras realizaciones, el polipéptido de interés puede ser un péptido pequeño y puede tener una longitud de menos de aproximadamente 50 aminoácidos.

25 La construcción de polipéptido puede expresarse a partir de una secuencia de nucleótidos que codifica la construcción de polipéptido. La secuencia de nucleótidos puede estar contenida en un vector presente en la célula o puede incorporarse en el genoma de la célula.

30 Las técnicas de biología molecular adecuadas para la producción de proteasas aspárticas vegetales según la invención en células son muy conocidas en la técnica, como pueden ser las expuestas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

35 En la descripción que se adjunta a continuación, se exponen detalles de una o más realizaciones de la invención, incluyendo detalles específicos del mejor modo de llevar a cabo la invención contemplado por los autores de la invención a modo de ejemplo. Para las personas especializadas será evidente que es posible poner en práctica la presente invención sin limitarse a estos detalles específicos.

Ejemplos

40 Ejemplo 1 - Síntesis de cardosina B en *K. lactis*

Cepas y condiciones de crecimiento.

45 Todas las construcciones y propagaciones de plásmidos se realizaron utilizando la cepa Top10F 'de *Escherichia coli* (Invitrogen). Se cultivaron las células bacterianas a 37 °C en medio LB (Formulación de Miller - Invitrogen) líquido y sólido (agar al 1,5 %), suplementado con ampicilina a 100 µg/ml (GE-Healthcare). Se adquirió la cepa *Kluyveromyces lactis* GG799 de New England Biolabs y se usó como cepa hospedadora para los estudios de expresión de proteínas recombinantes. Se cultivaron las células de *K. lactis* y se mantuvieron en medio YPD (bactopeptona al 2 %, extracto de levadura al 1 %, glucosa al 2 %) mientras que los experimentos de expresión se 50 realizaron en YPGal (bactopeptona al 2 %, extracto de levadura al 1 %, galactosa al 4 %) como medio de cultivo, ambos a 30 °C con agitación. Se seleccionaron las células de *K. lactis* recombinantes sobre una base sólida de carbono de levadura (New England Biolabs) suplementada con placas de acetamida 5 mM (New England Biolabs).

Subclonación de proCardosinBΔIEP pKLACI

55 Se realizaron los procedimientos de clonación y subclonación de acuerdo con las instrucciones del fabricante y utilizando técnicas convencionales de clonación de biología molecular. Se amplificó por PCR la construcción proCardosinB que carece de la región IEP (pCBAIEP, también denominada en este documento Bwo), utilizando la construcción pCBAIEP/TA como plantilla, con el fin de introducir aguas arriba y aguas abajo del ADNc los sitios de restricción XhoI y Sail, respectivamente. El par de oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR fue: 60 pCB-XhoI (CTCGAGAAAAGAATGGTCTCCAACGGCGGATTGCTTC [SEC ID NO: 7]) y pCB-Sall (GTGACTCAAAGTCTTCTGCAAATCCCATCGTAAC [SEC ID NO: 8]). Después de la amplificación, se clonó el producto de la PCR en el vector de clonación pGEM (Promega) y después se subclonó en la expresión integradora pKLACI (NEB). El proceso de subclonación se realizó por escisión/ligación en los sitios de restricción XhoI/Sail, dando como resultado la clonación de pCBAIEP en el marco con la secuencia líder de secreción del factor de α- 65 apareamiento.

Construcción de cepas recombinantes de K. lactis

Se linearizó el plásmido recombinante pCBAIEP/pKLAC1 por digestión con SacI (NEB), para obtener los fragmentos de casete de inserción que se utilizaron después en la etapa de transformación de *K. lactis*. Se utilizó un total de 2 µg de ADN en la transformación de *K. lactis* GG799. Este proceso se realizó por electroporación con un aparato "Gene Pulser" (BioRad), utilizando las siguientes condiciones de electroporación: 1,5 KV, 25 mF y 200 Ohm. Los transformantes positivos se seleccionaron sobre la base de su capacidad de crecimiento en medios de acetamida YCB y los clones de múltiples integrantes seleccionados por PCR de células completas, siguiendo las instrucciones descritas en los protocolos del "Kit de expresión de *K. lactis*" (NEB).

