



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 332 249**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/81 (2006.01) **C07K 16/38** (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01) **A61K 38/17** (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01) **A61K 39/44** (2006.01)

C07K 14/46 (2006.01) **A61K 47/48** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99918966 .5**

(96) Fecha de presentación : **07.05.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1078003**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2001**

(54) Título: **Inhibidores de plasmina de la serpiente marrón australiana, *Pseudonaja textilis textilis*.**

(30) Prioridad: **11.05.1998 AU PP3450**

(73) Titular/es: **The University of Queensland
St. Lucia, Brisbane, QLD 4072, AU
National Institute of Biological Standards and
Control, United Kingdom**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.01.2010

(72) Inventor/es: **Masci, Pantaleone, Paul;
Lavin, Martin, Francis;
Gaffney, Patrick, Joseph;
Sorokina, Natalya, Igorevna y
Filippovich, Igor, Vladimirovich**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.01.2010

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Inhibidores de plasmina de la serpiente marrón australiana, *Pseudonaja textilis textilis*.

5 Campo de la invención

Está invención se relaciona con agentes antifibrinolíticos y en particular, inhibidores de plasmina novedosos que tienen predisposición reducida a producir trombosis de rebote. La presente invención también se relaciona con secuencias de aminoácido y secuencias de nucleótido que codifican los inhibidores de plasmina novedosos así como también 10 con métodos para producir estos inhibidores y composiciones farmacéuticas que contienen los mismos.

Antecedente de la invención

La pérdida de sangre asociada con las principales formas de cirugía se ha compensado en el pasado por terapia 15 de reemplazo, que puede involucrar plasma congelado fresco, sangre completa fresca y concentrados de plaquetas. Con los conocimientos recientes de una variedad de infecciones víricas de transmisión hemática (Hepatitis B y C, y virus de la inmunodeficiencia humana, VIH), es una prioridad principal la necesidad de reducir la pérdida de sangre durante la cirugía. Se ha generado ansiedad adicional dentro del Servicio Nacional de Transfusión de Sangre que se 20 relaciona con la infectividad de los agentes relacionados con la Encefalitis Espóngiforme Bovina (BSE) y Enfermedad de Creuzfeldt-Jacob (CJD) para las que actualmente no existen ensayos confiables.

Se ha establecido (Royston, 1990, *Blood Coagul. Fibrinol.* 1:53-69; Orchard *et al*, 1993, *Br. J. Haemat.* 85:596-599) que la actividad fibrinolítica desencadenada por vía de la ruta de plasminógeno-plasmina contribuye a hemorragia y que un inhibidor de plasmina tal como aprotinina ayuda a aliviar la pérdida de sangre. Esto parece sugerir que la 25 digestión mediada por plasmina de coágulos de fibrina y componentes del sistema de coagulación puede ser de vital importancia como una contribución a este estado de hemorragia (Orchard *et al*, 1993, *supra*).

El uso de aprotinina durante la cirugía de bypass cardiopulmonar (CPB) es ahora de uso común (Royston, 1990, *supra*; Orchard *et al*, 1993, *supra*). En particular, Orchard *et al* (1993, *supra*) ha demostrado que la aprotina del 30 inhibidor de fuente bovina, como la sustancia activa en el medicamento Trasylol™, reduce la pérdida de sangre en pacientes CPB mediante la neutralización de la actividad de plasmina y no afecta la actividad de las plaquetas. Este último hallazgo ha sido confirmado por otros investigadores (Ray and March, 1997, *Thromb. Haemost.* 78:1021-1026).

La aprotinina es un inhibidor de proteasa serina bien investigado, o “serpina”. Este comprende 58 aminoácidos y actúa para inhibir la tripsina, -quimiotripsina, plasminas así como también calicreína de plasma y tejido (Fritz and Wunderer, 1983, *Drug Res.* 33:479-494; Gebhard *et al*, 1986 In “Proteinase Inhibitors”, Barrett and Salvesen (eds.), Elsevier Science Publicaciones BV pp 374-387). También se ha encontrado que la aprotinina reacciona con trombina y los activadores de plasminógeno (tPA y uPA) (Willmott *et al*, 1995, *Fibrinolysis* 9:1-8).

Recientes estudios han mostrado que los homólogos generados semi-sintéticamente de aprotinina que contienen 40 otros aminoácidos en lugar de lisina en la posición 15 de la secuencia de aminoácido tienen un perfil de acción y especificidad de acción que difiere distintivamente de aquellos de la aprotinina (Patente U.S. No 4,595,674; Wenzel *et al*, 1985, In “Chemistry of Peptides and Proteins” Vol. 3). Algunos de estos homólogos de aprotinina semisintéticos tienen, por ejemplo, una acción fuertemente inhibidora sobre la elastasa del páncreas y leucocitos. Otros homólogos de 45 aprotinina con arginina en la posición 15, alanina en la posición 17, y serina en la posición 42, se caracterizan por un acción inhibidora que es distintamente mayor que aquella de la aprotinina en calicreína de plasma (cf. WO 89/10374).

También se puede utilizar la referencia a la Patente U.S. No 5,576,294 (Norris *et al*) que describe inhibidores de 50 proteasa humana del mismo tipo como aprotinina. En particular, se describen variantes de inhibidor de proteasa tipo Kunitz humana que inhibe preferencialmente la elastasa neutrófila, catepsina G y/o proteinasa 3. Comparadas con la aprotinina, estas variantes tienen una carga negativa neta y se consideran que tienen un riesgo reducido de daño al riñón cuando se administran a pacientes en grandes dosis. En contraste, la aprotinina tiene un efecto nefrotóxico cuando se administra en dosis relativamente altas (Bayer, Trasylol, Inhibitor of proteinase; Glaser *et al*, In “Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft Für Innere Medizin, 78. Kongress”, Bergmann, München, 1972, pp 1612-1614). Se considera 55 que esta nefrototoxicidad es una consecuencia de la carga fuertemente positiva neta de la aprotinina que origina la unión de las superficies cargadas negativamente de los túbulos del riñón.

Aunque no hay duda de que el uso clínico antifibrinolítico de aprotinina reduce la pérdida de sangre durante cirugía 60 vascular, existe evidencia de la incidencia incrementada de la “trombosis de rebote” que se manifiesta en oclusión de injerto e infarto del miocardio perioperatorio (Van der Meer *et al*, 1996, *Thromb. Haemost.* 75:1-3; Cosgrove *et al*, 1992, *Annals Thorac. Surg.* 54:1031-1038; Samama *et al*, 1994, *Thromb. Haemost.* 71:663-669). De acuerdo con estos hallazgos, se ha mostrado que la aprotinina tiene una especificidad un poco amplia y acción lenta cinética de unión ajustada sobre la plasmina (Willmott *et al*, 1995, *supra*). De acuerdo con lo anterior, la incidencia incrementada de trombosis de rebote puede ser una consecuencia de la unión ajustada de aprotinina a plasmina y neutralización 65 concomitante irreversible del sistema fibrinolítico.

Hasta ahora, no existen agentes antifibrinolíticos efectivos descritos en la técnica anterior que reducen la predisposición a producir trombosis de rebote comparada con la aprotinina. Sin embargo, en un estudio reciente, Willmott

et al (1995, *supra*) aislaron y caracterizaron un inhibidor de plasmina del veneno de la serpiente marrón Australiana, *Pseudonaja textilis textilis* con un perfil cinético prometedor con respecto a la trombosis de rebote. Esta preparación aislada de inhibidor de plasmina, denominada Textilinina (Txln), se encuentra que consiste de una única proteína de aproximadamente 7 kDa, como se evalúa con dodecil sulfato de sodio (SDS), electroforesis de gel de poliacrilamida (PAGE) y teñido con azul Coomassie. En contraste con las muchas enzimas de proteasa serina inhibidas por aprotinina, la Txln no solo muestra inhibir la plasmina y la tripsina. También se muestra que conforma un mecanismo reversible competitivo de una etapa para la unión de la plasmina. En contraste, la aprotinina conforma un mecanismo reversible de dos etapas en donde la enzima y el inhibidor virgen reaccionan para producir inicialmente un complejo no covalente libre seguido por un complejo estable unido estrechamente, en el que la enzima y el inhibidor permanecen considerablemente sin cambio (Laskowski and Kato, 1980, *Annu. Rev. Biochem.* 49:593-626; Travis y Salvesen, 1983, *Annu. Rev. Biochem.* 52:655-709; Longstaff and Gaffney, 1991, *Biochemistry* 30:979-986). Más aún, se muestra que el Txln se une a la plasmina más rápidamente (constante de velocidad de disociación, $k_i=3.85 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$) y con K_i de menor afinidad (constante de disociación, $K_i = 1.4 \times 10^{-8} \text{ M}$) que la aprotinina (constante de velocidad de disociación, $k_{-2} = 1.64 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$; constante de disociación, $K_i = 5.3 \times 10^{-11} \text{ M}$ - este último valor está en acuerdo cercano con

5 un valor reportado previamente de $K_i = 2 \times 10^{-10} \text{ M}$ (Longstaff and Gaffney, 1992, *Fibrinolysis* 3:89-87)). Por lo tanto 10 se sugiere que el perfil cinético de Txln puede ser clínicamente más atractivo con respecto a la trombosis de rebote 15 que aquel de la aprotinina en el manejo de la hemorragia perioperatoria y postoperatoria.

20 Resumen de la invención

La presente invención resulta del descubrimiento inesperado de dos diferentes inhibidores de plasmina en el inhibidor de preparación de plasmina de Willmott *et al* (1995, *supra*) que se considera inicialmente que son sustancialmente homogéneos. De forma sorprendente, estos inhibidores de plasmina, denominados Textilinina 1 (Txln 1) y Textilinina 25 2 (Txln 2) comigran con una masa molecular de aproximadamente 7 kDa, cuando se evalúan mediante SDS-PAGE, y constituyen solo aproximadamente 50% de la proteína total (en peso) en la preparación de inhibidor progenitor de plasmina utilizada por Willmott y colegas. Esto, junto con el hecho que la Txln 1 y Txln 2 cada uno tienen un perfil 30 cinético diferente comparado con la preparación progenitora, sugiere que la preparación progenitora contiene otros compuestos que interfieren con la inhibición de plasmina. En particular, la Txln 1 y Txln 2 tienen distintas secuencias 35 de aminoácido, algunos perfiles cinéticos similares (Txln 1, $k_{-1}=3.09 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$; $K_i=3.5 \times 10^{-9} \text{ M}$; Txln 2, $k_{-1}=8.20 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$; $K_i=2.0 \times 10^{-9} \text{ M}$), aunque ambos inhiben la pérdida de sangre en un modelo de murino. Similar a la contraparte progenitora, la Txln 1 y Txln 2 reaccionan solo con plasmina y tripsina y por lo tanto tienen alta especificidad de enzima comparada con la aprotinina. Más aún, la comparación de los perfiles cinéticos respectivos de Txln 1, Txln 2 y aprotinina para la plasmina revela que la Txln 1 y Txln 2 son entre 10 veces y 100 veces menos eficientes que 40 la aprotinina en la inhibición de plasmina. También se ha encontrado que la Txln 1 y Txln 2 se disocia de la plasmina entre 10 veces y 100 veces más rápidamente que la aprotinina. Debido a su alta especificidad para la plasmina y baja eficiencia inhibidora, la Txln 1 y Txln 2 puede por lo tanto tener una ventaja terapéutica, comparada con la aprotinina, para afectar transitoriamente el delicado balance entre las enzimas e inhibidores del sistema fibrinolítico que controla 45 la fluidez de la sangre.

Los inventores también han encontrado de forma sorprendente que la serpiente marrón Australiana no solo expresa 40 transcriptos que codifican Txln 1 y Txln 2, sino que expresa transcriptos que codifican cuatro inhibidores de plasmina adicionales designados Textilirtina 3, 4, 5 y 6 (es decir, Txln 3, Txln 4, Txln 5 y Txln 6). Aunque estos últimos 45 transcriptos parecen ser expresados en niveles significativamente bajos comparados con aquellos que codifican la Txln 1 y Txln 2, ellos son altamente homólogos con Txln 1 y Txln 2 ambos en el nivel de nucleótido y el nivel de aminoácido deducido

Así, en un aspecto de la invención, se proporciona una preparación sustancialmente pura de un inhibidor de plasmina caracterizado porque este es un inhibidor competitivo de única etapa de plasmina, y comprende la secuencia de 50 aminoácido ECESTCAA, en donde el inhibidor de plasmina tiene la fórmula general:



en donde:

55 X es cualquier aminoácido;

Y es un aminoácido hidrófobo;

60 A es un aminoácido aromático o histidina;

Z es K, R, H, D, E, Q o N; y

B es un aminoácido neutro, o P, A, G, S, T, V o L, y

65 en donde X en la posición 19 es R.

ES 2 332 249 T3

Preferiblemente, el inhibidor de plasmina comprende adicionalmente la secuencia de aminoácido NANNF.

De acuerdo con otra realización preferida, el inhibidor de plasmina comprende adicionalmente la secuencia de aminoácido YGGC.

5 El inhibidor de preparación de plasmina se caracteriza adicionalmente en que por lo menos 60%, preferiblemente por lo menos 75%, más preferiblemente por lo menos 90%, más preferiblemente por lo menos 95%, del material total en la preparación es el inhibidor de plasmina.

10 Preferiblemente, dicho inhibidor competitivo de única etapa tiene una constante de disociación para la plasmina en el rango de $1 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ a $1 \times 10^{-10} \text{ M}^{-2}$, más preferiblemente de $5 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ a $8 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$, más preferiblemente de $1 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ a $5 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$.

15 El inhibidor competitivo de única etapa puede tener una constante de velocidad de disociación para plasmina en el rango de $4 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a $5 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$, más preferiblemente de $1 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$, más preferiblemente de $2 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a $9 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

20 De forma adecuada, el inhibidor competitivo de única etapa comprende un polipéptido. Preferiblemente, el polipeptido se selecciona del grupo que consiste de:

25 (a)

Lys-Asp-Arg-Pro-Asp-Phe-Cys-Glu-Leu-Pro-Ala-Asp-Thr-Gly-Pro-Cys-Arg-
Val-Arg-Phe-Pro-Ser-Phe-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Asp-Glu-Lys-Cys-Leu-Glu-
Phe-Ile-Tyr-Gly-Gly-Cys-Glu-Gly-Asn-Ala-Asn-Asn-Phe-Ile-Thr-Lys-Glu-
Glu-Cys-Glu-Ser-Thr-Cys-Ala-Ala [SEQ ID NO:2];

30 (b)

Lys-Asp-Arg-Pro-Glu-Leu-Cys-Glu-Leu-Pro-Pro-Asp-Thr-Gly-Pro-Cys-Arg-
Val-Arg-Phe-Pro-Ser-Phe-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Asp-Glu-Glu-Lys-Cys-Leu-Glu-
Phe-Ile-Tyr-Gly-Gly-Cys-Glu-Gly-Asn-Ala-Asn-Asn-Phe-Ile-Thr-Lys-Glu-
Glu-Cys-Glu-Ser-Thr-Cys-Ala-Ala [SEQ ID NO:4];

35 45 (c) un fragmento biológicamente activo de una cualquiera de la SEQ ID NO:2 o 4, que comprende por lo menos 15 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:2 o 4 y que retiene inhibición competitiva de plasmina de única etapa; y

50 50 (d) un polipéptido que tiene por lo menos 90% de identidad a la secuencia establecida en la SEQ ID NO:2 o 4.

Preferiblemente, la Z en la posición 3 es H o R

De forma adecuada, la Z en la posición 5 es K, N, E o D.

55 Preferiblemente, la Y en la posición 6 es F o L.

La Z en la posición 8 puede ser E o K.

De forma adecuada, la B en la posición 10 es P o L.

60 Preferiblemente, la B en la posición 11 es P o A.

La Z en la posición 12 es preferiblemente E o D.

65 De forma adecuada, la B en la posición 13 es T o I.

La X en la posición 15 puede ser P, S o R.

ES 2 332 249 T3

La Z en la posición 17 es de forma adecuada K, N, E, D o R.

Preferiblemente, la X en la posición 18 es D, G, A o V.

5 De forma adecuada, la X en la posición 19 es F, N, K o R.

La X en la posición 20 es preferiblemente T, P, F o I.

10 La B en la posición 21 puede ser G, V o P.

De forma adecuada, la X en la posición 22 es A, S o R.

Preferiblemente, la Å en la posición 24 es Y o H.

15 La X en la posición 26 es de forma adecuada S o N.

La B en la posición 27 es preferiblemente P, A o T.

20 La Z en la posición 28 puede ser D o R

De forma adecuada, la Z en la posición 29 es E, D, H o Q.

Preferiblemente, la Z en la posición 30 es H, K, R o Q.

25 La Z en la posición 31 puede ser K, Q o E.

La B en la posición 33 es preferiblemente L o I.

30 La Z en la posición 34 es de forma adecuada E o K.

De forma adecuada, la B en la posición 36 es L o I.

Preferiblemente, la X en la posición 41 es E, G o K.

35 La B en la posición 42 puede ser C, pero es preferiblemente G.

De forma adecuada, la X en la posición 48 es K, N o I.

40 Preferiblemente, la X en la posición 50 es K, Q o I.

El polipéptido puede comprender un péptido líder. De forma adecuada, el péptido líder comprende la secuencia de aminoácidos:

45 **Met-Ser-Ser-Gly-Gly-Leu-Leu-Leu-Leu-Gly-Leu-Leu-Thr-**

Leu-Try-Glu-Val-Leu-Thr-Pro-Val-Ser-Ser (SEQ ID NO:14)

50 o un fragmento biológicamente activo del mismo, que comprende por lo menos 15 aminoácidos contiguos y que retiene inhibición competitiva de plasmina de única etapa.