Expresión y purificación de mutantes de pCBAIEP heterólogos

Se seleccionó un clon de *K. lactis* recombinante integrativo para la construcción pCBAIEP y se hizo crecer en medio YPD, a 30 °C con agitación, durante 16 h. Se diluyeron los cultivos a DO600 nm de 0,3 en medios YPGal e incubados a 30 °C, con agitación durante y 4 días. A continuación, se centrifugaron los cultivos y se filtraron secuencialmente los sobrenadantes a través de filtros de 0,8 µm, 0,45 µm y 0,2 µg. Se concentraron las muestras y se activaron por dilución 1:10 con un tampón de acetato de sodio 0,5 M, pH 4,0, a 37 °C. La primera etapa de purificación fue cromatografía de exclusión por tamaño. Se aplicaron las muestras a una columna S200 26/60 (GE-Healthcare) y se eluyeron las proteínas con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,1 M a un caudal de 1 ml/min. Se agruparon las fracciones y se aplicaron a intercambio iónico en un Mono Q, utilizando el tampón Tris-HCl 20 mM a pH 7,5. A continuación, se eluyeron las proteínas luego con un gradiente lineal de 0-0,5M NaCl, a un caudal de 0,75 ml/min. Los procedimientos de expresión y purificación fueron seguidos por un análisis SDS-PAGE (ver Figura 1).

Este método de expresión y purificación tiene como resultado la producción de una enzima con base-origen vegetal en cantidades considerables (3 mg/l) y con un alto nivel de pureza.

Ejemplo 2 - pAP induce descamación*Modelo de piel en 3D ("EpiSkin'-SkinEthic (L'Oreal®), y" Prueba cutánea epidérmica (EST-1000-CellSystems))*

Se realizaron dos rondas de experimentos utilizando modelos de piel. En ambos experimentos, se aplicó la muestra de enzima (denominada aquí pAP) en la superficie del modelo y se incubó cada modelo durante diferentes periodos de incubación a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂. Después de la incubación, se recogió cada muestra de la parte superior del modelo, se centrifugó y se hizo el recuento de las células desprendidas en un hemocitómetro. Se lavó la superficie de los modelos con PBS y se transfirieron los modelos a una nueva placa con medio de cultivo reciente y se incubaron en las mismas condiciones.

En la primera ronda de experimentos, se analizó la actividad de descamación durante tres periodos de incubación y dos valores de pH diferentes. Se analizó pAP en una formulación final de 0,1 % (p/v), en tampón citrato de sodio 0,1 M, pH 4,0 y pH 5,0. Se utilizó la muestra de tripsina/EDTA (0,025 %) como control positivo y una muestra de tampón pH 4,0 como control negativo. Los resultados se muestran en la Figura 2.

En la segunda ronda de experimentos, se analizó la proteína para las concentraciones de 1 mg/ml (0,1 %) y 5 mg/ml (0,5 %) y para diferentes periodos de incubación. También se estudió la dependencia del pH de la actividad de descamación. Se determinó el modelo de viabilidad celular a través del método de ensayo MTT, 42 h después de la incubación enzimática. Los resultados se muestran en las figuras 3 y 4.

Ensayo de MTT

Se realizó la prueba MTT para analizar el efecto de la enzima en la viabilidad celular del modelo de piel. Tras la exposición a la acción enzimática, se incubó cada modelo en medio de cultivo fresco a una atmósfera de 37 °C con 5 % de CO₂, durante 24 h. Se cambió el medio y se incubaron los modelos durante otras 18 horas en las mismas condiciones. Después de este periodo de recuperación, los modelos se incubaron con la solución de MTT durante 3 horas y se solubilizó el colorante convertido utilizando isopropanol. Se midió la absorbancia a 570 nm. Véase la figura 5.

Se demostró que la enzima pAP tiene una actividad de descamación de células epidérmicas. Los resultados indican que la pAP es aproximadamente 13 veces más efectiva para causar el desprendimiento celular que un control de la solución tampón y aproximadamente 3 veces más efectiva para causar el desprendimiento celular que el control positivo de tripsina/EDTA (0,025 % p/v), a un pH de 4 y a una concentración del 0,1 % (p/v), en tampón citrato de sodio 0,1 M.