Polipéptidos de ejemplo que incluyen el péptido líder se pueden seleccionar del grupo que consiste de:

55 i.

56 **Met-Ser-Ser-Gly-Gly-Leu-Leu-Leu-Leu-Gly-Leu-Leu-Thr-Leu-Try-**
Glu-Val-Leu-Thr-Pro-Val-Ser-Ser-Lys-Asp-Arg-Pro-Asp-Phe-Cys-Glu-
Leu-Pro-Ala-Asp-Thr-Gly-Pro-Cys-Arg-Val-Arg-Phe-Pro-Ser-Phe-Tyr-Tyr-
Asn-Pro-Asp-Glu-Lys-Lys-Cys-Leu-Glu-Phe-Ile-Tyr-Gly-Gly-Cys-Glu-
Gly-Asn-Ala-Asn-Asn-Phe-Ile-Thr-Lys-Glu-Glu-Cys-Glu-Ser-Thr-Cys-Ala-
Ala (SEQ ID NO:16);

ii.

5 ***Met-Ser-Ser-Gly-Gly-Leu-Leu-Leu-Ile-Gly-Leu-Leu-Thr-Leu-Tyr-***
Glu-Val-Leu-Thr-Pro-Val-Ser-Ser-Lys-Asp-Arg-Pro-Gly-Leu-Cys-Glu-Leu-
Pro-Pro-Asp-Thr-Gly-Pro-Cys-Arg-Val-Arg-Phe-Pro-Ser-Phe-Tyr-Tyr-Ala-
Pro-Asp-Gly-Gln-Lys-Cys-Leu-Glu-Phe-Ile-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gln-Gly-
Asn-Ala-Ala-Ala-Phe-Ile-Thr-Lys-Glu-Glu-Cys-Ser-Thr-Cys-Ala-Ala
[SEQ ID NO:18];

15

20 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido o fragmento biológicamente activo del mismo, de acuerdo con el primer aspecto mencionado. De forma adecuada, dicho polinucleótido se selecciona de, el grupo que consiste de:

(1)

25 **AAGGACCGTCCGGATTCTGTGAATGCCGTGCTGACACCGGAC**
CATGTAGAGTCAGATTCCCATCCTCTACTACAACCCAGATGAA
AAAAAAGTCTAGAGTTTATTTATGGTGGATGCGAAAGGGAATGC
30 **TAACAATTTCATCACCAAAAGAGGAATGCGAAAGCACCTGTGCT**
GCCTGA [SEQ ID NO:1];

35

(2)

40 **AAGGACCGTCCAGAGTTGTGTGAATGCCCTGTGACACCGGAC**
CATGTAGAGTCAGATTCCCATCCTCTACTACAACCCAGATGAA
AAAAAATGCCCTAGAGTTTATTTATGGTGGATGCGAAAGGGAATG
45 **CTAACAAATTTCATCACCAAAAGAGGAATGCGAAAGCACCTGTGCT**
TGCGCTGA [SEQ ID NO:3];

50 (8) un polinucleótido que hibrida bajo condiciones exigentes a cualquiera de las anteriores secuencias, y que codifica un polipéptido con inhibición competitiva de plasmina de única etapa.

55 El polinucleótido preferiblemente comprende una secuencia de nucleótido que codifica un péptido líder. De forma adecuada, dicha secuencia de nucleótido comprende la secuencia de nucleótidos:-

60 **ATGTCTTCTGGAGGTCTTCTCTCCGTCTGGACTCCICA**
CCCTCTGGGAGGTGCTGACCCCCGGTCTCCAGC [SEQ ID NO:13]

65 o un polinucleótido que hibrida bajo condiciones exigentes a la anterior secuencia y que codifica un polipéptido con inhibición competitiva de plasmina de única etapa.

ES 2 332 249 T3

Polinucleótidos de ejemplo que comprenden dicha secuencia de nucleótido se pueden seleccionar del grupo que consiste de:

1)

5

10 **ATGCTTCTGGAGGTCTTCTCCTGCTGGACTCCTCACCCCTCTG
GGAGGTGCTGACCCCCGTCCTCCAGCAAGGACCGTCCGGATTTCTGT
GAAC TGCCCTCTGACACCCGGACCATGTAGAGTCAGATTCCCATCCT
TCTACTACAACCCAGATGAAAAAAAGTGCCTAGAGTTATTTATGG
TGGATGCGAAGGGAAATGCTAACAAATTATCACCAAAGAGGAATG
CGAAAGCACCTGTGCTGCCGA [SEQ ID NO:15];**

15

2)

20

ATGCTTCTGGAGGTCTTCTCCTGCTGGACTCCTCACCCCTCTG
GGAGGTGCTGACCCCCGTCCTCCAGCAAGGACCGTCCAGAGTTGT
GAAC TGCCCTCTGACACCCGGACCATGTAGAGTCAGATTCCCATCCT
TCTACTACAACCCAGATGAAAAAAATGCCAGAGTTATTTATGG
TGGATGCGAAGGGAAATGCTAACAAATTATCACCAAAGAGGAATG
CGAAAGCACCTGTGCTGCCGA [SEQ ID NO:17];

30

3)

35

GGAGCTTCATCATGTCTTCTGGAGGTCTTCTCCTGCTGGACTC
CTCACCCCTCTGGGAGGTGCTGACCCCCGTCCTCCAGCAAGGACCGTC
CAGAGTTGTGAACTGCCCTGACACCCGGACCATGTAGAGTCAG
ATGCCCATCCTCTACTACAACCCAGATGAAAAAAATGCCAGAG
TTTATTTATGGATGCGAAGGGAAATGCTAACAAATTATCAC
AAAGAGGAATGCGAACACCTGTGCTGCCGAATGAGGAGACCC
TOCTGGATTGGATOGACAGTCCAACTTGACCCAAAGACCCCTGCTT
CTGCCCTGGACACCCCTGGACACCCCTGCCCAAAACCCACCCCTGG
ACTAAATTCTTCTGCAATAAGCTTGGTTCAGCT [SEQ ID
NO:43]

50

En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para aliviar la pérdida de sangre en un paciente, dicha composición comprende un polipéptido de cualquiera de las anteriores ("agentes terapéuticos") y un portador farmacéuticamente aceptable. La invención se relaciona adicionalmente con el uso del polipéptido anterior, formulado opcionalmente con un portador farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento para aliviar la pérdida de sangre.

En un aspecto todavía adicional, la invención reside en agentes antineoplásicos que comprenden un polipéptido, o fragmento de polipéptido, de acuerdo con la invención conjugado con un anticuerpo antifibrina.

60 Breve descripción de los dibujos

Con el fin que la invención se pueda entender fácilmente y colocar en efecto práctico, se describirán ahora realizaciones preferidas por vía de ejemplo con referencia a los dibujos acompañantes en los que:

65

La Figura 1 muestra un perfil de elusión Sephacyrl™ S-300 del veneno de la serpiente marrón Australiana. Se obtienen cinco picos de proteína (1-5) y se obtiene actividad inhibidora de plasmina (por ejemplo Txln) en el pico de hombro 4 que comprende aproximadamente 2% de la proteína total aplicada a la columna.

ES 2 332 249 T3

La Figura 3 representa un perfil de elusión de columna DEAE-SepharoseTM CL-6B de actividad de inhibidor de plasmina concentrado derivada de la cromatografía SephacrylTM S-300 en la Figura 1. Las barras sólidas muestran dos picos separados de actividad inhibidora de plasmina (denominados 1 y 2).

5 La Figura 2 muestra un perfil de elusión SephacrylTM S-100 perfil de elusión de una de las dos fracciones concentradas y agrupadas obtenidas de la cromatografía DEAE-SepharoseTM CL-6B. El perfil mostrado es aquel del Txln 1 pero el perfil de Txln 2 es idéntico. El inserto, sin embargo muestra dos perfiles de elusión distintos para cada uno de Txln 1 y Txln 2 utilizando cromatografía HPLC C18 de fase inversa.

10 La Figura 4 ilustra un análisis de ajuste de curva de tiempo real utilizando inhibición de SigmaPlot de Txln 1 (0-410 nM) de plasmina (2 nM). Se obtienen curvas de inhibición similar (datos no mostrados) con Txln 2.

15 La Figura 5 muestra las secuencias de aminoácido para Txln 1 y Txln 2, así como también aquellos de inhibidor de plasmina asociada a Taicotoxina (TAC) y aprotinina (APRO). Se alinean las secuencias de acuerdo con la ubicación de las seis cisteínas.

20 La Figura 6 lista una secuencia de cADN parcial de Txln 1. La secuencia de aminoácido codificada por esta secuencia parcial se muestra adelante, la secuencia de nucleótido en un único código de letra. La letra "N" denota un nucleótido no caracterizado.

25 La Figura 7 lista una secuencia de cADN parcial de Txln 2. La secuencia de aminoácido codificada por esta secuencia parcial se muestra adelante, la secuencia de nucleótido en un único código de letra. La letra "N" denota un nucleótido no caracterizado.

30 La Figura 8 muestra los patrones de movilidad electroforéticos en 2% de un teñido de gel de agarosa con EtBr de productos PCR obtenidos con cebadores específicos de gen Txln: Línea 1, control (plantilla, sin cebadores); Línea 2, 5'-productos PCR RACE; Línea 3, 3'- productos PCR RACE; Línea M; tamaño de marcadores.

35 La Figura 9 lista la secuencia de cADN Txln 1 derivado de análisis de secuencia de nucleótido de los productos RACE 5' y 3'.

La Figura 10 muestra las secuencias de aminoácido deducidas y de nucleótido que se relacionan con las preformas respectivas de Txln 1-6.

35 La Figura 11 muestra una comparación de secuencia de secuencias de polipéptido de Textilinina utilizando el programa PILEUP de la GCG Wisconsin Suite.

40 La Figura 12 se refiere a una electroforesis de gel de poliacrilamida 15% SDS bajo condiciones de reducción de proteínas de fusión GST de Textilinina expresadas a partir de varias colonias que alojan clones recombinantes pGEM-2T-Txln 1. Se seleccionan colonias mediante detección PCR utilizando cebadores específicos de secuencia. Los numerales denotan el número de designación de clon.

Descripción detallada

45 1. Definiciones

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por aquellos medianamente versados en la técnica a los que la invención pertenece. Aunque se pueden utilizar cualesquier métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí en 50 la práctica o prueba de la presente invención, se describen métodos y materiales preferidos. Para el propósito de la presente invención, se definen los siguientes términos adelante.

55 "Fragmento biológicamente aceptable" significa un fragmento de un polipéptido progenitor de longitud sustancialmente completa en donde el fragmento retiene la actividad del polipéptido progenitor. Por ejemplo, en el caso de un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10 y 12, el fragmento de polipéptido debe retener las propiedades de inhibición competitiva de única etapa del polipéptido progenitor con respecto a la plasmina.

60 El término "muestra biológica" como se utiliza aquí se refiere a una muestra que puede ser no tratada, tratada, diluida o concentrada de un paciente. De forma adecuada, la muestra biológica se selecciona de células fetales, y muestras de tejido que incluyen tejido de las regiones del caudado y/o putamen del cerebro, y similares.

65 "Corresponde a" o "que corresponde a" significa (a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótido que es sustancialmente idéntica o complementaria a toda o una porción de una secuencia de polinucleótido de referencia o que codifica una secuencia de aminoácido idéntica a una secuencia de aminoácido en un péptido o proteína; o (b) un péptido o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que es sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácido en un péptido o proteína de referencia.

ES 2 332 249 T3

“Derivado” significa un polipéptido que se ha derivado de la secuencia básica mediante modificación, por ejemplo mediante conjugación o complejamiento con otros grupos funcionales químicos o mediante técnicas de modificación post-transduccional como se entendería en la técnica. El término “derivado” también incluye dentro de su alcance alteraciones que se han hecho para una secuencia progenitora que incluye adiciones, o eliminaciones que se proporcionan para moléculas funcionales equivalentes.

“Homología” se refiere al porcentaje de número de aminoácidos que son sustituciones conservadoras, sustitutivas o idénticas como se define en la Tabla 1 adelante. Se puede determinar la homología utilizando programas de comparación de secuencia tal como GAP (Deveraux *et al.* 1984, Ácido nucleicos Research 12, 387-395) que se incorpora aquí como referencia. De esta manera las secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente a aquellas citadas aquí se pueden comparar mediante inserción de espacios en la alineación, se determinan tales espacios, por ejemplo, mediante el algoritmo de comparación utilizado por GAP.

“Hibridación” se utiliza aquí para denotar el emparejamiento de secuencias de nucleótido complementarias para producir un híbrido ADN-ADN o ADN-ARN. Las secuencias base de complementariedad son aquellas secuencias que se relacionan por las reglas de emparejamiento de base. En el ADN, los pares A con T y pares C con G. En ARN pares U con A y pares C con G. A este respecto, los términos “emparejamiento” y “emparejamiento incorrecto” como se utilizan aquí se refiere a la hibridación potencial de nucleótidos emparejados en hebras de ácido nucleico complementarias. Los nucleótidos emparejados se hibridan eficientemente, tal como el par base A-T y G-C clásico mencionado anteriormente. Los emparejamientos incorrectos son otras combinaciones de nucleótidos que no se hibridan eficientemente.

“Aislado” significa el material que es sustancial o esencialmente libre de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural. Por ejemplo, un “polinucleótido aislado”, como se utiliza aquí, se refiere a un polinucleótido, que se ha purificado de la secuencia que flanquean en un estado de ocurrencia natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha removido de las secuencias que están normalmente adyacentes al fragmento.

“Obtenido de” significa que una muestra tal como, por ejemplo, un extracto de ácido nucleico se aísla de, o deriva de, una fuente particular del anfitrión. Por ejemplo, el extracto de ácido nucleico se puede obtener de tejido directamente aislado del anfitrión.

El término “oligonucleótido” como se utiliza aquí se refiere a un polímero compuesto de una multiplicidad de unidades de nucleótido (desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos de los mismos) ligados por vía de enlaces de fosfodiéster (o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos de los mismos). Así, aunque el término “oligonucleótido” típicamente se refiere a un polímero de nucleótido en el cual los nucleótidos y enlaces entre ellos son de ocurrencia natural, se entenderá que el término también incluye dentro de su alcance varios análogos que incluyen, pero no se restringen a, ácidos nucleicos de péptido (PNa), fosforamidatos, fosforotioatos, fosfonatos de metilo, ácidos 2-O-metil ribonucleicos, y similares. El tamaño exacto de la molécula puede variar dependiendo de la aplicación particular. Un oligonucleótido es típicamente más bien corto en longitud, generalmente de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos, pero el término se puede referir a moléculas de cualquier longitud, aunque el término “polinucleótido” o “ácido nucleico” se utiliza típicamente para oligonucleótidos grandes.

“Ligado operablemente” significa que los ácidos nucleicos reguladores transcripcionales y de traducción se posicionan con relación a una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido o fragmento del mismo en tal una forma que la transcripción de dicha secuencia de nucleótido se puede iniciar y terminar, respectivamente.

El término “paciente” se refiere a pacientes de origen humano u otro animal e incluye cualquier individuo que se desee examinar o tratar utilizando los métodos de la invención. Sin embargo, se entenderá que “paciente” no implica que los síntomas estén presentes.

El término “polinucleótido” o “ácido nucleico” como se utiliza aquí designa mARN, ARN, cARN, cADN o ADN. El término típicamente se refiere a oligonucleótidos mayores de 30 nucleótidos de longitud.

“Portador farmacéuticamente aceptable” significa un relleno sólido o líquido, diluyente o sustancia encapsulante que se puede utilizar de forma segura en administración sistémica.

El término “homólogos de polinucleótido” generalmente se refiere a polinucleótidos que se hibridan con un polinucleótido de referencia bajo condiciones sustancialmente exigentes.

“Polipéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan intercambiablemente aquí para referirse a un polímero de residuos de aminoácido y a variantes y análogos sintéticos de los mismos. Así, estos términos se aplican a polímeros de aminoácido en los que uno o más residuos de aminoácido es un aminoácido de ocurrencia no natural sintético, tal como un análogo químico de un aminoácido de ocurrencia natural correspondiente, así como también a polímeros de aminoácido de ocurrencia natural.

“Cebador” significa un oligonucleótido que, cuando se empareja con una hebra de ADN, es capaz de iniciar la síntesis de un producto de extensión de cebador en la presencia de un agente de polimerización adecuado. El cebador

ES 2 332 249 T3

es preferiblemente monocatenario para eficiencia máxima en amplificación pero puede alternativamente ser bicatenario. Un cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de extensión en la presencia del agente de polimerización. La longitud del cebador depende de muchos factores, que incluyen la aplicación, temperatura a ser empleada, condiciones de reacción de plantilla, otros reactivos, y fuente de cebadores. Por ejemplo, 5 dependiendo de la complejidad de la secuencia objetivo, el cebador de oligonucleótido típicamente contiene 15 a 35 o más nucleótidos, aunque puede contener pocos nucleótidos. Los cebadores pueden ser polinucleótidos grandes, tal como de aproximadamente 200 nucleótidos a varias kilobases o más. Se pueden seleccionar los cebadores por ser “sustancialmente complementarios” a la secuencia en la plantilla a la que se designa para hibridar y servir como un sitio para la iniciación de la síntesis. Por “sustancialmente complementario”, se entiende que el cebador es de forma 10 suficientemente complementaria para hibridar con una secuencia de nucleótido objetivo. Preferiblemente, el cebador no contiene emparejamientos incorrectos con la plantilla a la que se designa para hibridar pero eso no es esencial. Por ejemplo, los nucleótidos no complementarios se pueden adherir al extremo 5' del cebador, con el resto de la secuencia de cebador que es complementaria a la plantilla. Alternativamente, los nucleótidos no complementarios o una elongación de nucleótidos no complementarios se puede esparcir en un cebador dado que la secuencia del cebador tiene 15 suficiente complementariedad con la secuencia de la plantilla para hibridar y por lo tanto formar una plantilla para síntesis del producto de extensión del cebador.

“Sonda” se refiere a una molécula que une una secuencia específica a subsecuencia u otro grupo funcional de otra molécula. A menos que se indique otra cosa, el término “sonda” típicamente se refiere a una sonda de oligonucleótido 20 que une a otro ácido nucleico, a menudo denominado “ácido nucleico objetivo”, a través del emparejamiento de base complementaria. Las sondas pueden unir ácidos nucleicos objetivos que carecen de complementariedad de secuencia completa con la sonda, dependiendo de la exigencia de las condiciones de hibridación. Las sondas se pueden etiquetar directa o indirectamente.

25 El término “polinucleótidos recombinantes” como se utiliza aquí se refiere a un polinucleótido formado *in vitro* mediante la manipulación de ácido nucleico en una forma normalmente no encontrada en la naturaleza. Por ejemplo, el polinucleótido recombinante puede estar en la forma de un vector de expresión. Generalmente, tales vectores de expresión incluyen ácido nucleico regulador transcripcional y transduccional ligado operablemente a una secuencia de nucleótido.

30 “Polipéptido recombinante” significa un polipéptido hecho utilizando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un polinucleótido recombinante.

35 Los términos utilizados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen “secuencia de referencia”, “ventana de comparación”, “identidad de secuencia”, porcentaje de “identidad de secuencia” y “identidad sustancial”. Una “secuencia de referencia” es por lo menos 12 pero frecuentemente 15 a 18 y a menudo por lo menos 25 unidades de monómero, inclusive de nucleótidos y residuos de aminoácido, de longitud. Ya que los dos polinucleótidos pueden cada uno comprender (1) una secuencia (es decir, solo una porción de la secuencia de polinucleótido completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre 40 los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos se desarrollan típicamente al comparar las secuencias de los dos polinucleótidos sobre una “ventana de comparación” para identificar y comparar las regiones locales de la similitud de secuencia. Una “ventana de comparación” se refiere a un segmento conceptual de típicamente 12 residuos contiguos que se comparan con una secuencia de referencia. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, espacios) de aproximadamente 20% o menos según se compara 45 con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de las secuencias para alinear una ventana de comparación se puede conducir mediante implementaciones de algoritmos computarizados (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr. Madison, WI, USA) o mediante inspección y el mejor alineamiento (es decir, resultando en el porcentaje de homología más alto sobre la ventana de comparación) generado por cualquiera de los varios métodos seleccionados.

50 “Identidad de secuencia” se refiere a secuencias que son idénticas (es decir, sobre una base de nucleótido-por-nucleótido o aminoácido por aminoácido) sobre la ventana de comparación. El término “porcentaje de identidad de secuencia” se calcula al comparar dos secuencias alineadas óptimamente sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) ocurre en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de las posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana), y al multiplicar el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de similitud de secuencia.

60 “Exigente” como se utiliza aquí, se refiere a la temperatura y condiciones de resistencia iónica, y presencia o ausencia de ciertos disolventes orgánicos, durante hibridación. Entre mayor es la exigencia, mayor será el grado de complementariedad entre las secuencias de nucleótido inmovilizadas y la secuencia de polinucleótido etiquetada.

65 “Condiciones exigentes” se refieren a la temperatura y condiciones iónicas bajo las que solo hibridarán las secuencias de nucleótido que tienen una alta frecuencia de bases de complementariedad. La restricción requerida es dependiente de la secuencia de nucleótido y también depende de los varios componentes presentes durante la hibridación. Generalmente, se seleccionan las condiciones exigentes a aproximadamente 10 a 20°C menor que el punto de

ES 2 332 249 T3

fusión térmico (T_m) para la secuencia específica en una resistencia iónica definida y pH. El T_m es la temperatura (bajo resistencia iónica definida y pH) en la que 50% de una secuencia objetivo híbrida a una sonda complementaria.

- El término “sustancialmente puro” como se utiliza aquí describe un compuesto, por ejemplo, un péptido que se ha separado de los componentes que lo acompañan naturalmente. Típicamente, un compuesto es sustancialmente puro cuando por lo menos 60%, más preferiblemente por lo menos 75%, más preferiblemente por lo menos 90%, y más preferiblemente por lo menos 99% del material total (por volumen, por humedad o por peso seco o por mol por ciento o fracción de mol) en una muestra es el compuesto de interés. Se puede medir la pureza mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, en el caso de péptidos mediante cromatografía, electrofóresis de gel o análisis HPLC.
- Un compuesto, por ejemplo, un péptido también se purifica sustancialmente cuando es esencialmente libre de los componentes asociados naturalmente cuando se separa de los contaminantes naturales que lo acompañan en su estado natural.

El término “variante” se refiere a polipéptidos en los que uno o más aminoácidos se han reemplazado por diferentes aminoácidos. Se entiende bien en la técnica que algunos aminoácidos se pueden cambiar a otros con propiedades ampliamente similares sin cambiar la naturaleza de la actividad del polipéptido (sustituciones conservadoras).

“Vector” significa una molécula de ácido nucleico, preferiblemente una molécula de ADN derivada, por ejemplo, de un plásmido, bacteriófago, o virus de planta, en el que se puede insertar o clonar una secuencia de ácido nucleico sintética. Un vector preferiblemente contiene uno o más sitios únicos de restricción y puede ser capaz de replicación autónoma en una célula anfitriona definida que incluye una célula o tejido objetivo o un citoblasto o tejido de la misma o se integra con el genoma de la célula definida tal que se reproduce la secuencia clonada. Así, “vector de expresión” significa cualquier elemento autónomo capaz de dirigir la síntesis de una proteína. Tales vectores de expresión son bien conocidos por los expertos en la técnica. El vector también puede incluir un marcador de selección tal como un gen resistente a antibiótico que se puede utilizar para la selección de transformantes adecuados. Ejemplos de tales genes resistentes son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Como se utiliza aquí, subrayar o colocar en cursiva el nombre de un gen indicará el gen, en contraste a su producto de proteína, que se indica por el nombre del gen en la ausencia de cualquier subrayado o cursiva. Por ejemplo “Txln 1” significará el gen Txln 1, mientras que “Txln 1” indicará el producto de proteína del gen “Txln 1”.

A través de esta especificación, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderán que las palabras “comprenden”, “comprende” y “que comprende” implica una inclusión de un entero o grupo de enteros pero no la exclusión de cualquier otro entero o grupo de enteros.

35

2. Inhibidores de plasmina de la invención

La presente invención proporciona una preparación sustancialmente pura de un inhibidor de plasmina caracterizado porque es un inhibidor competitivo de plasmina de única etapa y comprende la secuencia de aminoácido ECESTCAA, en donde el inhibidor de plasmina tiene la fórmula general:



en donde:

50 X es cualquier aminoácido;

\tilde{Y} es un aminoácido hidrófobo;

\tilde{A} es un aminoácido aromático; Z es K, R, H, D, E, Q o N; y

55 B es un aminoácido neutro, o P, A, G, S, T, V o L, y

en donde X en la posición 19 es R.

60 Preferiblemente, el inhibidor de plasmina comprende adicionalmente la secuencia de aminoácido NANNF.

De acuerdo con otra realización preferida, el inhibidor de plasmina comprende adicionalmente la secuencia de aminoácido YGGC.

65 El inhibidor de preparación de plasmina se caracteriza adicionalmente porque por lo menos 60%, preferiblemente por lo menos 75%, más preferiblemente por lo menos 90%, más preferiblemente por lo menos 95%, del material total en la preparación es el inhibidor de plasmina.

ES 2 332 249 T3

En una realización preferida, el inhibidor competitivo de única etapa tiene constante de disociación para plasmina en el rango de $1 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ a $1 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$, más preferiblemente de $5 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ a $8 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$, más preferiblemente de $1 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ a $5 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$. El inhibidor competitivo de única etapa preferiblemente tiene una constante de velocidad de disociación para plasmina en el rango de $4 \times 10 \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a $5 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$, más preferiblemente de $1 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$, y más preferiblemente de $2 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a $9 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

2.1. Polipéptidos de Textilinina

El inhibidor de plasmina es preferiblemente un polipéptido de Textilinina. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un polipéptido aislado de acuerdo con la SEQ ID NOS 2, y 4, o fragmento biológicamente activo respectivamente del mismo. La SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4 corresponden respectivamente a los polipéptidos novedosos de Textilinina 1 de aproximadamente 7 kDa (Txln 1) y Textilinina 2 (Txln 2) obtenidos de *Pseudonaja textilis textilis*, como se describe de forma más completa aquí adelante.

En una realización, el polipéptido aislado puede comprender un péptido líder de acuerdo con la SEQ ID NO:14 o fragmento biológicamente activo del mismo. A este respecto, la invención también proporciona un polipéptido aislado de acuerdo con la SEQ ID NO:16, y 18,

2.2. Fragmentos de Polipéptido de Textilinina

La invención contempla fragmentos biológicamente activos de un polipéptido de Textilinina de acuerdo con la Invención. Los fragmentos de ejemplo de este tipo incluyen mutantes de eliminación y pequeños péptidos, de por lo menos 15, preferiblemente por lo menos 20 y más preferiblemente por lo menos 30 aminoácidos contiguos de un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, 4, 16, y 18, cuyo fragmento retiene una inhibición competitiva de plasmina de única etapa.

2.3. Variantes de Polipéptido de Textilinina

Con respecto a las variantes de polipéptidos de la invención, se entenderá que tales variantes deben retener la inhibición competitiva de plasmina de única etapa del polipéptido progenitor o de referencia. Las sustituciones conservadoras de ejemplo en los polipéptidos progenitores se puede hacer de acuerdo con la Tabla 1:

TABLA 1

	Residuo Original	Sustituciones de Ejemplo
35	Ala	Ser
40	Arg	Lys
	Asn	Gln, His
	Asp	Glu
45	Cys	Ser
	Gln	Asn
	Glu	Asp
	Gly	Pro
50	His	Asn, Gln
	Ile	Leu, Val
	Leu	Ile, Val
55	Lys	Arg, Gln, Glu
	Met	Leu, Ile,
	Phe	Met, Leu, Tyr
60	Ser	Thr
	Thr	Ser
	Trp	Tyr
65	Tyr	Trp, Phe
	Val	Ile, Leu

ES 2 332 249 T3

Se hacen cambios sustanciales en la función al seleccionar las sustituciones que son menos conservadoras que aquellas mostradas en la Tabla 1. Se pueden tolerar otros reemplazos que serían sustituciones no conservadoras y relativamente pocas de estas. Generalmente, las sustituciones que producen probablemente los cambios más grandes en las propiedades del polipéptido son aquellas en las que: (a) un residuo hidrófilo (por ejemplo, Ser o Thr) se sustituye para, o por, un residuo hidrófobo (por ejemplo, Ala, Leu, Ile, Phe o Val); (b) una cisteína o prolina se sustituye para, o por, cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva (por ejemplo, Arg, His o Lys) se sustituye para, o por, un residuo electronegativo (por ejemplo, Glu o Asp); o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa (por ejemplo, Phe o Trp) se sustituye para, o por, uno que tiene una cadena lateral más pequeña (por ejemplo, Ala, Ser) o ninguna cadena lateral (por ejemplo, Gly).

En general, las variantes comprenden regiones que son por lo menos 75% homólogas, más adecuadamente por lo menos 80%, preferiblemente por lo menos 85%, y más preferiblemente por lo menos 90% homólogas a las secuencias básicas como por ejemplo se muestra en la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 y 12. En una realización alternativa, las variantes comprenden regiones que tienen por lo menos 70%, más adecuadamente por lo menos 80%, preferiblemente por lo menos 90%, y más preferiblemente por lo menos 95% de identidad sobre la secuencia de aminoácido progenitora de tamaño idéntico (“ventana de comparación”) o cuando se compara con una secuencia alineada en la que el alineamiento se desarrolla por un programa de homología de computador conocido en la técnica. Se pueden determinar lo que constituye las variantes adecuadas mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, ácido nucleicos que codifican polipéptidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 y 12 se pueden mutar utilizando mutagenia aleatoria por ejemplo utilizando mutagenia de trasposición, mutagenia dirigida a sitio. Los fragmentos de ADN resultantes se cloran luego en anfitriones de expresión adecuados tal como *E. coli* utilizando tecnología convencional y se detectan clones que retienen la actividad deseada. Como se mencionó anteriormente, la actividad deseada incluirá la inhibición competitiva de plasmina de única etapa del polipéptido progenitor o de referencia. Cuando se han derivado los clones utilizando técnicas de mutagenia aleatoria los clones positivos podrían ser secuenciados con el fin de detectar la mutación. El término “variante” también incluye variantes alélicas de ocurrencia natural.

En una realización preferida, la variante tiene la fórmula general:



en donde:

X es cualquier aminoácido;

\ddot{Y} es un aminoácido hidrófobo;

A es un aminoácido aromático o histidina, Z es K, R, H, D, E, Q o N; y

B es un aminoácido neutro, o P, A, G, S, T, V o L.

45

2.4 Derivados de Polipéptido de Textilinina

Con referencia a los derivados adecuados de la invención, tales derivados incluyen eliminaciones y/o adiciones de aminoácido para un polipéptido de Textilinina de acuerdo con la invención tal como, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2, y 4, o variantes de la misma, en donde dichos derivados retienen la inhibición competitiva de única etapa de plasmina. Las “Adiciones” de aminoácidos pueden incluir fusión del polipéptido, fragmentos del mismo o variantes de estos con otros polipéptidos o proteínas. A este respecto, se apreciará que los polipéptidos, fragmento de polipéptidos o variantes de la invención se pueden incorporar en polipéptidos más grandes, y también se espera que tales polipéptidos más grandes puedan retener la inhibición competitiva de única etapa de plasmina mencionada anteriormente.

Los polipéptidos de Textilinina de la invención, fragmentos de los mismos o variantes de estos se pueden fusionar a una proteína adicional por ejemplo, que no se deriva del anfitrión original. La otra proteína puede, por vía de ejemplo, ayudar en la purificación de la proteína. Por ejemplo se puede utilizar una etiqueta de polihistidina, o una proteína de unión de maltosa a este respecto como se describe en más detalle adelante. Alternativamente, esta puede producir una respuesta antigenica o respuesta inmunogénica que es efectiva contra el polipéptido o fragmento del mismo. Otras proteínas de fusión posibles son aquellas que producen una respuesta inmunomoduladora. Ejemplos particulares de tales proteínas incluyen proteína A o glutationa S-transferasa (GST).

Otros derivados contemplados por la invención incluyen, pero no se limitan a, modificación de cadenas laterales, incorporación de aminoácidos no naturales y/o sus derivados durante síntesis de péptido, polipéptido o proteína y el uso de reticuladores y otros métodos que imponen exigencias conformacionales en los polipéptidos, fragmentos y variantes de la invención.

ES 2 332 249 T3

Ejemplos de modificaciones de cadena lateral contempladas por la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tal como mediante acilación con anhídrido acético; acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; amidinación con metilacetimidato; carbamoilación de grupos amino con cianato; piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido por reducción con NaBH₄; alquilación reductora por reacción con un aldehído seguido por reducción con NaBH₄; y trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS).

Se puede modificar el grupo carboxilo mediante activación de carbodiimida por vía de formación de O-acilisourea seguida por derivación posterior, por vía de ejemplo, a una amida correspondiente.

Se puede modificar el grupo guanidina de los residuos de arginina mediante la formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilgioxal y gioxal.

Se pueden modificar los grupos sulfhidrilo mediante métodos tales como oxidación de ácido fórmico a ácido cisteíco; formación de derivados de mercurio utilizando ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, 4-cloromercuribenzoato; 2-cloromercuri-4-nitrofenol, cloruro de fenilmercurio, y otros mercuriales; formación de un disulfuro mezclado con otros compuestos de tiol; reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; y carbamoilación con cianato a pH alcalino.

Se pueden modificar residuos de triptofan, por ejemplo, mediante alquiación del anillo indol con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo o haluros de sulfonilo o mediante oxidación con N-bromosuccinimida.

Se pueden modificar residuos de tirosina mediante nitración con tetranitrometano para formar un derivado de 3-nitrotirosina.

Se puede modificar el anillo imidazol de un residuo de histidina mediante N-carbetoxilación con dietilpirocarnato o mediante alquiación con derivados de ácido yodoacético.

Ejemplos aminoácidos no naturales incorporados y derivados durante la síntesis de péptido incluyen pero no se limitan a, uso de ácido 4-amino butírico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, t-butilglicina, norleucina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, 2-tienil alanina y/o D-isómeros de aminoácidos. Una lista de aminoácidos no naturales contemplados por la presente invención se muestran en la Tabla 2.