El ensayo de viabilidad MTT demuestra que en diferentes intervalos de pH y concentraciones, la enzima es perfectamente tolerada y, por lo tanto, podría utilizarse en diferentes intervalos de concentraciones para diferentes indicaciones terapéuticas y aplicaciones no terapéuticas sin dañar las células no descamadas restantes.

La enzima pAP tiene capacidad de descamación mayor que la renina o la catepsina D (una proteasa aspártica de mamífero relacionada con en el proceso natural de descamación cutánea).

Ejemplo 3 - Comparación de PAP con dos proteasas aspárticas diferentes

Este conjunto de experimentos tuvo como meta principal la comparación entre la actividad de descamación enzimática de dos proteasas aspárticas diferentes (catepsina D y renina) y la actividad de cardosina B (pAP). Además, se realizaron experimentos de dependencia de pH de la actividad enzimática de descamación, durante un período de incubación más corto, para determinar el efecto del proceso normal de neutralización de la piel.

Actividad de descamación enzimática de cardosina B, catepsina D y renina EpiSkin "-SkinEthic (L'Oreal®)

Se realizó una ronda de experimentos para cada enzima proteolítica, utilizando modelos de Episkin. Tal como se ha descrito anteriormente, se aplicaron las muestras de enzimas en la superficie del modelo y se incubaron los modelos durante 4 h, a 37 ° C, en una atmósfera de 5 % de CO₂. Tras la incubación, se recogió cada muestra de la parte superior del modelo, se centrifugó y se hizo el recuento de las escamas separadas en un hemocitómetro. Se analizaron las enzimas (130 HUT/mg) utilizando aproximadamente 10 unidades de enzimas HUT, en tampón de citrato 0,1 M, pH 5,0. Se analizó la renina a su pH óptimo - pH 6,0 y se utilizó el tampón de citrato pH 5,0 como control negativo. Véase la figura 6.

Dependencia del pH de la actividad de descamación enzimática

Se estudió la dependencia del pH de la actividad de descamación, analizando un período de incubación más corto. Después de una lesión, el tiempo de recuperación de la piel es de entre aproximadamente 30 minutos y 1 hora, si el agente es un agente no tóxico. En estos ensayos, se incubó pAP durante 1 h, en tampón citrato de pH 4,0, pH 5,0, y en PBS pH 7,0, a 37 ° C en una atmósfera de 5 % CO₂. Véase la Figura 7. Si bien presenta una actividad de descamación a pH 7, la actividad de la pAP se potencia en gran medida a pH 4,0 y pH 5,0, lo cual está en consonancia con el pH óptimo de las cardosinas (ref. 10)

Referencias

- 1 Vitale A & Hinz G, 2005. Trends in Plant Sci, 10 (7): 316 - 323
- 2 Törmakangas K et al, 2001. Plant Cell, 13: 2021-2032
- 3 Simões I y Faro C, 2004. Eur. J. Biochem. 271, 2067-2075
- 4 Törmakangas K et al, 2001. Plant Cell, 13: 2021-2032
- 5 Ramalho-Santos M et al, 998. Eur J Biochem, 255: 133-138
- 6 Duarte AS, et al, 2005. Current Drug Disc Tech, 2: 37-44
- 7 Publicación de la patente PCT N° WO9507687
- 8 Publicación de patente japonesa No. JP2000247907
- 9 Publicación de patente de Estados Unidos No. US2003040047
- 10 Verissimo P et al (1996) Eur J Biochem. 235 (3): 762-8.
- 11 Verissimo P et al (1996) Eur J Biochem, 762-768
- 12 Chu TC, 1997. Medicine, 25: 30-33.
- 13 Smithard A y otros, 2001. Br J Dermatol, 145: 274-279
- 14 Pearl A et al, 1998. NZ Med J, 111.269-271
- 15 Cunliffe WJ, 1998. J Cutan Med Surg, 2 (supl. 3): 7-13
- 16 Fowler JF et al, 2008. J Am Acad Dermatol, 59 (5): 772-80
- 17 Horn EJ et al, 2007. J Am Acad Dermatol, 57 (6): 963-71
- 18 Egas C et al, 2000. J. Biol. Chem, 275, 38190-38196
- 19 Claverie-Martin et al, 2007. Industrial Enzymes 207-219