35

TABLA 2

40

Aminoácido no convencional	Aminoácido no convencional
• Ácido -aminobutírico	L-N-metilanalanina
•-amino-•-metilbutirato	L-N-metilarginina

45

50

55

60

65

ES 2 332 249 T3

	Aminoácido no convencional	Aminoácido no convencional
5	aminociclopropano-carboxilato	L-N-metilasparagina
	Ácido aminoisobutírico	Ácido L-N-metilaspártico
	aminonorbornil-carboxilato	L-N-metilcisteína
10	ciclobexilanina	L-N-metilglutamina
	Ciclopentilanina	Ácido L-N-metilglutámico
	L-N-metilsoleucina	L-N-metilhistidina
	D-alanina	L-N-metilleucina
15	D-arginina	L-N-metillisina
	Ácido D-aspártico	L-N-metilmetionina
	D-cisteína	L-N-metilnorleucina
20	D-glutamato	L-N-metilnorvalina
	Ácido D-glutámico	L-N-metilomitina
	D-histidina	L-N-metilfenilanina
	D-isoleucina	L-N-metilprolina
25	D-leucina	L-N-medilserina
	D-lisina	L-N-metiltreonina
	D-metionina	L-N-metiltriptofan
30	D-ornitina	L-N-metiltirosina
	D-fenilalanina	L-N-metilvalina
	D-prolina	L-N-metiletilglicina
35	D-serina	L-N-metil-t-butilglicina
	D-treonina	L-norleucina
	D-triptofan	L-norvalina
40	D-tirosina	•-metil-aminoisobutirato
	D-valina	•-metil-•-aminobutirato
	D-•-metilanina	•-metilciclohexilanina
	D-•-metilarginina	•-metilcilpentilanina
45	D-•-metilasparagina	•-metil-•-naptilanina
	D-•-metilaspartato	•-metilpenicillamina
	D-•-metilcisteína	N-(4-aminobutil)glicina
50	D-•-metilglutamina	N-(2-aminoetil)glicina
	D-•-metilhistidina	N-(3-aminopropil)glicina
	D-a-metilsoleucina	N-amino-•-metilbutirato
55	D-•-metilleucina	•-naptilanina
	D-•-metillisina	N-bencilglicina
	D-•-metilmetionina	N-(2-carbamilediil)glicina
60	D-•-metilornitiina	N-(carbamilmetyl)glicina
	D-•-metilfenilanina	N-(2-carboxietil)glicina
	D-•-metilprolina	N-(carboximetil)glicina
	D-•-metilserina	N-ciclobutilglicina
65	D-•-metiltreonina	N-cicloheptilglicina
	D-•-metiltriptofan	N-ciclohexilglicina

Aminoácido no convencional	Aminoácido no convencional
D-•-metiltirosina	N-ciclooctilglicina
L-•-metileucina	L-•-metillisina
L-•-metilmetionina	L-•-metilnorleucina
L-•-metilnorvaltina	L-•-metilornitina
L-•-metilfenilalanina	L-•-metilprolina
L-•-metilserina	L-•-metiltreonina
L-•-metiltriptofan	L-•-metiltirosina
L-•-metivalina	L-N-metilhomoserilalanina
N-(N-(2,2-difeniletilcarbamilmethyl)glicina	N-(N-(3,3-difenilpropilcarbamilmethyl)glicina
1-carboxi-1-(2,2-difenil-ethylamino)ciclopropano	

La invención también contempla el uso de reticuladores, por ejemplo, para estabilizar conformaciones 3D de los péptidos u homólogos de péptido de la invención, utilizando reticuladores homo -bifuncionales tal como ésteres imido bufuncionales que tienen grupos espaciadores $(CH_2)_n$ con $n = 1$ a $n = 6$, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida y reactivos hetero-bifuncionales que usualmente contienen un grupo funcional reactivo amino tal como N-hidroxisuccinimida y otro grupo funcional reactivo específico tal como maleimido o grupo funcional ditio o carbodiimida. Adicionalmente, los péptidos se pueden exigir conformacionalmente, por ejemplo, mediante la introducción de enlaces dobles entre C_α y átomos C_β de los aminoácidos, mediante la incorporación C_α y N_α-metilaminoácidos, y mediante la formación de péptidos cílicos o análogos al introducir covalentemente enlaces tal como formación de una amida entre los terminales N y C de los péptidos o análogos. Por ejemplo, se puede hacer referencia a: Marlowe (1993, Biorganic & Medicinal Chemistry Letters 3:437-44) que describe la ciclización de péptido en resina TFA utilizando éster de trimetilsililo (TMSE) como un grupo protector ortogonal; Pallin and Tam (1995, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 2021-2022) que describe la ciclización de péptidos no protegidos en solución acuosa mediante formación de oxima; Algin *et al* (1994, Tetrahedron Letters 35: 9633-9636) que describe la síntesis de fase sólida de péptidos cílicos cabeza a cola por vía de anclaje de cadena lateral de lisina; Kates *et al* (1993, Tetrahedron Letters 34: 1549-1552) que describe la producción de péptidos cílicos cabeza a cola mediante la estrategia de fase sólida tridimensional; Tumelty *et al* (1994, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1067-1068) que describe la síntesis de péptidos cílicos de un intermedio activado inmovilizado, en donde la activación del péptido inmovilizado se lleva a cabo con un grupo N protector intacto y posterior remoción que conduce a ciclización; McMurray *et al* (1994, Peptide Research 7:195-206) que describe ciclización cabeza a cola de de péptidos adheridos a soportes insolubles por medio de cadenas laterales de ácido aspártico y glutámico; Hruby *et al* (1994, Reactive Polymers 22:231-241) que enseña un método alterno para ciclización de péptidos por vía de soportes sólidos; y Schmidt and Langer (1997, J. Peptide Res. 49:67-73) que describe un método para sintetizar ciclotetrapéptidos y ciclopentapéptidos. Se pueden utilizar los anteriores métodos para producir péptidos conformacionalmente exigentes con cinéticos de inhibición competitiva de única etapa con respecto de la plasmina.

La invención también contempla polipéptidos de Textilinina o fragmentos biológicamente activos de los mismos que se han modificado utilizando técnicas biológicas moleculares ordinarias con el fin de mejorar su resistencia a degradación proteolítica u optimizar las propiedades de solubilidad o hacerlas más adecuadas como agente terapéutico.

La presente invención abarca adicionalmente análogos químicos de polipéptidos de Textilinina o fragmentos biológicamente activos de los mismos cuyos análogos actúan como análogos funcionales de dichos polipéptidos o fragmentos. A este respecto, los análogos químicos no se pueden derivar necesariamente de dichos polipéptidos o fragmentos pero pueden compartir ciertas similitudes conformacionales. Alternativamente, se pueden diseñar específicamente los análogos químicos para imitar ciertas propiedades físicas de dichos polipéptidos o fragmentos. Se pueden sintetizar químicamente los análogos químicos o se pueden detectar siguiendo, por ejemplo, detección de productos naturales.

Se pueden preparar los polipéptidos de Textilinina mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar tales polipéptidos mediante un procedimiento que incluye las etapas de:

- (a) preparar un polinucleótido recombinante que contiene una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de Textilinina, por ejemplo, SEQ ID NO:2, 4, 16, o 18, o fragmento biológicamente activo respectivamente del mismo, o variante o derivado de este, tal secuencia de nucleótido se liga operablemente a ácido nucleico regulador transcripcional y transduccional;
- (b) introducir en una célula anfitriona adecuada el polinucleótido recombinante;
- (c) cultivar la célula anfitriona para expresar el polipéptido recombinante de dicho polinucleótido recombinante; y

ES 2 332 249 T3

(d) aislar el polipéptido recombinante.

De forma adecuada, dicho polinucleótido recombinante comprende una secuencia de Textilinina natural = aislada. Por ejemplo, se puede seleccionar tal polinucleótido de una cualquiera de la SEQ ID NO. 1, 3, 15, 17, y 43.

5 El polinucleótido recombinante preferiblemente comprende un sector de expresión que puede ser un vector extra-cromosómico de autoreplicación tal como un plásmido, o un vector que se integra en un genoma anfitrión.

10 El ácido nucleico regulador transcripcional y transduccional generalmente será apropiado para la célula anfitriona utilizada para la expresión. Numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas se conocen en la técnica para una variedad de células anfitrionas.

15 Típicamente, el ácido nucleico regulador transcripcional y transduccional puede incluir, pero no se limita a, secuencias promotoras, secuencias líder o de señal, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y parada transcripcionales, secuencias de inicio y parada transduccionales, y secuencias mejoradoras o activadoras.

20 Los promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica son contemplados por la invención. Los promotores pueden ser promotores de ocurrencia natural, o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor.

25 En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células anfitrionas transformadas. Los genes de selección son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula anfitrióna utilizada.

30 Con el fin de expresar dicho polipéptido de fusión, es necesario ligar las secuencias de nucleótido de acuerdo con la invención en el vector de expresión de tal manera que coinciden los marcos de lectura transduccional y la secuencia de nucleótido de la invención.

35 Ejemplos bien conocidos de socios de fusión incluyen, pero no se limitan a, glutationa-S-transferasa (GST), porción Fc de IgG humano, proteína de unión de maltosa (MBP) y hexahistidina (HIS6), que son particularmente útiles para el aislamiento del polipéptido de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para el propósito de purificación del polipéptido de fusión mediante cromatografía de afinidad, las matrices relevantes para cromatografía de afinidad son resinas conjugadas con glutationa-, amilosa-, y níquel- o cobalto respectivamente. Muchas de tales matrices están disponibles en forma de "equipo", tal como el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con (HIS6) socios de fusión y el sistema de purificación Pharmacia GST.

40 Otro socio de fusión bien conocido en la técnica es proteína fluorescente verde (GFP). Este socio de fusión sirve como una "etiqueta" fluorescente que permite al polipéptido de fusión de la invención ser identificado mediante microscopía fluorescente o mediante citometría de flujo. La etiqueta GFP es útil cuando se evalúa la localización subcelular del polipéptido de fusión de la invención, o para aislar células que expresan el polipéptido de fusión de la invención. Los métodos de citometría de flujo tal como clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) son particularmente útiles en esta última aplicación.

45 Preferiblemente, los socios de fusión también tienen sitios de división de proteasa, tal como para el Factor Xa o Trombina, que permiten a la proteasa relevante digerir parcialmente el polipéptido de fusión de la invención y por lo tanto liberar el polipéptido recombinante de la invención de este. El polipéptido liberado luego se puede aislar del socio de fusión mediante separación cromatográfica posterior.

50 Los socios de fusión de acuerdo con la invención también incluyen dentro del alcance "etiquetas epítopo" que son secuencias de péptido usualmente cortas para las cuales está disponible un anticuerpo específico. Ejemplos bien conocidos de etiquetas epítopo para tales anticuerpos monoclonales específicos que están fácilmente disponibles incluyen etiquetas c-Myc, virus de influenza, hemaglutinina y FLAG.

55 La etapa de introducir en la célula anfitriona el polinucleótido recombinante se puede efectuar por cualquier método adecuado que incluye transfección, y transformación, cuya elección dependerá de la célula anfitriona empleada. Tales métodos son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

60 Se puede producir el polipéptido recombinante de la invención al cultivar una célula anfitriona transformada con un vector de expresión que contiene ácido nucleico que codifica un polipéptido de Textilinina, fragmento, variante o derivado de acuerdo con la invención. Las condiciones apropiadas para la expresión de proteína variarán con la elección de vector de expresión y la célula anfitriona. Esto se comprueba fácilmente por un experto en la técnica a través de experimentación de rutina.

ES 2 332 249 T3

Las células anfitrionas adecuadas para la expresión pueden ser procarióticas y eucarióticas. Una célula anfitriona preferida para la expresión de un polipéptido de acuerdo con la invención es una bacteria. La bacteria utilizada puede ser *Escherichia coli*. Alternativamente, la célula anfitriona puede ser una célula de insecto tal como, por ejemplo, células SF9 que se pueden utilizar con un sistema de expresión de baculovirus.

5 La proteína recombinante se puede preparar convenientemente por una persona experta en la técnica utilizando protocolos estándar como por ejemplo los descritos en Sambrook, *et al.*, MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press, 1989), en particular Secciones 16 y 17; Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (John Wiley & Sons, Inc. 1994-1998), en particular Capítulos 10 y 16; 10 and Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997), en particular Capítulos 1, 5 y 6.

15 En algunos casos, el polipéptido recombinante puede requerir replegamiento. Métodos de ejemplo de polipéptidos replegados incluyen aquellos descritos por ejemplo por Bieri *et al.* (1995, Biochemistry, 34:13059-13065) y Norris *et al.*, (1994, Patente U.S. 5,373,090 a Novo Nordisk).

20 Alternativamente, los polipéptidos de Textilina, fragmentos de polipéptido, o variantes o derivados de estos, se pueden sintetizar utilizando síntesis de solución o síntesis de fase sólida como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 9 titulado "Síntesis de Péptido" por Atherton and Shephard which que se incluye en una publicación titulada "Vacunas Sintéticas editada por Nicholson y publicada por Blackwell Scientific Publications".

3. Polinucleótidos de la invención

25 3.1. Polinucleótidos de Textilinina

La invención proporciona adicionalmente un polinucleótido que codifica un polipéptido de Textilinina, fragmento, variante o derivado como se definió anteriormente. De forma adecuada dicho polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de.- SEQ NO: 1, 3, 15, 17, y 43; un fragmento de polinucleótido de una cualquiera de la SEQ ID NO: 30 1, 3, 15, 17, o 43; y un homólogo de polinucleótido de las secuencias anteriores. Preferiblemente, estas secuencias codifican un producto que exhibe inhibición competitiva de plasmina de única etapa como se definió anteriormente.

Como se describirá más completamente aquí adelante, se ha obtenido una familia de genes de Texilinina (Txln) 35 que codifican inhibidores competitivos de única etapa de plasmina de *Pseudonaja textilis textilis*. La SEQ ID NO:1 corresponde a una porción del gen Txln 1 que codifica el polipéptido Txln 1 maduro de aproximadamente 7 kDa como se define en la SEQ ID NO:2. La SEQ ID NO:3 corresponde a una porción del gen Txln 2 que codifica el polipéptido Txln 2 maduro de aproximadamente 7 kDa como se define en la SEQ ID NO:4. La SEQ ID NO:5, 7, 9 y 11, corresponde respectivamente a porciones de los genes Txln 3, Txln 4, Txln 5 y Txln 6. Estas porciones codifican los polipéptidos Txln 3, 4, 5 y 6 maduros, respectivamente.

40 La invención también proporciona polinucleótidos de marco de lectura abierto de longitud completa (ORF) en relación a Txln 1, y Txln 2. Cada uno de dichos polinucleótidos de longitud completa comprende una primera secuencia que codifica un péptido líder de 24 residuos, y una segunda secuencia que codifica un polipéptido Txln maduro. La primera secuencia preferiblemente comprende la SEQ ID NO:15. La SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, y 25 corresponde respectivamente a los polinucleótido ORF de longitud completa para Txln 1, Txln 2, Txln 3, Txln 4, Txln 5 y Txln 6. La SEQ ID NO:43 corresponde a la secuencia de cADN más grande obtenida para Txln 1, que comprende secuencias 5' UTR y a 3'UTR en adición a la secuencia ORF.

55 Alternativamente, una secuencia de polinucleótido que codifica los polipéptidos de Textilinina o fragmentos de 50 polipéptido de la invención se pueden preparar de forma conveniente al tomar ventaja del código genético y sintetizar por ejemplo, mediante el uso de un secuenciador de oligonucleótido, una secuencia de nucleótidos que cuando se traducen por una célula anfitriona resulta en la producción de un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:2, 4, 16, o 18, fragmentos de polipéptido del mismo.

55 3.2. Homólogos de polinucleótido

Se pueden preparar los homólogos de polinucleótido adecuados de la invención de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- 60 (i) obtener un extracto de ácido nucleico de un anfitrión adecuado;
- (ii) crear cebadores que se degeneran opcionalmente cuando cada uno comprende una porción de un polinucleótido de referencia; y
- 65 (iii) utilizar dichos cebadores para amplificar, por vía de técnicas de amplificación de ácido nucleico, por lo menos un producto de amplificación de dicho extracto de ácido nucleico, en donde dicho producto de amplificación corresponde a un homólogo de polinucleótido.

ES 2 332 249 T3

El anfitrión del cual se obtiene un extracto de ácido nucleico es preferiblemente una serpiente. Se pueden seleccionar serpientes adecuadas del grupo que consiste de la familia Elapidae, y la familia Viperidae.

De forma adecuada, los cebadores de seleccionan del grupo que consiste de:

- 5 (A) ATGAARGAYAGRCCCHGARYTNGAR [SEQ ID NO:27];
10 (B) GTRCTYTCRTGYTCYTCY [SEQ ID NO:28];
15 (C) ATATATGGATCCAAGGACCGGCCTGACTTC [SEQ ID NO:29];
(D) AACGGGAATTCTCAGAGCCACACGTGCTTTC [SEQ ID NO:30];
(E) AACGGGAATTCTCATGAGCCACAGGTAGACTC [SEQ ID NO:31];
(F)

20 **CTAATACGACTCACTATAAGGGCAAGCAGTGTAACAACGCCAGAG
T [SEQ ID NO:33];**

- 25 (G) CTAATACGACTCACTATAAGCGC [SEQ ID NO:33];
30 (H) AAGCAGTGGTAACAACCAGAGT [SEQ ID NO:34];
(I) ATCAGCGGATCCATGTCTGGAGGT [SEQ ID NO:35];
(J) TCTCCTGAATTCTCAGGCAGCACAGGT [SEQ ID NO:36];
35 (K) ATTATAGGATCCAAGGACCGTCCGGAT [SEQ ID NO:37];
(L) ATTATAGGATCCAAGGACCGTCCAGAG [SEQ ID NO:38];
(M) AACGTCGGATCCAAGGACCGTCAAAT [SEQ ID NO:39];
40 (N) AACGTCGGATCCAAGGACCATCCAAAA [SEQ ID NO:40];
(O) AACGTCGGAT TCAAGGACCG TCCAAAA [SEQ ID NO:41]
(P) ATTGTCGGATCCAAGGACCTGCCAAAG [SEQ ID NO:42].

Alternativamente, se puede obtener un homólogo de polinucleótido de la invención de una colección de polinucleótido derivada de un tejido de una serpiente. Tal una colección puede ser una colección de cADN de serpiente o colección de ADN genómico de serpiente.

Las técnicas de amplificación de ácido nucleico adecuadas son bien conocidas por los expertos, e incluyen reacción de cadena de polimerasa (PCR) como por ejemplo se describe en Ausubel *et al.* (1994-1998, *supra*, Chapter 15); amplificación de desplazamiento de hebra (SDA) como por ejemplo se describe en la Patente U.S. No 5,422,252; replicación de círculo giratorio (RCR) como por ejemplo se describe en Liu *et al.*, (1996, J. Am. Chem. Soc. 118:1587-1594 y solicitud Internacional WO92/01813) y Lizardi *et al.*, (Solicitud Internacional WO 97/19193); amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) como por ejemplo se describe por Sooknanan *et al.*, (1994, Biotechniques 17:1077-1080); y amplificación de replicasa Q-• como por ejemplo se describe por Tyagi *et al.*, (1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5395-5400).

55 Típicamente, los homólogos de polinucleótido que son sustancialmente complementarios a un polinucleótido de referencia se identifican por técnicas de transferencia que incluyen una etapa mediante la cual se inmovilizan los ácidos nucleicos en una matriz (preferiblemente una membrana sintética tal como nitrocelulosa), seguida por una etapa de hibridación, y una etapa de detección. La transferencia Southern se utiliza para identificar una secuencia de ADN complementaria; la inmunotransferencia se utiliza para identificar una secuencia de ARN complementaria. La transferencia Dot y transferencia slot se puede utilizar para identificar secuencias de polinucleótido ADN/ADN, ADN/ARN o ARN/ARN complementarias. Tales técnicas son bien conocidas por aquellos expertos en el arte, y se han descrito en Ausubel *et al.* (1994-1998, *supra*) en las páginas 2.9.1 a 2.9.20.

65 De acuerdo con tales métodos, la transferencia Southern involucra separar las moléculas de ADN de acuerdo con el tamaño mediante electrofóresis de gel, transferir el ADN separado por tamaño a una membrana sintética, e hibridar el ADN unido a la membrana a una secuencia de nucleótido complementaria etiquetada radioactivamente,

enzimáticamente o fluorocromáticamente. En la transferencia dot y transferencia slot, se aplican directamente las muestras de ADN a una membrana sintética antes de la hibridación como se mencionó anteriormente.

Una etapa de transferencia alternativa se utiliza cuando se identifica polinucleótidos complementarios en un cADN o colección de ADN genómico, tal como a través del proceso de placa o hibridación de colonia. Un ejemplo típico de este procedimiento se describe en Sambrook *et al.*, (1989, *supra*) Capítulos 8-12.

Típicamente, se puede utilizar el procedimiento general para determinar las condiciones de hibridación. Los polinucleótidos se immunotransfieren/transfieren a una membrana sintética como se describió anteriormente. Un polinucleótido de referencia tal como un polinucleótido de la invención se etiqueta como se describió anteriormente, y se analiza la capacidad de este polinucleótido etiquetado para hibridar con un polinucleótido inmovilizado.

Un experto reconocerá que un número de factores influencia la hibridación. La actividad específica de la secuencia de polinucleótido etiquetada radioactivamente debe ser típicamente mayor que o igual a aproximadamente 108 dpm/mg para proporcionar una señal detectable. Una secuencia de nucleótido radioetiquetada de actividad específica 108 a 109 dpm/mg puede detectar aproximadamente 0.5 pg de ADN. Es bien conocido en la técnica que suficiente ADN debe ser inmovilizado en la membrana para permitir detección. Es deseable tener exceso de ADN inmovilizado, usualmente 10 mg. La adición de un polímero inerte tal como 10% (w/v) de sulfato de dextrano (MW 500,000) o polietilenglicol 6000 durante la hibridación también se puede incrementar la sensibilidad de hibridación (ver Ausubel *supra* at 2.10.10).

Para alcanzar resultados significativos de la hibridación entre un polinucleótido inmovilizado en una membrana y un polinucleótido etiquetado, se debe hibridar una cantidad suficiente del polinucleótido etiquetado al polinucleótido inmovilizado siguiendo con lavado. El lavado asegura que el polinucleótido etiquetado se hibride solo al polinucleótido inmovilizado con un grado de complementariedad deseado al polinucleótido etiquetado.

Se entenderá que los homólogos de polinucleótido de acuerdo con la invención hibridarán a un polinucleótido de referencia bajo condiciones exigentes. Las condiciones exigentes típicas incluyen, por ejemplo, (1) fosfato de sodio dibásico 0.75 M/fosfato de sodio monobásico 0.5 M/1 mM de EDTA disodio/1% de sarcosil a aproximadamente 42°C durante por lo menos 30 minutos; o (2) urea 6.0 M/0.4% de laurel sulfato de sodio/0.1x SSC a aproximadamente 42°C durante por lo menos 30 minutos; o (3) 0.1x SSC/0.1% de SDS a aproximadamente 68°C durante por lo menos 20 minutos; o (4) 1x SSC/0.1% de SDS a aproximadamente 55°C durante aproximadamente 60 minutos; o (5) 1x SSC/0.1% de SDS a aproximadamente 62°C durante aproximadamente 60 minutos; o (6) 1x SSC/0.1% de SDS a aproximadamente 68°C durante aproximadamente 60 minutos; o (7) 0.2X SSC/0.1% de SDS a aproximadamente 62°C durante aproximadamente una hora; o (8) 0.2X SSC/0.1% de SDS a aproximadamente 68°C durante aproximadamente 60 minutos. Para un ejemplo detallado, ver CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY *supra* en las páginas 2.10.1 a 2.10.16, y Sambrook *et al.* in MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbour Press, 1989) en las secciones 1.101 a 1.104.

Típicamente aunque se llevan a cabo lavados exigentes en temperaturas de aproximadamente 42°C a 68°C, un experto en la técnica apreciará que otras temperaturas pueden ser adecuadas para condiciones exigentes. Típicamente la hibridación máxima ocurre de aproximadamente 20°C a 25°C por debajo del T_m para la formación de un Híbrido de ADN-ADN. Es bien conocido en la técnica que el T_m es la temperatura de fusión, o temperatura en la que disocian dos secuencias de polinucleótido complementarias. Se conocen en la técnica métodos para estimar T_m (ver CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY *supra* en la página 2.10.8). Típicamente ocurre la hibridación máxima de aproximadamente 10°C a 15°C por debajo del T_m para un híbrido de ADNARN.

Otras condiciones exigentes son bien conocidas en la técnica. Un experto reconocerá que varios factores se pueden manipular para optimizar la especificidad de la hibridación. La optimización de la exigencia de los lavados finales puede servir para asegurar un alto grado de hibridación.

Los métodos para detectar un polinucleótido marcado hibridado en un polinucleótido inmovilizado son bien conocidos por los practicantes en la técnica. Tales métodos incluyen autoradiografía, detección quimioluminescente, fluorescente y colorimétrica.

4. Vectores

Un polinucleótido de acuerdo con la invención se puede expresar adecuadamente en una célula anfitriona al ligar operablemente al polinucleótido con uno o más ácidos nucleicos reguladores. La construcción sintética o vector así producido se puede introducir primero en un organismo o parte del mismo antes de la expresión posterior de la construcción en una célula particular o tipo de tejido. Se contempla cualquier organismo adecuado por la invención que puede incluir organismos unicelulares así como también multicelulares. Los organismos unicelulares adecuados incluyen bacterias. Organismos multicelulares de ejemplo incluyen levadura, mamíferos y plantas.

La construcción del vector se puede efectuar por cualquier técnica adecuada como por ejemplo la descrita en las secciones relevantes de Ausubel *et al.* (*supra*) y Sambrook *et al.* (*supra*). Sin embargo, se debe notar que la presente invención no depende de y no se dirige a una cualquier técnica particular para la construcción del vector.

ES 2 332 249 T3

Las secuencias de nucleótido reguladoras que se pueden utilizar para regular la expresión del polinucleótido incluyen, pero no se limitan a, un promotor, un mejorador, y un terminador transcripcional. Tales secuencias reguladoras son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Los promotores adecuados se pueden utilizar para inducir la expresión de los polinucleótidos de la invención que incluyen promotores constitutivos y promotores inducibles.

5

5. Agentes terapéuticos

Una característica adicional de la invención es el uso del polipéptido, fragmento, variante o derivado de la invención (“agentes terapéuticos”) como activos en una composición farmacéutica para aliviar pacientes contra la pérdida de sangre. De forma adecuada, la composición farmacéutica comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

“Portador farmacéuticamente aceptable” significa un relleno sólido y líquido, sustancia diluyente o encapsulante que se puede utilizar de forma segura en la administración sistémica. Dependiendo de la ruta particular de administración, se puede utilizar una variedad de portadores farmacéuticamente aceptables, bien conocidos en la técnica. Estos portadores se pueden seleccionar de un grupo que incluye azúcares, almidón, celulosa y sus derivados, malta, gelatina, talco, sulfato de calcio, aceites vegetales, aceites sintéticos, polioles, ácido algínico, soluciones amortiguadas con fosfato, emulsificantes, solución salina isotónica, y agua libre de pirógenos.

20 Cualquier ruta adecuada de administración se puede emplear para proporcionar a un paciente con la composición de la invención. Por ejemplo, se puede emplear oral, rectal, parenteral, sublingual, bucal, intravenosa, intra-articular, intramuscular, intradérmica, subcutánea, inhalacional, intracocular, intraperitoneal, intracerebroventricular, transdérmica y similares. Preferiblemente, se emplea una ruta intravenosa.

25 Las formas de dosificación incluyen comprimidos, dispersiones, suspensiones, inyecciones, soluciones, jarabes, pastillas, cápsulas, supositorios, aerosoles, parches transdérmicos y similares. Estas formas de dosificación también pueden incluir inyectar o implantar dispositivos de liberación controlada diseñados específicamente para este propósito u otras formas de implantes modificadas para actuar adicionalmente en esta forma. La liberación controlada del agente terapéutico se puede efectuar al recubrir el mismo, por ejemplo, con polímeros hidrófobos que incluyen resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos mayores, ácido poliláctico y poliglicólico y ciertos derivados de celulosa tal como hidroxipropilmetyl celulosa. Adicionalmente, se puede efectuar liberación controlada al utilizar otras matrices de polímero, liposomas y/o microesferas.

35 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración oral o parenteral se pueden presentar como unidades discretas tal como cápsulas, sobres o comprimidos cada uno contiene una cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos de la invención, como un polvo o gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión agua en aceite o una emulsión aceite en agua. Tales composiciones se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos de farmacia pero todos los métodos incluyen la etapa asociar uno o más agentes inmunogénicos como se describió anteriormente con el portador que 40 constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan al mezclar uniformemente e íntimamente los agentes inmunogénicos de la invención con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, formar el producto en la presentación deseada.

45 Las anteriores composiciones se pueden administrar en una forma compatible con la formulación de dosificación, y en tal cantidad cuando es terapéuticamente efectiva para aliviar los pacientes de la pérdida de sangre. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para efectuar una respuesta benéfica en un paciente durante el tiempo tal como una reducción o cesación de la pérdida de sangre. La cantidad de los agentes terapéuticos a ser administrados puede depender del sujeto a ser tratado inclusive de la edad, sexo, peso y condición de salud general del mismo. En este respecto, las cantidades precisas de los agentes terapéuticos para 50 administración dependerán del juicio del médico. Para determinar la cantidad efectiva del agente terapéutico a ser administrado en el tratamiento de la pérdida de sangre, el médico puede evaluar la progresión de la pérdida de sangre durante el tiempo. En cualquier evento, aquellos expertos en la técnica pueden determinar fácilmente las dosificaciones adecuadas de los agentes terapéuticos de la invención. Tales dosificaciones pueden estar en el orden de nanogramos a miligramos del terapéutico.

55

6. Agente antineoplásico

La invención también se extiende a un agente antineoplásico que comprende un polipéptido, fragmento de polipéptido, variante de derivado de acuerdo con la invención conjugado con un anticuerpo antifibrina. Tal un conjugado puede por lo tanto inhibir la progresión e invasividad de tales tumores. Se puede hacer referencia a este respecto a un resumen por Raut y Gaffney (1996, Fibrinolysis 10 (Suppl. 4):1-26, Resumen No 39).

60 Los anticuerpos anti-fibrina pueden incluir cualesquier anticuerpos adecuados que unen a un conjugado con fibrina, preferiblemente fibrina humana. Por ejemplo, los anticuerpos antifibrina pueden comprender anticuerpos policlonales. Tales anticuerpos se pueden preparar por ejemplo al inyectar fibrina en una especie de producción, que puede incluir ratones o conejos, para obtener antisuero policlonal.

ES 2 332 249 T3

En vista del antisuero policlonal antifibrina obtenido en la especie de producción, se pueden producir anticuerpos monoclonales utilizando el método estándar como por ejemplo, se describe en un artículo por Köhler y Milstein (1975, *Nature* 256: 495-497) que se incorpora aquí como referencia, o por modificaciones más recientes del mismo como por ejemplo, se describe en "CURRENT PROTOCOLS INIMMUNOLOGY" (1994, Ed. J.E. Coligan, A.M. 5 Kruisbeek, D.H. Marguiles, E.M. Shevach y W. Strober, John Wiley y Son Inc.) al inmortalizar el bazo u otras células que producen anticuerpos derivados de una especie de producción que se ha inoculado con fibrina.

Los anticuerpos monoclonales preferidos que se pueden utilizar para producir el agente antineoplásico de la invención incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos monoclonales antifibrina por Tymkewycz *et al* (1993, *Blood Coagul. Fibrinol.* 4:211-221) o el anticuerpo monoclonal descrito por Raut y Gaffney (1996, *supra*). 10

También se contemplan anticuerpos anti-fibrina que comprenden fragmentos Fc o Fab de los anticuerpos policlonal o monoclonal referidos anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos antifibrina pueden comprender anticuerpos Fv de cadena única (scFvs) contra fibrina. Tales scFvs se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con los métodos 15 descritos respectivamente en la Patente Estadounidense No 5,091,513, Patente Europea No 239,400 o el artículo por Winter y Milstein (1991, *Nature* 349:293).

Se puede utilizar cualquier procedimiento adecuado para conjugar los anticuerpos antifibrina con un polipéptido, 20 fragmento de polipéptido, variante o derivado de acuerdo con la invención. Por ejemplo, se puede hacer referencia al procedimiento de reticulación de "longitud cero" de Grabarek y Gergely (1990, *Anal. Biochem.* 185:131-135).

Con el fin de que la invención se puede entender fácilmente y poner en efecto práctico, las realizaciones preferidas particulares ahora se describirán por vía de los siguientes ejemplos no limitantes. 25

Ejemplos

Ejemplo 1

30 *Caracterización de dos Inhibidores de Plasmina de Pseudonaja Textilis Textilis que Inhiben la hemorragia en un Modelo Animal*

Materiales y métodos

35 Materiales

Se obtiene veneno de *P textilis* liofilizado y agrupado Mr Peter Mirtschin, Venom Supplies, Tanunda, South Australia. El veneno se reconstituye en 0.05 Mtris-amortiguador de HCl pH 7.4, a 10 mg/ml y la solución se centrifuga (2,000 g durante 30 min) antes de cromatografía o análisis. Se obtienen Sefacril S-300, Sefacril S-100, con A-Sefarosa 40 y DEAESEfarosa CL-6B de Pharmacia Uppsala, Suiza, y el sustrato cromogénico sintético S-2251 es de Chromogenix, Mölndal, Suiza. Una plasmina altamente purificada de Sanofi/Choay Laboratories (Paris) se utiliza para algunos experimentos cinéticos. Todos los otros amortiguadores y reactivos son de grado Analar.

45 Preparación de plasminógeno y plasmina

Se purifica plasminógeno humano de plasma citrado agrupado vencido utilizando el procedimiento de cromatografía de afinidad descrito (Deutsch y Mertz. 1970, *Science* 170:1095). Se prepara plasmina humana de plasminógeno mediante activación con Sefarosa 4B unida a uroquinasa (Robbins, KC., 1978 "Plasmin" In: *Handbook of experimental pharmacology*. Markwardt F, ed. Berlin: Springer 46: 317,) y se calibra contra el Estándar Internacional para plasmina (77/558). 50

55 Ensayo inhibidor de plasmina

El ensayo inhibidor de plasmina se lleva a cabo esencialmente como se describe (Friberger *et al.* 1978., *Haemostasis* 7:138). Se agregan 900 mL de 0.15 M tris-HCl, pH 7.4, 25 mL (0.1IU) de plasmina, 25 mL del inhibidor a 50 mL del sustrato S-2251 (3.0 mM) y la plasmina residual se determina por medición continua de la absorbancia de 405 nm en un espectrofotómetro de registro Hitachi 557. Se prepara una curva estándar de actividad de plasmina utilizando el Estándar Internacional (77/558). 60

Purificación de Txln 1 y 2

65 Describimos aquí los procedimientos de purificación de primer tiempo que permiten el aislamiento de dos formas distintas del inhibidor Txln. Se equilibra una columna Sefacril S-300 (5.0 x 95 cm) a 4°C con 0.1 M de amortiguador de acetato de amonio (pH 7.0) en una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. Se reconstituye 500 mg de veneno P. textilis liofilizado 25 mL de amortiguador de columna, y luego se centrifuga a 10,000 rpm durante 20 minutos, se aplica

ES 2 332 249 T3

a la columna. Se recolectan 12 mL de fracciones utilizando un recolector de fracción LKB, y el eluado se monitorea a 280 nm utilizando un detector UV en línea de longitud de onda dual Altex. Se concentran las fracciones inhibidoras de plasmina agrupadas utilizando un concentrador de célula agitado Amicon Modelo 402 con una membrana YM 3 y este concentrado se aplica a la columna DEAE-Sefarosa. La columna DEAE-Sefarosa (2.5 x 12 cm) se equilibra a 4°C con 5 0.05 M de amortiguador de fosfato (pH 8.0) en una velocidad de flujo de 1.0 mL por minuto. Luego de la aplicación del inhibidor plasmina concentrado, la columna se lava con amortiguador dando un pico de proteína no limitado sin actividad inhibidora de plasmina. Un gradiente lineal de NaCl (0-0.5 M, 500 mL) se aplica en una velocidad de flujo de 1.0 mL por minuto con el fin de separar las dos formas de Txln. Los inhibidores de plasmina agrupados 1 y 2 (se concentran en la célula Amicon) se purifican individualmente adicionalmente en una columna Sefacril™ S-100 10 (2.5 x 95 cm) que se equilibra con 0.05 M Tris-HCl, (pH 7.4). Las fracciones con la actividad inhibidora de plasmina más alta se agrupan, se concentran y se almacenan en concentraciones de aproximadamente 1mg/mL (h143mM) en solución salina amortiguada Tris. Finalmente se remueve un contaminante de traza de las muestras de Txln 1 y Txln 2 mediante la aplicación de una columna de A-Sefarosa (1 x 10 cm) se equilibra con 0.15 M de amortiguador Tris-HCl 15 (pH 7.4). Los inhibidores de plasmina concentrados y agrupados se aplican a esta Columna en una velocidad de flujo de 1.0 mL por minuto y la actividad inhibidora se encuentra en el pico de lavado.