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteasa aspártica vegetal para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia, en donde el método implica la inducción de descamación cutánea, y en donde la proteasa aspártica vegetal es una Cardosina o un mutante de la misma, en donde la proteasa aspártica vegetal tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.
- 10 2. La proteasa aspártica vegetal para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método es para el tratamiento de una enfermedad, un trastorno o una afección de la piel.
- 15 3. La proteasa aspártica vegetal para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde la proteasa aspártica vegetal es para su uso en el tratamiento de al menos una entre xerosis, eccema, acné, psoriasis o ictiosis.
- 20 4. La proteasa aspártica vegetal para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la proteasa aspártica vegetal carece de un dominio de inserto específico de plantas (IEP) con función de señal de direccionamiento vacuolar normal.
- 25 5. Un método cosmético para mejorar el aspecto de la piel de un sujeto, comprendiendo el método la administración de una proteasa aspártica vegetal en la piel, en donde la proteasa aspártica vegetal es una Cardosina, o un mutante de la misma, teniendo la proteasa aspártica vegetal al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, y en donde el sujeto no requiere la inducción de descamación para fines terapéuticos en el sitio en el que se aplica el tratamiento cosmético.
- 30 6. Un método cosmético de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la proteasa aspártica vegetal carece de un dominio de inserto específico de plantas (IEP) con función de señal de direccionamiento vacuolar normal.
- 35 7. Una composición que comprende una proteasa aspártica vegetal Cardosina aislada o mutante de la misma que se formula para administración tópica, en donde la proteasa aspártica vegetal Cardosina aislada tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 en donde la composición se prepara como una pomada, una crema o una emulsión.
- 40 8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la proteasa aspártica vegetal Cardosina aislada carece de dominio de inserto específico de plantas (IEP) con función de señal de direccionamiento vacuolar normal.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8 que es una composición farmacéutica o un medicamento.
10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 que es una composición cosmética.