La pureza de las preparaciones Txln se revisa mediante HPLC de fase inversa (RP) en una columna de paquete Waters C18 mbond (0.6 x 30 cm) se equilibra con 0.05% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua y se desarrolla 20 utilizando un gradiente de 0 a 70% de acetonitrilo en 0.05% TFA. La cromatografía se monitorea a 214 nm y el gradiente se desarrolla durante 60 minutos. Se realiza revisión adicional de la pureza utilizando Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)-Electrofóresis Poliacrilamida (PAGE) (Weber y Osborn, 1969. J. Biol. Chem. 244:4406) aunque las muestras se preparan mediante un método que incorpora 4 M urea en la solución de muestra (Gaffney y Dobos, 1971, FEBS Lett. 15:13).

25

Secuenciamiento de aminoácido

Se desarrollan la reducción y carboximetilación de Txln 1 y 2 en 6 M de clorhidrato de guanidina, 0.1 M de 30 amortiguador Tris- HCL, 1mMEDTA, (pH 9.5) con 10mM de ditioreitol (DTT) durante 2 horas bajo Argón a 37°C. La etapa de carboximetilación (CM) se desarrolla con 15 mM de ácido yodoacético durante 30 minutos. Se digiere 35 el CM Txln 1 y 2 con endoproteinasa Lys C y endoproteinasa Asp N respectivamente en 50 mM de amortiguador de fosfato, pH 8.0 a 37°C durante 18 horas, utilizando una relación de enzima a sustrato de (1:100). Se detienen las reacciones mediante acidificación con TFA y los digeridos se fraccionan mediante RP-HPLC en una columna Vydac C8 (2.1 x 150 mm) utilizando un cromatógrafo líquido Hewlett Packard 1090 equipado con un detector de disposición de diodos. En una velocidad de flujo de 0.2 ml/min se forman gradientes lineales entre 0.1% de TFA en agua y 0.1% de TFA en 70% de acetonitrilo. Se llevan a cabo todas las cromatografías a temperatura ambiente. Se llevan a cabo 40 las determinaciones de la secuencia de aminoácido en un secuenciador Hewlett Packard G10005A mediante primero llevar a cabo el secuenciado terminal N largo de Txln 1 y 2. Las secuencias de terminal C para Txln 1 y 2 se derivan del fragmento de terminal C obtenido de las digestiones endoLys C y endoproteinasa Asp N. La evidencia para la secuencia se deriva de una secuencia de terminal N larga que corre de la molécula completa, una secuencia extendida de un péptido endoLys C mediante cromatografía adicional de uno de los péptidos aislados mediante cromatografía de fase inversa y la secuencia de una endoproteinasa Asp de péptido N. Se identifican los dos aminoácidos de terminal C de la secuencia de c-ADN de longitud completa obtenida durante la clonación y expresión de textilinina en *E. coli* (como se describe aquí después en el Ejemplo 2).

45

Espectrometría de Masa

Se desarrolla desorción/ionización de matriz asistida por láser (MALDI) de espectrometría de masa en tiempo 50 de vuelo (TOF) con un espectrómetro de masa Bruker Reflex (Bruker-Franzen Analytik GMBH, Breman, Alemania) operado exclusivamente en el modo reflectrón. Se diluyen muestras en 30% de acetonitrilo acuoso que contiene 0.1% de ácido trifluoroacético y 2 mL de una matriz comprendida de 2,6-dihidroacetofenona que contiene hidrogen citrato diamonio antes de la deposición de 0.5 -1 mL en un objetivo de acero inoxidable.

55

Modelo de sangrado de vena de cola del ratón

Se establece un modelo de sangrado utilizando ratones no consanguíneos Quackenbush maduros (promedio 20 60 gramos) de ambos sexos después que se induce anestesia mediante inyección intraperitoneal de 0.4 mL de dilución uno en diez de una mezcla de volumen igual de Cetamina (100 mg/mL) y Rompun (xilazina, 40 mg/mL). Se hace suministro intravenoso de la vena en la cola de aprotinina, los dos txln (100 mg/100mL de solución salina para cada sustancia) después de anestesia se fija y se hace excisión de la cola 2 minutos después para cada ratón. La dosis de los inhibidores de plasmina utilizados en estos experimentos es similar a la que se utiliza durante cirugía humana CPB para el peso del ratón de 20 gramos. La pérdida de sangre se mide mediante recolección en tubos eppendorf 65 prepesados. La exactitud dicta que la pérdida de sangre se mide por peso que por volumen. Todos los ratones se les practican la eutanasia mediante dislocación cervical. Todos los experimentos de ratones se aprueban por el Comité de Ética del Hospital Princesa Alexandra. Este comité no fomenta un estudio de respuesta de dosis y los inventores consideran que una dosis ajustada utilizada en cirugía humana es una base realista para estos estudios iniciales. Tal

ES 2 332 249 T3

una dosis del Txln se observa que no induce cualesquier efectos adversos en los ratones cuando se observa guante un periodo de 2 días.

5 Cinéticas de inhibición de plasmina

Los procedimientos para la investigación de cinéticas de inhibición de plasmina mediante las dos textilininas purificadas (Txln 1 y Txln 2) son de acuerdo con aquellos descritos (Stone *et al.*, 1984, Biochim. Pharmacol. 33:175) y difieren del método utilizado para estudiar la preparación de Txln impuro (Willmott *et al.*, 1995, *supra*) en que se utilizan concentraciones de enzima mayores de 4-veces y 36-veces. Este último método permite la truncación de la escala de tiempo de una hora a diez minutos o menos. Se desarrollan ensayos de inhibidor de enzima a 25°C en 0.1 M Tris/HCl, pH 7.4, que contiene 0.01% (v/v) Tween 80. Una concentración de 2 nM o 18 nM plasmina se utiliza en estos experimentos con 75 mM del sustrato cromogénico (S-2251) y 16-410 nM Txln. Sobre la base que el patrón de la inhibición de plasmina es de la forma asociada con inhibición de unión ajustada lenta, se analizan las curvas de progreso en términos de la relación:

$$[P] = v_s + (v_s - v_0)(1 - \exp(-kt)) / k \quad (\text{Ec. 1})$$

que describe la dependencia de tiempo de la concentración de producto cromogénico [P] como una función de las velocidades inicial (v_0) y finalmente alcanzada (v_s) y la constante de velocidad evidente (k) para la transición entre los estados inicial y final (constante). Para el sistema actual la velocidad inicial en los experimentos conducidos con una concentración fija de sustrato cromogénico [S] no exhibe dependencia de la concentración de inhibidor [I] - una circunstancia simple que le permite a V_0 ser identificada como la velocidad inicial en la ausencia del inhibidor de plasmina (ver ecuación 2). Bajo aquellas condiciones la constante de velocidad (k) se puede expresar en términos de la constante de inhibidor competitivo (K_i) y la Constante Michaelis para el sustrato cromogénico (K_m) como

$$k = k_d [1 + I / (K_i (1 + [S] / K_m))] \quad (\text{Ec. 2})$$

En donde k_d es la constante de velocidad para disociación del complejo inhibidor de plasmina (Stone *et al.*, 1984, *supra*). Ya que la velocidad en estado constante, v_s , se puede expresar en términos de la velocidad V máxima y la relación para la inhibición competitiva clásica, a saber,

$$v_s = V[S]/(1 + K_m[S] + K_i[I]) \quad (\text{Ec. 3})$$

la constante de inhibidor K_i y la constante de velocidad de disociación k_d cuando los dos parámetros se fijan a la curva emergen del análisis global de las curvas de progreso.

45 Resultados

Datos de purificación

La Figura 1 muestra la separación cromatográfica de Sefacril S-300 de proteínas del veneno crudo que muestra tres picos mayores y dos picos menores de proteína, marcados 1-5. La actividad inhibidora de plasmina se indica en el hombro derecho del cuarto pico (ver área sombreada), utilizando en ensayo de neutralización de plasmina para monitorear las fracciones eluadas. El fraccionamiento adicional de las fracciones de inhibidor agrupadas, (Amicon YM3 concentrado), se desarrolla en una columna Dear-Sefarosa CL-6B, la Figura 3 muestra la separación resultante, lo que indica dos picos distintos de la actividad inhibidora de plasmina, marcado por barras horizontales sólidas y marcado 1 y 2. Cada pico se agrupa separadamente, se concentra y se aplica a una columna Sefacril S-100 para remover las impurezas de trazas. La Figura 2 muestra el perfil de elución de Txln 1, que es idéntico al de Txln 2, sin embargo el inserto en la Figura 2 muestra los perfiles HPLC de fase inversa de cada Txln que indica que cada uno tiene un volumen de elución distinto de esta Columna. La pureza del material eluido Sefacril S-100 se demuestra adicionalmente por electrofóresis de gel SDS-PAGE (datos no mostrados). Se almacenan inhibidores de plasmina concentrados finales a -20°C en 0.05 M de solución salina amortiguada en una concentración final de aproximadamente 1 mg/mL.

Aunque son adecuadas estas preparaciones para caracterización física y cinética, se nota que Txln 1 y 2 origina distensión en el modelo de ratón utilizado para evaluar la pérdida de sangre. Para tales experimentos es necesario remover la cantidad de traza de un complejo activador de protrombina potente utilizando una columna con A-Sefarosa como se describe (Masci PP. 1986. The effects of Australian snake venoms on coagulation y fibrinolysis. Masters Thesis; University of Queensland).

Secuencia primaria

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos de Txln 1 y 2 con aquella del inhibidor de plasmina asociado con aprotinina y Taicotoxins aislado del veneno de la Taipán Oriental Australiana, *Oxiuranus scutellatus* (que tiene la homología más cercana a Txln 1 y 2) para comparación. Se puede ver que todos los cuatro inhibidores de plasmina tienen las disposiciones cisteína que son típicas para estos grupos de inhibidores de plasmina y dotados con gran estabilidad. Se encuentra que el Txln 1 y 2 se pueden calentar a 80°C durante dos horas sin pérdida de actividad inhibidora (datos no publicados). Una diferencia de la secuencia de seis aminoácidos se observa entre Txln 1 y 2, mientras cada uno muestra, respectivamente, 45 y 43% de homología con aprotinina. Existe 58% y 55% de homología, respectivamente, entre Txln 1 y 2 y el inhibidor de plasmina asociado con Taicotoxina. Ambos Txlns son proteínas muy acídicas con cargas negativas neta de -4 (Txln 1) y -6 (Txln 2), mientras la aprotinina es muy básica, que tiene una carga neta de +6. Los datos de espectroscopia de masa para Txln 1 y 2 muestran pesos moleculares de 6682.4 y 6689.3 (datos no mostrados), que están muy acordes con los pesos moleculares de las composiciones de aminoácido.

15

Datos cinéticos

La Figura 4 presenta curvas de progreso para hidrólisis de sustrato cromogénico por 2 nM de plasmina en la presencia de 0-410 nM Txln 1. Estos datos semejan más cercanamente aquellos reportados para aprotinina (Willmott et al., 1995, *supra*); nuestros datos anteriores con Txln impuro sugieren inhibición competitiva simple, aunque estos últimos datos con Txln purificado 1 y 2 semejan más el mecanismo de dos etapas de aprotinina. La constante de inhibidor (Ki) se deduce de aquellos datos mediante análisis global en términos de las Ecuaciones 1-3 que se Presentan en la Tabla 3, junto con valores correspondientes para Txln 2 y la mezcla de textilininas que se co-cromatografián antes de cromatografía de DEAE-Sefarosa.

25

TABLA 3

30

	Concentración de plasmina	
	22 nM (n=6) Media 6 DE	18 nM (n=6) Media 6 DE
Sefacril 100 Pool (Txln 1 y 2)	7.1 x 10 ⁻⁹ ± 0.2	13.9 x 10 ⁻⁹ ± 0.3
Txln 1	3.5 x 10 ⁻⁹ ± 3	2.6 x 10 ⁻⁹ ± 0.2
Txln 2	2.2 x 10 ⁻⁹ ± 0.2	2.8 x 10 ⁻⁹ ± 0.3
Aprotinina*	5.3 x 10 ⁻¹¹	

45

Los resultados correspondientes de las curvas de progreso para los experimentos con una concentración de plás-mido mayor (18 nM) también se resumen en la Tabla 3. La comparación de las constantes de inhibidor para los Txln 1 y 2 aislados, que son indistinguibles de cada otro, que para la preparación parcialmente purificada sugiere que una purificación de proteína de 3- a 5- veces se ha alcanzado mediante intercambio de ión y etapas de cromatografía extra Sefacril S-100. Las constantes de inhibidor mostradas en la Tabla 3 son mucho más pequeñas que el valor de 150 mM reportado previamente (Willmott et al., 1995, *supra*) para la preparación de Txln impuro. La resistencia incrementada de la unión de Txln-plasmina observada en este estudio actual refleja la remoción de compuestos no identificados del Txln durante las últimas etapas del actual procedimiento de purificación más extenso. A pesar de esto, los valores Ki de los Txln puros para plasmina son aproximadamente 100 veces menores para los observados para aprotinina (Willmott et al., 1995, *supra*).

55

Comportamiento de los Txln en un modelo de sangrado de animal

Ya que la inhibición de Txln de la actividad de plasmina es mucho más débil (100 veces, ver Tabla 3) que la observada para aprotinina, se ha utilizado un modelo de animal para establecer la efectividad del Txln en la contención de la pérdida de sangre cuando este se utiliza en la misma dosificación como la aprotinina.

65

El efecto de suministro intravenoso de (vena de la cola) Txln 1 y 2 en la pérdida de sangre de la vena de la cola cortada de un ratón se muestra en la Tabla 4 y para comparación también se muestran los resultados para aprotinina.

ES 2 332 249 T3

TABLA 4

	Peso de la sangre (gms) (N=24) media ± DE	Reducción promedio en pérdida de sangre (%)
Control (solución salina)	0.869 ± 0.245	-
Aprotinina (100 mg)	0.352 ± 0.152	59.5
Txln (100 mg)	0.386 ± 0.250	55.6
Txln (100 mg)	0.329 ± 0.234	62.2

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

La cantidad utilizada es equivalente en una cantidad To de peso base de aprotinina utilizada clínicamente en humanos y esta es 100 mg de cada sustancia estudiada por promedio de 20 gramos ratón. Se puede ver de la Tabla 4 que la aprotinina reduce la pérdida de sangre en 60% mientras que ambos Txln reducen la pérdida de sangre a un grado similar cuando se compara con controles inyectados con solución salina. La validez de estas comparaciones puede necesitar escrutinio adicional como la cantidad de los Txln y la aprotinina utilizada en el modelo de animal son con base en la neutralización de plasmina in vitro y se puede someter a algún error. Puede ser más apropiada la comparación molar de cantidades de estos inhibidores que se puede utilizar en experimentos futuros.

Discusión

La reducción en el flujo de sangre durante cirugía mayor o luego de trauma es de relación actual debido a un estado de donante de sangre deteriorado. La incidencia incrementada de contaminación vírica de la sangre ha introducido problemas socio-médicos que no parecen disminuir. Existe una ansiedad relacionada con la contaminación de la sangre por VIH, virus de la hepatitis B y C, aunque el potencial para la contaminación reticulada por priones asociada con Encefalitis Espóngiforme de Bovino (BSE) y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) subsiste una preocupación mayor sobre el área de transfusión de sangre completa.

Se utiliza aprotinina derivada de pulmón de bovino para contener el flujo sanguíneo durante procedimientos quirúrgicos tal como bypass cardio-pulmonar (CPB) (Royston D. 1990. Blood Coagul. Fibrinol. 1:53; Royston D. 1992. J. Cardiothorac. Vasc. Anesh. 6:76.). De hecho, mientras que el CPB es la circunstancia quirúrgica principal en la que se utiliza aprotinina, la pérdida de sangre durante neurocirugía (Gurdetti y Spallone. 1981. Surg. Neurol. 15:239), cirugías ortopédica (Ketterl *et al.*, 1982. Medizinische Welt 33:480), de hígado (Neuhaus *et al.* 1989 Lancet ii:924) y urológica (Kosters y Wand. 1973. Urologe 12:295) se ha reducido utilizando este fármaco. Este amplio uso es a pesar de algunos reportes de trombosis (Van der Meer *et al.*, 1996. Thromb. Haemost. 75:1; Cosgrove *et al.*, 1992. Ann. Thorac. Surg. 54:1031; Samama *et al.*, 1994 Thromb. Haemost. 71:663) y anafilaxis fatal durante cirugía cardiaca (Diefenbach *et al.*, 1995. Anesth. Analg. 80:830). Aunque el mecanismo exacto de acción de aprotinina no se conoce este ahora acepta que la inhibición de plasmina es central por su capacidad para reducir la pérdida de sangre (Royston D. 1990., *supra*; Orchard *et al.*, 1993. Br. J. Haematol. 85:596). Sin embargo, la aprotinina tiene otros efectos en la cascada de coagulación y en la función de plaqueta (Westaby, S. 1993. Ann. Thorac. Surg. 55:1033). Los receptores GPIIb/IIIa que son en su mayoría responsables para la adhesión de plaqueta no se afecta por contacto con superficies de circuito bypass mientras que el receptor GPIb de plaqueta de grado plasmina que puede reducir la capacidad de las plaquetas para formar trombos hemostáticos (Wenger *et al.*, 1989. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 97:235). Así la inhibición de plasmina también puede afectar este último mecanismo de plaqueta mejora la capacidad del trombo hemostático. Vale la pena aquí indicar que la aprotinina se ha encontrado por inhibidor la proteína C (Cooper BE. 1995. J. Pharm. Technol. 11:156), que a su vez resultaría en la reducción de la producción de trombina y mejora la fibrinólisis (Gaffney PJ, Edgell TA. Fibrinolyses Y the haemostatic balance. "Harmonisation of some old and new concepts". In: Recent progress in blood coagulation y fibrinolysis. Takada A, Collen D, Gaffney PJ, Eds. Amsterdam; Elsevier Science BV 127, 1997).

Estos últimos efectos pueden reducir la efectividad de las aprotininas para reducir la pérdida de sangre. Aunque la carencia de la especificidad de aprotinina induce confusión acerca de su mecanismo de acción la inhibición de plasmina parece aún ser central con su efectividad. La reducción en la formación del dímero de fragmento de fibrina D en pacientes tratados con aprotinina ha sido la evidencia principal (Orchard of al., 1993, *supra*; Ray y Marsh. 1997. Thromb. Haemost. 78:1021; Dietrich *et al.*, 1990. Anesthesiology 73:1119) que la inhibición de plasmina es central en su mecanismo; sin embargo se ha argumentado (Dietrich *et al.*, 1990, *supra*) que la inhibición de la formación de fibrina y así reducción en la activación mediada por fibrina de plasminógeno para plasmina también puede ofrecer una explicación para la reducción en los niveles del dímero D.

Con el fin de proporcionar otros hemostáticos alternativos con base en la inhibición de plasmina, se han estudiado venenos de serpiente durante algunos años. El primer informe de un inhibidor de plasmina/tripsina encontrado en el veneno de serpiente es por Takahashi *et al* 1972. FEBS Lett. 27;207), aunque existen informes adicionales de los

inhibidores de plasmina en otros venenos de elápidos y víboras (Shafqut *et al.*, 1990. Eur. J. Biochem. 194 (2):337; Shajqut *et al.*, 1990. FEBS Lett. 275:6; Yamakawa *et al.*, 1987. Biochim. Biophys. Acta 925:124; Ritonja *et al.*, 1983. Eur. J. Biochem. 133: 427; Strydom *et al.*, 1979. Biochim. Biophys. Acta 491:361). La detección de venenos elápidos Australianos ha mostrado que dos géneros de serpientes poseen potentes inhibidores de plasmina (Masci PP. Masters Thesis 1986, *supra*). Existen el género Pseudonaja y Oxiuranus. En el género Pseudonaja, el veneno de todas las especies se muestra por poseer un inhibidor de plasmina. Este inhibidor se ha purificado parcialmente y cinéticamente caracterizado de las subespecies textiles (Wilmott *et al.*, 1995, *supra*) y se ha llamado posteriormente Textilinina (Txln). La purificación adicional (Figuras 1 y 3) ha mostrado que existen dos formas de este inhibidor, Txln 1 y 2. En el género Oxiuranus, el veneno de solo una especie ha mostrado que contiene un inhibidor plasmina/tripsina que se ha secuenciado y mostrado por estar asociado en un complejo multimérico (Possani *et al.*, 1992. Toxicol. 30:1343). Se demuestra este complejo por ser un bloqueador del canal de calcio que contienen una neurotoxina alfa, una fosfolipasa y el inhibidor tripsina llamado Taicotoxina. La Figura 5 muestra que este inhibidor de Tripsina (TAC) tiene 58 y 55% de homología con Txln 1 y 2, respectivamente, y esta es la homología más cercana a las Textitininas de los inhibidores de plasmina de ocurrencia natural conocidos. Existe solo 45 y 43% de homología entre Txln 1 y 2, respectivamente, y aprotinina. Existen 6 aminoácidos diferentes entre Txlns 1 y 2, y ambos son acídicos, que contienen cargas negativas netas (-4 y -6 respectivamente), como distintas de aprotinina que es la molécula básica A (+6).

Aunque el estudio de las cinéticas de una preparación de plasmina parcialmente purificada del veneno *P. texilis*, se ha observado (Wilmott *et al.*, 1995, *supra*) que este inhibidor unido rápidamente y más específicamente para la plasmina que para la aprotinina (Fritz y Wanderer. 1983. Drug Res. 4:479). Los resultados también muestran que la textilinina se une menos firmemente a la plasmina que a la aprotinina. La especificidad de aprotinina se ha mostrado por ser amplia base, tPA neutralizante, uroquinasa y calicreína, así como también plasmina y tripsina (Fritz y Wanderer. 1983, *supra*) aunque los estudios del inhibidor de plasmina de veneno de serpiente, Txln, se ha mostrado por unir más específicamente a plasmina y tripsina en una reacción de única etapa rápida que parece ser reversible (Wilmott *et al.*, 1995, *supra*). Ya que se ha reportado la aprotinina (Van der Meer *et al.*, 1996, *supra*; Cosgrove *et al.*, 1992, *supra*; Samama *et al.*, 1994., *supra*) por estar asociada con incidencia incrementada de oclusión de injerto de vena y trombosis, Se supone que un inhibidor de unión menos firme tal como Txln puede ser de mayor eficacia clínica. Este hallazgo original nos ha llevado a purificar adicionalmente el Txln del veneno y luego se encuentra que cada veneno de serpiente contiene dos formas de Txln, que refleja el trabajo de otros trabajadores (Takahashi *et al.*, 1974. Toxicol. 12:193) quienes también reportan dos variantes de un inhibidor plasmina de veneno de víbora de Russell. Los Txln unen a la plasmina menos firmemente que la aprotinina, pero más fuertemente que se ha indicado con el material parcialmente purificado reportado previamente (Wilmott *et al.*, 1995, *supra*).

Los Txln 1 y 2 reducen la pérdida de sangre en un modelo de sangrado de vena de cola de ratón (Tabla 4) tan efectivamente como la aprotinina. Si la reducción en la pérdida de sangre en este modelo se asocia con la neutralización de plasmina en el sitio de la formación de almohadilla haemostática como sugiere (Royston D., 1992, *supra*), no es sorprendente que ellos comparan favorablemente. La incapacidad del Txln para neutralizar el calicreína en contraste con aprotinina (nuestros datos no publicados) puede tener alguna significancia clínica. Esto, por supuesto, depende de la contribución de la ruta del factor XII calicreína en la producción de plasmina en el sitio de cicatrización de heridas (Kluft *et al.*, 1987. Sem. Thromb. Haemost. 13:50). De hecho, el efecto inhibidor de calicreína de aprotinina puede ser un factor que contribuye a un efecto protrombótico o prohemorrágico de este fármaco; la opinión general es que la inhibición de aprotinina de la ruta de coagulación extrínseca por vía del Factor XII calicreína tendería a inhibir la coagulación luego del pasaje de la sangre a través de las máquinas CPB (Westaby S., 1993, *supra*).

Ya que el papel de la molécula Txln juega el desbalance de coagulación humana asociado con esta mordedura de serpiente no es claro ya que el envenenamiento se acompaña por la actividad fibrinolítico dramáticamente incrementada que, a su vez, se relaciona con la coagulación intravascular diseminada en la mordedura individual (Masci *et al.*, 1990. Thromboses Research 59:859; Tibballs *et al.*, 1992. Anesthesia and Intensive Care 20:28). Presumiblemente esta actividad fibrinolítica se estimula por el complejo fibrina mediado por protrombina (Gaffney y Edgel, 1997, *supra*). Ya que la inhibición posterior de fibrinolisis puede contribuir a esta oclusión medida por Fibrina de la microvasculatura es Plausible.

Actualmente es el perfil cinético y la estrecha especificidad de los Txln lo que sugiere fuertemente que puede haber un beneficio clínico sobre la aprotinina para reducir la pérdida de sangre. No existe duda que los datos de modelo de sangrado de ratón indican la reducción de pérdida de sangre comparativa, pero no existen datos fisiológicos que sugieran que el Txln pueda tener menos efectos colaterales perjudiciales que la aprotinina. Sin embargo, todos los ratones tratados con Txln no muestran efectos colaterales. No obstante esta falta de evidencia, del hecho de que el uso terapéutico repetido de aprotinina es contraindicado (Wüthrich *et al.*, 1992 Lancet 340:173) es suficiente para justificar la clonación y expresión de estos nuevos inhibidores hemorrágicos.

Ejemplo 2

*Clonación y secuenciamiento de cADN Textilinina*5 *Materiales y métodos**Materiales*

Se obtienen glándulas de veneno de serpiente marrón común de reptiles considerados desahuciados, que tienen 10 afecciones clínicas, que no se pueden tratar. Las glándulas de veneno se retiran quirúrgicamente, bajo condiciones estériles, inmediatamente después a los animales se les practica eutanasia mediante una dosis lenta de pentobarbitona (60 mg/Kg). El Departamento de Medio Ambiente y Patrimonio así como también el comité de Ética Animal de la Universidad de Queensland aprobó el sacrificio de estos reptiles. Dos glándulas de veneno cortadas (aproximadamente 15 100mg de tejido húmedo) se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -70°C hasta que esté listo para extracción de ARN total.

Cebadores degenerados

20 Masci-3 (codificador) ATGAARGAYAGRCCHGARYTNGAR [SEQ ID NO:27];
 Masci-5 (anticodificador) GTRCTYTCRTGYTCYTCY [SEQ ID NO:28];

25 *Aislamiento de ARN total*

Se aísla ARN total utilizando el equipo de extracción de ARN total Dynal Bead. Se colocan glándulas de veneno congeladas (2) en 1.0 mL de amortiguador de lisis (complementado con el equipo) en un tubo Eppendorf™ y se 30 homogeniza inmediatamente utilizando una sonda Polytron™ estéril ARNasa libre. Se lleva homogenización en hielo en intervalos de 4x 10 segundos. El homogenato se divide en alícuotas de 0.5 mL y se lleva a cabo la extracción de un volumen igual de fenol-cloroformo (1:1). La capa acuosa (superior) se separa por contener ARN y ADN, que se precipita con un volumen igual de isopropanol durante la noche. Después de centrifugación a 13,000 rpm durante 20 35 minutos a 4°C, se lleva a cabo el lavado de 70% de etanol. Se reconstituye el ARN precipitado en agua tratada con DEPC y el contenido de ácido nucleico se determina en alícuota dividida mediante la medición de la absorbancia 260 nm, utilizando la Fórmula:

$$\text{ARN total (mg)} = A_{260} \times [0.04 \text{ mg}/(1 A_{260} \times 1 \text{ mL})] \times \text{factor de dilución} \times \text{volumen (mL)}.$$

40 Se llevan a cabo preparaciones de ARN total posteriores utilizando reactivo TRIzol™ (Life Technologies) como por el manual de instrucciones. En resumen, se homogeniza el tejido de 100 mg (utilizando un homogenizador Polytron™ con la adhesión homogenizante pequeña) en 1 mL de reactivo TRIzol™.

45 Se lleva a cabo análisis de ARN al hacer electrofóresis en una muestra en gel de agarosa formaldehído desnaturalizante/EtBr. El ARN total de mamífero muestra dos bandas brillantes típicas a 4.5 y 19 kb, estas bandas corresponden a 28S y 18S de ARN ribosómico. Las velocidades de intensidad de estas bandas son aproximadamente 2:1.

50 *Aislamiento de mARN*

Se aísla ARN mensajero utilizando Glóbulos Magnéticos Dynal como se recomienda por el proveedor. Después 55 de la dilución de mARN de glóbulos magnéticos, se utiliza 1 mg para la reacción de cadena polimerasa transcriptasa inversa (RT) (PCR) y el restante se precipita en un décimo de volumen de 3 M acetato de sodio pH 5.2/2 volúmenes de etanol absoluto y se almacena a -70°C.

RT-PCR

60 Se lleva a cabo RT-PCR utilizando el equipo Promega RT de transcriptasa inversa MMLV y el ARN total aislado (1 mg) y mARN como plantilla a 42°C durante 1.5 horas. El cADN resultante se utiliza para la segunda síntesis de hebra. Si la segunda síntesis de hebra se lleva a cabo utilizando polimerasa T4 de ADN, primero la hebra de cADN como la plantilla. La reacción se lleva a cabo a 14°C durante 3 horas. El volumen final de la segunda reacción de síntesis es 100 65 mL. Se lleva a cabo la extracción de fenol-cloroformo y la capa acuosa (superior, que contiene cADN de doble hebra) se transfiere en un Eppendorf limpio y el cADN se precipita con etanol durante la noche. Después de centrifugación a 13,000 rpm durante 20 minutos a 4°C el precipitado se lava con 70% de etanol y se reconstituye en 10 mL de agua estéril y se almacena congelado a -20°C hasta que se utiliza en amplificación PCR Txln cADN utilizando cebadores degenerados para Txln 1 y 2.

ES 2 332 249 T3

Amplificación por PCR de CADN Txln

Los cebadores de oligonucleótido degenerados codificante y anticodificante Masci-3/Masci-5 se diseñan de la secuencia de aminoácido de Txln1. Se aísla ADN genómico del tejido de hígado de la serpiente marrón y también se 5 utiliza como plantilla en PCR utilizando cebadores degenerados para determinar la existencia de cualesquier secuencias intrón en cADN de Txln.

Utilizando parámetros de amplificación que consiste de 94°C/1 minuto; 46°C durante 1 minuto; 72°C durante 1 minuto para 35 ciclos, un producto PCR de 177 pares base se obtiene que corresponde a un polinucleótido que codifica 10 un esperado de 59 aminoácidos. De forma similar, un producto de 177 pares base se obtiene utilizando ADN genómico. El producto PCR de 177 pares base se liga en p-GEM 5zf y pGEX-2T, respectivamente. Se utilizan plásmidos recombinantes resultantes como plantillas para análisis de secuencia de nucleótido automatizada. Las secuencias de nucleótido respectivas que codifican los polipéptidos maduros relacionados con Txln 1 y Txln 2 se muestran en las 15 Figs 6 y 7.

15

Preparación del vector pGEM-2T

Se divide pGEM-2T (Pharmacia-Biotech, aproximadamente 5 pmol) con BamHI y EcoRI. Se fraccionan los 20 productos de digestión mediante electrofóresis de gel TAE-agarosa y se purifica el vector linearizado utilizando un equipo de extracción de ADN QIAquick™ (QIAGEN) seguido por precipitación de etanol.

25

Ligación

25

Se agregan el vector pGEM-2T o pGEX (0.3 pmol), y 1.5 pmol del producto PCR 177 de pares base a una mezcla de ligación que contiene 2 unidades de T4 ADNligasa en un: volumen total de 30 mL. Se lleva a cabo ligación durante la noche se incuba a 14°C.

30

Transformación

35

Se desarrolla electroporación de la cepa *E. coli* DH5• como el anfitrión utilizando un tercio de la mezcla de ligación (condiciones estándar). Un total de no menos de 10 colonias “blancas” se seleccionan para cada construcción en placas LB de estándar indicador que contiene 0.1 mg ampicilina/mL. Se identifican seis isómeros de cADN con cebadores diseñados específicos y se presentan sus secuencias.

40

Se lleva a cabo clonación utilizando el vector pGEM-T linearizado que tiene una timidita de terminal 3' que se extiende entre cada extremo de la molécula linearizada (Promega Corporation; Cat No. A3600, Parte No.A360A, Lote No. 96814). El producto PCR de Txln purificado (preparado utilizando el sistema de enzima polimerada de Etiqueta Advantage2 (Clontech)) se liga en estos extremos utilizando ligasa de ADN T4 (Promega Corporation). Luego se electropora cADN Txln que contiene plásmido *E. coli* DH5•, y se seleccionan transformantes adecuados utilizando criterios de selección azul/blanco convencionales. Por lo menos 10 colonias positivas se identifican como que contiene el producto PCR de cADN Txln (177 pares base o longitud completa). El secuenciamiento del inserto de cADN Txln 45 se lleva a cabo utilizando la matriz de terminador de tinte (Clontech; Cat No. 403045) y se omite para secuenciamento utilizando el secuenciador ABI Prism™ Modelo 377.

50

Expresión

Por lo menos diez colonias con buenas secuencias consenso se seleccionan y se hacen crecer en medio 2YT en la presencia de 100 mg/mL de ampicilina y 0.1 M IPTG para inducir la expresión. La detección directa de las proteínas de fusión se desarrolla con 12% SDS-PAGE de acuerdo con Laemmli, UK, (1970, Nature 277: 680).

55

Se purifican proteínas de fusión Txln-GST utilizando cromatografía de afinidad glutationa-Sefarosa™ 4B (Amersham- Pharmacia Biotech; Cat No. 17-0756-01). Se lava el gel de glutationa-Sefarosa™ 4B en PBS 4 veces para asegurar que todos los inhibidores de trombina se remuevan antes de incubación con las proteínas de fusión Txln-GST. Se dividen Txln recombinantes de la proteína de fusión Txln-GST unidos a glutationa-Sefarosa™ al incubar con trombina (5U/mg de la proteína de fusión) (Pharmacia-Biotech). Durante 1 mL de gel de empaque que contiene proteínas de fusión Txln-GST del cultivo de 1 litro, se agregan 50 unidades de trombina y se incuba durante 21 horas a temperatura ambiente. Se remueven las muestras de sobrenadante a 2, 7 y 21 horas y se examinan por SDS-PAGE para rec Txln.