M pCBΔIEP

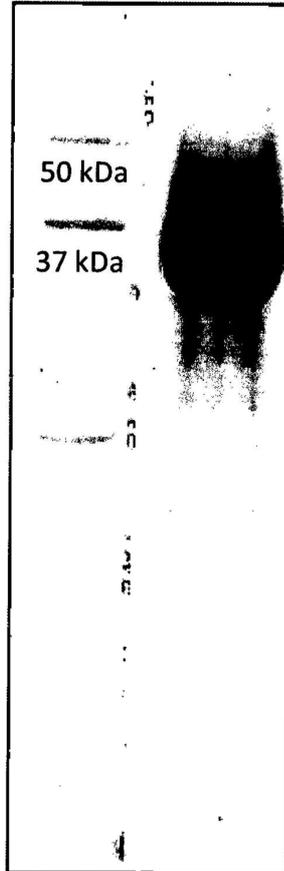


Figura 1

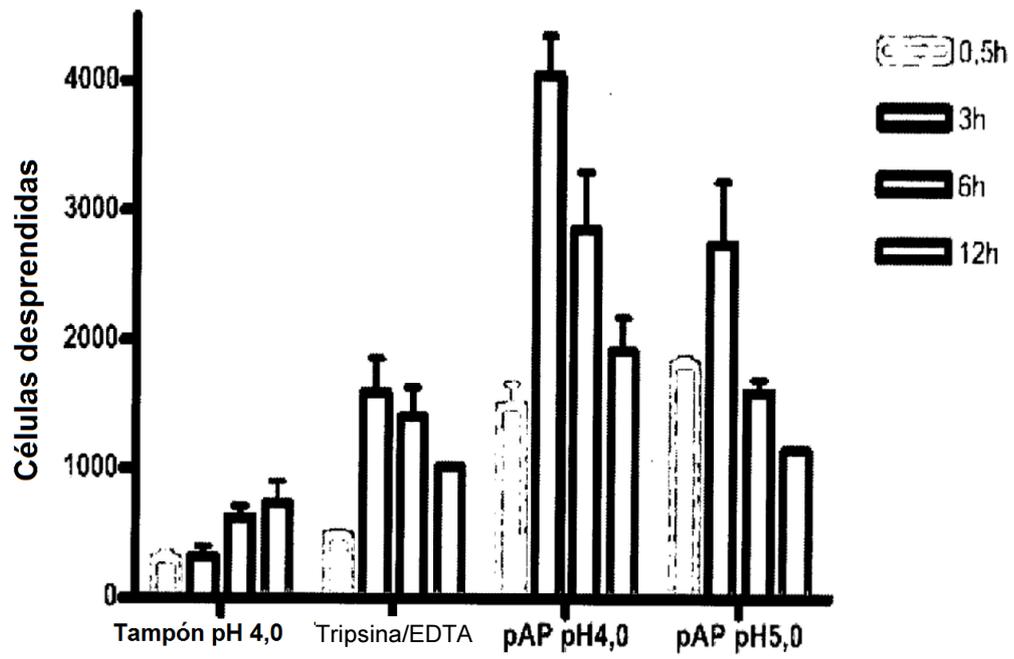


Figura 2

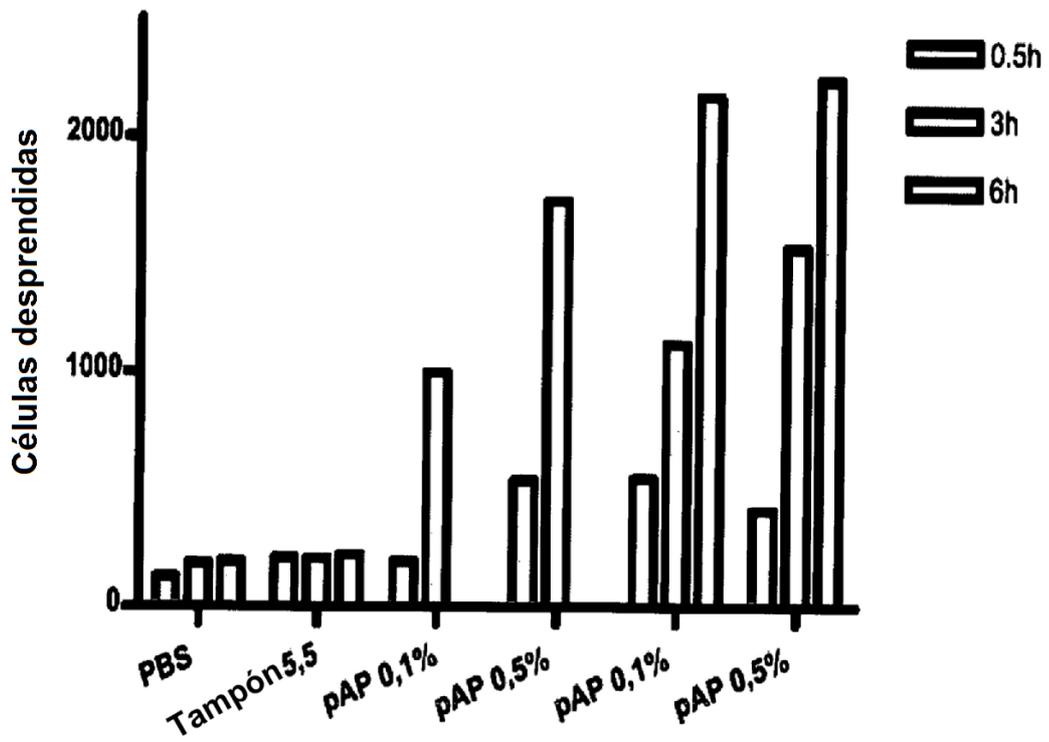


Figura 3

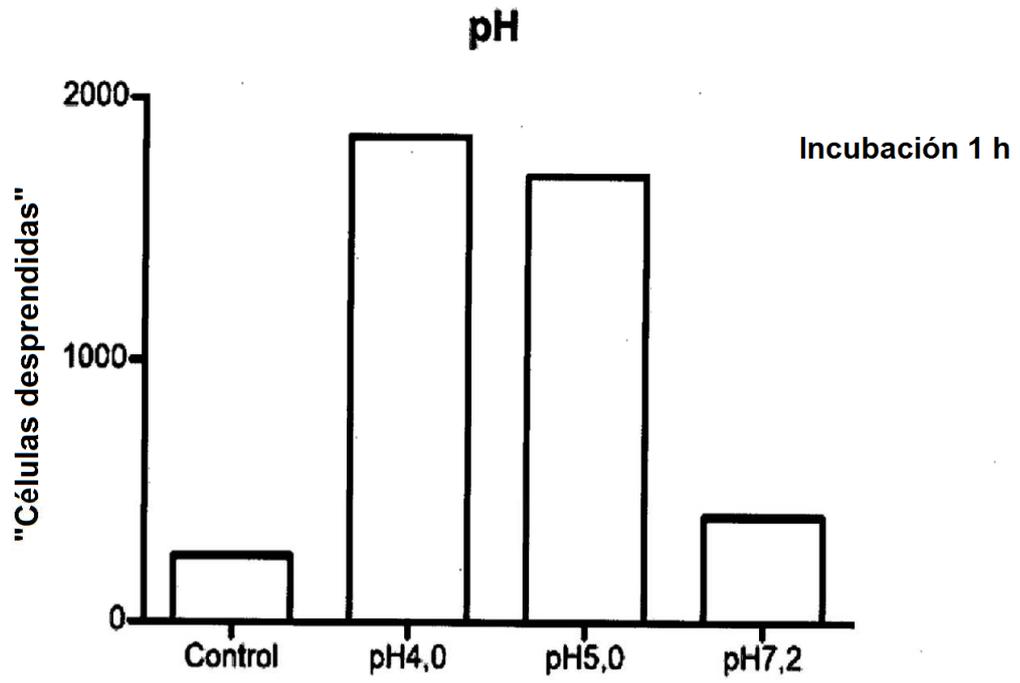


Figura 4

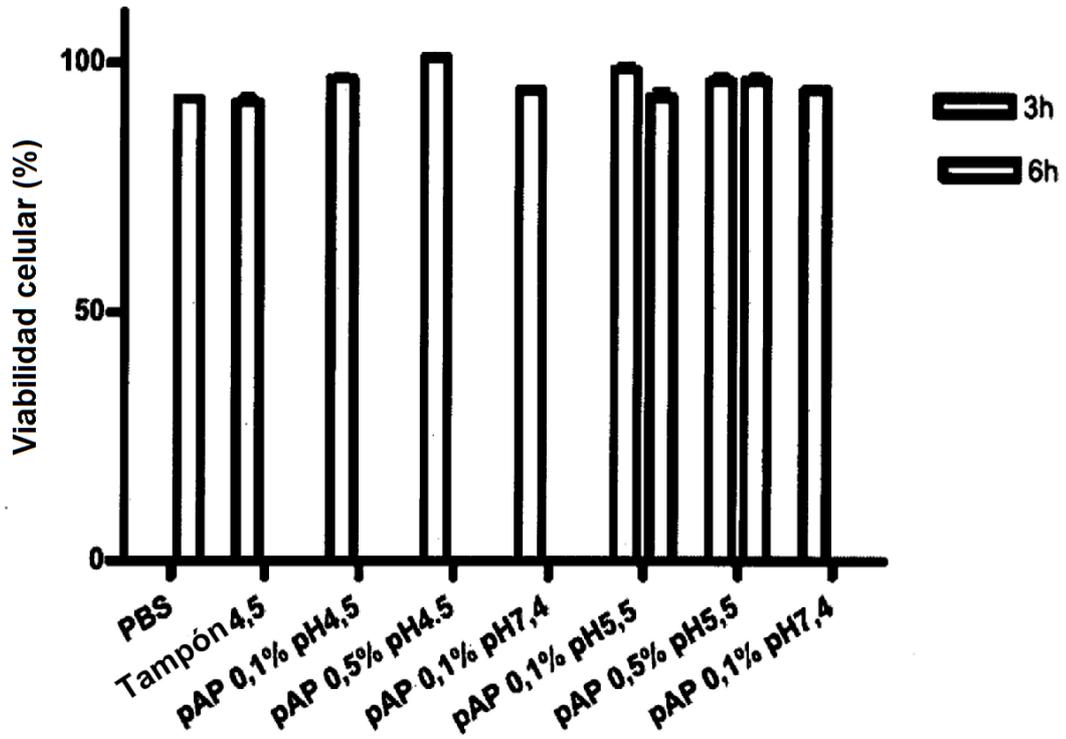


Figura 5

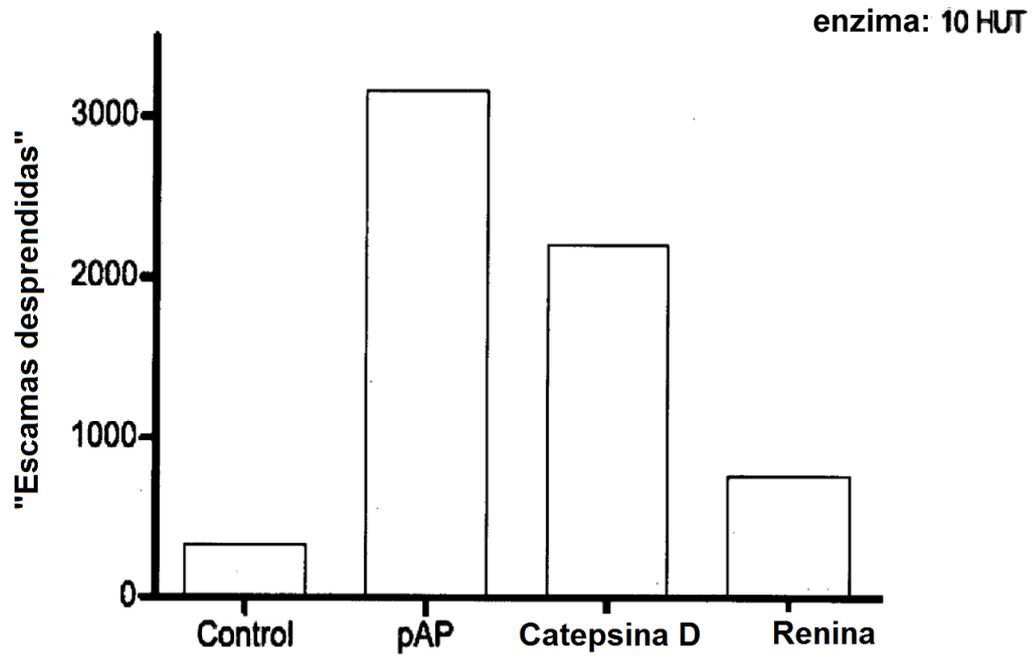


Figura 6

pCBwoIEP (proCardosina B secuencia sin la secuencia IEP):

MVSNGLLRVGLKKRKVDRLDQLRAHGVHMLGNARKDFGFRRTL RDSSGSGIVALT
NDRDTAYYGEIGIGTPPQNFAVIFDTGSSDLWVPSTKCDTSLACVIHPRYDSGDSST
YKNGTASIYQYGTGAIVGFYSQDSVEVGDVVEHQDFIETTEEDDTVFLKSEFDGI
LGLGFQEISAGKAVPVWYNMVNQGLVEEAVFSFWLNLRNVDEEEGGELVFGGVDP
NHFRGNHTYVPVTRKGYWQFEMGDVLIGDKSSGFCAGGCAAIADSGTSFFAGPTAI
ITQINQAIGAKGGGSAESIVDCNGISSMPNIAFTIGSKLFEVTPEQYIYKVGEGEAAT
CISGFTALDIMSPQGPWILGDMFMGPYHTVFDYGKLRVGF AEAV
[SEQ ID NO: 1]

pCAwoIEP (proCardosina A secuencia sin la secuencia IEP):

MSDDGLIRIGLKKRKVDRLDQLRGRALMEGNARKDFGFRGTVRDSGSAVVALTND
RDTSYFGEIGIGTPPQKFTVIFDTGSSVLWVPSSKCKINACRAHSMYESSDSSTYK
ENGTSGAIIYGTGSITGFFSQDSVTIGDLVVEKQDFIEATDEADNVFLHRLFDGILGLS
FQTISVPVWYNMVNQGLVKERRFSFWLNLRNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDHT
YVPVTYQYVWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFADSGTSLLSGPTAIVTQINHAIG
ANGGGGSEELQVDCNTLSSMPNVSFTIGGKFKGLTPEQYILKVGKGEATQCISGFT
AMDATLLGPLWILGDVFMRPYHTVFDYGNLLVGF AEAA
[SEQ ID NO: 2]

Secuencia IEP pCA:

VMNQCKTVVSRYGRDIIEMLRSKI QPKICSHMKLCTFDGARDVSSIIESVVDKNN
DKSSGGIHDCTFCEMAVVWMQNEIKQSETEDNIINYANELCEHLSTS
[SEQ ID NO: 3]

Secuencia IEP pCB:

VLNQCKTLVGQYGKNNMVQMLTSEVQPKICSHMKLCTFDGAHDVRSMIESVVDK
NNDKSSGGEICTFCEMALVRMQNEIKRNETEDNIINHVNVEVCDQLPTS
[SEQ ID NO: 4]

pCB (secuencia proCardosina B):

MVSNGLLRVGLKKRKVDRLDQLRAHGVHMLGNARKDFGFRRTL RDSSGSGIVALT
NDRDTAYYGEIGIGTPPQNFAVIFDTGSSDLWVPSTKCDTSLACVIHPRYDSGDSST
YKNGTASIYQYGTGAIVGFYSQDSVEVGDVVEHQDFIETTEEDDTVFLKSEFDGI
LGLGFQEISAGKAVPVWYNMVNQGLVEEAVFSFWLNLRNVDEEEGGELVFGGVDP
NHFRGNHTYVPVTRKGYWQFEMGDVLIGDKSSGFCAGGCAAIADSGTSFFAGPTAI
ITQINQAIGAKGVLNQCKTLVGQYGKNNMVQMLTSEVQPKICSHMKLCTFDGAHD
VRSMIESVVDKNNNDKSSGGEICTFCEMALVRMQNEIKRNETEDNIINHVNVEVCDQLP
TSSAESMVDCNGISSMPNIAFTIGSKLFEVTPEQYIYKVGEGEAATCISGFTALDIMS
PQGPWILGDMFMGPYHTVFDYGKLRVGF AEAV
[SEQ ID NO: 5]

Figura 7

pCA (secuencia ProCardosina A):

MSDDGLIRIGLKKRKVDRIDQLRGRRALMEGNARKDFGFRGTVRDSGSAAVVALTND
RDTSYFGEIGIGTPPQKFTVIFDTGSSVLWVPSSKSCINSKACRAHSMYESSDSSTYK
ENGTSGAIIYGTGSITGFFSQDSVTIGDLVVKEQDFIEATDEADNVFLHRLFDGILGLS
FQTISVPVWYNMVNQGLVKERRFSFWLNRNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDHT
YVPVTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFADSGTSLLSGPTAIVTQINHAIG
ANGVMNQCKTVVSRVGRDIIEMLRSKIQPKICSHMKLCTFDGARDVSSIIESVVD
KNNDKSSGGIHDEMCTFCEMAVVWMQNEIKQSETEDNIINYANELCEHLSTSSEEL
QVDCNTLSSMPNVSFTIGGKKFGLTPEQYILKVGKGEATQCISGFTAMDATLLGPLW
ILGDVFMRPYHTVFDYGNLLVGF AEA

[SEQ ID NO: 6]

pCB-XhoI

CTCGAGAAAAGAATGGTCTCCAACGGCGGATTGCTTC

[SEQ ID NO:7]

pCB-SalI

GTGCGACTCAAACCTGCTTCTGCAAATCCCACTCGTAAC

[SEQ ID NO:8]

Figura 7 (continuación)