65

Redoblamiento de Txln recombinante

Para maximizar la eficacia del redoblamiento de Txln recombinante, una combinación de procedimientos se investiga cómo se describe por ejemplo por Bieri *et al.* (1995, Biochemistry, 34:13059-13065), que se incorpora aquí

ES 2 332 249 T3

como referencia, y Norres Et al, (1994. Análogos aprotinina y un proceso para la producción de los mismos, Patente Estadounidense 5,373,090 de Novo Nordisk).

En resumen, el Txln recombinante en 20 mM de NH₄HCO₃, pH 8.3, con 2M de clorhidrato guanidina agregado se reduce con 45 mM de DTT durante 15 min 50°C. El Txln reducido y no doblado luego se diluye rápidamente mediante 5 100 veces (la concentración de sal final es menos de 0.05M) al agregar a 20 mM de amortiguador de bicarbonato de amonio, pH 8.3 y se deja reposar durante 18 horas. La concentración y purificación del Txln recombinante activo (1-10 mg), se lleva a cabo al aplicar la solución Txln diluida para la columna de intercambio de ión DEAE-Sefarosa™ (1.0 x 10 cm) como se describe por Txln nativo. Se ensaya el Txln recombinante activo mediante la inhibición de 10 plasmina (0.1 U), utilizando el ensayo cromogénico S-2251 (3.0 mM). La eficacia clínica de Txln recombinantes se investiga en modelo de mezcla de vena de cola de ratón.

Resultados

15 Secuencia de cADN de Textilinina 1 obtenida utilizando cebadores degenerados (Masci-3/Masci-5)

Se diseñan cebadores (Masci-3/Masci-5) con base en el codón de redundancia para los aminoácidos y se selecciona 20 las regiones específicas de terminal N y terminal C para las secuencias Txln 1 y Txln 2 (descrito adelante). Aquellas 25 se utilizan para amplificar el cADN producido de ARN total aislado de la glándula de veneno de serpiente marrón. Los productos PCR se clonian en pGEM- 5zf(+) utilizando clonación de extremo romo. Los clones positivos (blancos) se sustancian adicionalmente por contener el inserto mediante detección PCR, utilizando Masci-3/Masci-5 como cebadores y el ADN de plásmido, se preparan mediante el procedimiento mini-prep, como la plantilla. El análisis de secuencia de ADN utilizando un equipo terminador de Tinte ABI produce dos secuencias separadas para Txln 1 y Txln 2 (Figs. 6 y 7). Por lo menos se emplean 10 clones separados para obtener estas secuencias.

Diseño de cebadores específicos de gen para determinar las regiones no trasladadas 5' y 3' (UTR) de CADN Txln.

30 Un nuevo conjunto de cebadores (F1 y R1; Txln2R1) se diseña con dos cambios de nucleótido para incrementar el contenido de G-C y así la alineación del cebador para ADN. Los dos cambios son en el codón 6; TTT se cambia a TTC (manteniendo el código para F) y en el codón 5; GAT se cambia a GAC (de nuevo, manteniendo el mismo aminoácido, D). Un nuevo cebador delantero, F1 se diseña por tener la secuencia adelante.

F1:Txln 1 Cebador delantero de Gen Específico

35

ATATATGGATCCAAGGGACCGGCCTGACTTC [SEQ ID NO:29]

BamHI

40 En el caso del cebador inverso, R1, el codón AGT (que codifica el aminoácido 59) se cambia a TCA, conservando el aminoácido, Serina (S) y de nuevo, incrementando el contenido de GC del cebador R1. El codón GG(N) (que codifica el aminoácido 58) se cambia a un C para optimizar la unión del cebador a ADN. Un cebador inverso correspondiente 45 específico para Txln 2, R2, también se emplea. Las secuencias de cebador se listan adelante:

R1: Txln 1 Cebador Inverso Específico de Gen

50 **AACGGGAATTCTCAGAGCCACACGTGCTTTC [SEQ ID NO:30]**

EcoRI parada

55 R2: Txln 2 Cebador Inverso Específico de Gen

AACGGGAATTCTCATGAGCCACAGGTAGACTC [SEQ ID NO:31]

60 *EcoRI* parada

(Txln 2 el cebador inverso específico de gen da un producto PRC positivo, aunque este no se utiliza).

65 Se separan los productos de amplificación mediante electrofóresis de gel de agarosa y un amplicón de 177 bp se purifica utilizando el equipo de purificación de PCR QIAquick™ (QIAGEN). Se liga el producto PCR Txln-cADN purificado de 1-2 mg en el vector pGEM-2T y el secuenciamiento se lleva a cabo utilizando un equipo terminador de

ES 2 332 249 T3

tinte (Perkin-Elmer Corporation note, Agosto 1995). La secuencia de nucleótido de cADN Txln los posibilita diseñar un segundo conjunto de cebadores específicos de gen Txln 1 para determinar las secuencias 5' y 3' del gen (3' y 5' de metodología RACE). Aquellas secuencias cebadoras se dan adelante y se han diseñado cebadores específicos de gen (TX1FN y TX1RN) para distinguirlos del conjunto inicial.

5 Amplificación de cADN SMART™ RACE 5' y 3'- (Clonetech).

Se hace una preparación fresca de cADN para cada reacción RACE 5'- y 3'. El equipo SMART™ RACE incluye un protocolo para la síntesis de dos poblaciones de cADN separadas: 5'-RACE Ready cDNA y 3'-RACE Ready de cDNA. El cADN para 5'-RACE se sintetiza utilizando un cebador oligo para modificar el bloqueo de acoplamiento (dT) y el oligo SMART™ II. El cebador oligo modificado (dT), llamado cebador de cADN síntesis 5'-RACE (5'-CD's), tiene dos posiciones oligo degeneradas en el extremo 3'. Este cebador de posición de nucleótidos está al inicio de la cola poli A+ y así elimina la heterogeneidad 3' inherente con el cebado oligo convencional (dT) (Borsen *et al.*, 1994, PCR Methods Applic. 2:144-148).

15 El cADN RACE 3' se sintetiza utilizando el procedimiento de transcripción inversa convencional, pero con un
cebador oligo especial (dT). Esta síntesis del cebador cADN RACE 3'- (3'-CD's) incluye las posiciones de nucleótido
del bloqueo de acoplamiento como en el cebador 5'-CD's y también tiene una porción de la secuencia SMART™
en su extremo 5'. Al incorporar la secuencia SMART™ en las poblaciones de cADN RACE-Ready™ 5' y 3'-, una
20 puede cebar las reacciones PCR RACE utilizando la Mezcla de Cebador Universal (UPM), que reconoce la secuencia
SMART™, en conjunto con distintos cebadores específicos de gen Txln. El conjunto de cebador utilizado para RACE
es como sigue:

25 Mezcla de Cebador Universal:

Cebador universal largo (0.2 mm),

CTAATACGACTCACTATAAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCCAGAGT [SEQ ID NO:32];

30 Cebador universal corto (1 mM),
CTAATACGGACTCACTATAGGGC [SEQ ID NO:33];

Cebador universal amoldado (NUT, 10 mm),

AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT [SEQ ID NO:34].

La Figura 8 muestra los patrones de morbilidad electroforéticos de gel de agarosa de los productos PCR obtenidos con cebadores específicos de gen Txln. Los productos PCR (5'- y 3'-RACE) se electroforizan, se cortan y se purifican en gel utilizando el equipo de extracción de gel QIAquick™ (QIAGEN).

Table I. The effect of the concentration of the polymer on the viscosity of the polymer solution.

De las secuencias 5' y 3' RACE, se diseñan los cebadores delantero específicos de gen Txln (TX1FN) e inverso (TX1RN), que contienen un sitio de restricción aBamHI en TX1FN (primero 12 nucleótidos) y un sitio EcoRI en TX1RN(12 nucleótidos).

Las secuencias para estos cebadores se listan adelante:

55 TX1EN

ATCAGCGGATCCATGTCTGGAGGT [SEQ ID NO:35];

60 TX1RN

TCTCCTGAATTCTAGGCAGCACAGGT [SEQ ID NO:36]

Se lleva a cabo PCR utilizando cADN como una plantilla y polimerasa de Etiqueta Advantage2™ con las siguientes condiciones: 92°C/1 min; 50°C/1min; 72°C/1 min durante 30 ciclos. Estos cebadores amplifican un producto que corresponde a una secuencia que codifica la proforma Txln1 (83 aminoácidos).

ES 2 332 249 T3

Clonación de la proforma Txln 1

Todos los tres productos PCR se purifican del gel y se clonian en pGEM-2T para secuenciamiento de ADN utilizando cebadores específicos pGEM adyacentes al inserto. El nucleótido y las secuencias de aminoácido deducidas 5 destacadas en la Figura 9 [SEQ ID NO: 43 y 44, respectivamente] se derivan mediante secuenciamiento de los productos RACE3' y 5'. Esto permite la identificación de 72 nucleótidos extra en la dirección 5' del AAG (K) en la estructura, lo que sugiere la presencia de una proforma de Txln1 existente. Unos 24 aminoácidos extra existen inmediatamente 10 en la dirección 5' de los 59 aminoácidos codificantes. También se identifican once (11) nucleótidos de 5' UTR así como también 143 nucleótidos de 3' UTR. En adición el secuenciamiento 3' RACE revela que los dos aminoácidos inmediatamente en la dirección 5' del codón de parada no son alaninas, no son glicina ni serina cuando se deriva del secuenciamiento exacto menos original. Sin embargo, las secuencias adicionales de Txln 1 y Txln 2 se obtienen mediante secuenciamiento de múltiples clones. Después de secuenciamiento extensivo, llega a ser evidente que existen seis genes Txln separados.

15

Clonación para la región codificante de Txln1

De forma similar, se diseñan cebadores específicos de gen Txln para obtener un producto PCR, que codifica el péptido activo (59 aminoácidos). De nuevo, en este caso, un sitio BamHI se incorpora en el cebador delantero (TX1TF) 20 y cebador inverso que es el cebador universal Listo RACE (Long SMARTTM).

Cebadores de secuencia de péptido activo Txln:

25 TX1TF (delantero),

ATTATAGGATCCAAAGGACCGTCCGGAT [SEQ ID NO:37];

30 Cebador universal Largo Listo RACE

CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT [SEQ ID NO:32].

Clonación de genes Txln adicionales

Los cebadores delanteros también se diseñan para Txln 2-6 (delantero), y en combinación con el cebador universal largo (LUP, Equipo Listo Clontech RACE), utilizando las condiciones PCR como se describió anteriormente. Las 40 secuencias para estos cebadores son como sigue:

Cebador delantero para Txln 2 (TX2T)

ATTATAGGATCCAAAGGACCGTCCAGAG [SEQ ID NO:38];

45

Cebador delantero para Txln 3 (TX3T)

AACGTCGGATCCAAAGGACCGTCCAAAT [SEQ ID NO:30];

50

Cebador delantero para Txln 4 (TX4T)

AACGTCGGATCCAAAGGACCATCCAAAA [SEQ ID NO:40];

55

Cebador delantero para Txln 5 (TX5T)

AACGTCGGATTCAAAGGACCGTCCAAAA [SEQ ID NO:41]; y

60

Cebador delantero para Txln 6 (TX6T)

ATTGTCGGATCCAAAGGACCTGCCAAAG [SEQ ID NO:42].

65

ES 2 332 249 T3

En todos los casos, el cebador delantero tiene un sitio BamHI insertado para facilitar la clonación. La secuencia subrayada marca la tripleta de inicio para la secuencia codificante.

- Los productos de amplificación obtenidos utilizando los cebadores anteriores se fraccionan mediante electrofóresis de gel de agarosa y los fragmentos de ADN con el tamaño apropiado se purifican, y se clonian en el vector pGEM-2T. El secuenciamiento de plásmidos recombinantes se desarrolla utilizando una matriz de terminador de tinte Clontech y un secuenciador ABI Prism™ Modelo 377. Las secuencias de nucleótido obtenidas por este procedimiento para Txln 1-6 se presentan en la Figura 10 junto con las secuencias de aminoácido deducidas correspondiente. Como será evidente de la inspección de la Figura 11, las secuencias de aminoácido Txln son altamente homólogas y en este respecto, se proporciona una secuencia consenso.

Reclonación del producto PCR purificado con gel de cADN Txln en los vectores de expresión pGEX-2 T

- Se expresa Txln recombinante (péptido de 59 aminoácidos y molécula de 83 aminoácidos que contienen el propéptido de 24 aminoácidos) utilizando las construcciones pGEX-2T. La actividad de Txln recombinante se ensaya al utilizar el sustrato cromogénico S-2251 y la plasmina de enzima (Friberger *et al.*, 1978). Se hace SDS-PAGE y Western blot utilizando anticuerpos polivalentes para Txln identificado con Txln recombinante (Figura 12).

20 Ejemplo 3

Producción de un anticuerpo monoclonal específico de fibrina -conjugado textilinina 1

- Un anticuerpo monoclonal específico de fibrina, MAb 12B3.B10 (IgG2A/kappa) (Tymkewycz *et al.*, 1993, *supra*), será conjugado químicamente con el inhibidor de plasmina Txln 1 mediante un procedimiento de reticulación de longitud cero de dos etapas de acuerdo con Grabarek y Gergely (1990, *Anal. Biochem.* 185:131-135). En resumen el Txln 1 se incubará con una carbodiimida soluble en agua (EDC) en la presencia de N-Hidroxisuccinimida (sulfo-NHS), y resultará en la conversión de los grupos carboxilo de Glu o Asp en ésteres succinimidilo. Después de remover el exceso de EDC mediante filtración de gel MAb 12B3.B10 se agregará al Txln 1 activado. La reticulación resultará de la sustitución nucleófila de los grupos lisina-amino del IgG para los grupos funcionales succinimidilo durante una incubación de 2h. El conjugado IgG-Txln 1 luego se purificará de Txln 1 libre por vía de HPLC de tamaño de exclusión en una columna Superdex 200 HR 10/30 como se describe por Raut y Gaffney (1996, *Fibrinolysis* 10 (Suppl. 4):1-26, Abstract No 39). La construcción purificada luego se probará para la actividad inhibidora de plasmina por ELISA utilizando el sustrato cromogénico S-2251.

A través de esta especificación el objetivo ha sido describir las realizaciones preferidas de la invención sin limitar la invención en una realización cualquiera o recolección específica de características. Aquellos expertos en la técnica por lo tanto apreciarán que, en claridad de la presente descripción, se pueden hacer varia modificaciones y cambios en las realizaciones particulares ejemplificadas sin apartarse del alcance de la presente invención. Tales modificaciones y cambios están destinados a ser incluidos dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Títulos de las tablas

- 45 Tabla 1. Sustituciones de aminoácido conservadoras
- Tabla 2. Aminoácidos no convencionales para la generación de péptidos modificados.
- 50 Tabla 3. Resumen de constantes inhibidoras. Ki para medición de Txln S-100 Pool utilizando el Programa de análisis Enzfitter, utilizando la concentración de plasmina 0.5 nM, es 0.15 mM (*n* = 6). *Los datos obtenidos se denotan del trabajo previo (Willmott *et al.*, 1995, *supra*) cuando se utiliza la concentración de plasmina para determinar Ki para aprotinina es 0.5 nM.
- 55 Tabla 4. Modelo de sangrado de cola de ratón - determinación de la pérdida de sangre. Se muestra la pérdida de sangre en los ratones tratados con aprotinina y las dos formas de Txln (1 y 2) comparado con un grupo de control de solución salina, aunque también se da la reducción del porcentaje en la pérdida de sangre.

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una preparación sustancialmente pura de un inhibidor de plasmina **caracterizado** porque este es un inhibidor competitivo de única etapa de plasmina y comprende la secuencia de aminoácido ECESTCAA, en donde el inhibidor de plasmina tiene la fórmula general:

10 **KDZPZYCZLBBZBGXCZXXBXRVRIIFSEAYXBZZZCBZFBYGGCXBRANNFXTX
BBCBFTCAA,**

en donde:

15 X es cualquier aminoácido;

19 Ÿ es un aminoácido hidrófobo;

20 Ā es un aminoácido aromático o histidina;

24 Z es K, R, H, D, E, Q o N; y

25 B es un aminoácido neutro, o P, A, G, S, T, V o L, y
en donde X en la posición 19 es R.

2. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la Z en la posición 3 es H o R.

3. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la Z en la posición 5 es K, N, E o D.

4. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la Ÿ en la posición 6 es F o L.

5. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la Z en la posición 8 es E o K.

35 6. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la B en la posición 10 es P o L.

7. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la B en la posición 11 es P o A.

40 8. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la Z en la posición 12 es E o D.

9. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la B en la posición 13 es T o I.

45 10. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la X en la posición 15 es P, S o R.

11. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la Z en la posición 17 es K, N, E, D o R.

50 12. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la X en la posición 18 es D, G, A o V.

13. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la X en la posición 20 es T, P, F o I.

55 14. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la B en la posición 21 es G, V o P.

15. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la X en la posición 22 es A, S o R.

60 16. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la Ā en la posición 24 es Y o H.

17. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la X en la posición 26 es S o N.

18. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la B en la posición 27 es P, A o T.

19. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la Z en la posición 28 puede ser D o R.

65 20. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la Z en la posición 29 es E, D, H o Q.

21. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la Z en la posición 30 es H, K, R o Q.

22. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la Z en la posición 31 es K, Q o E.

ES 2 332 249 T3

23. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la B en la posición 33 es L o I.
24. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la Z en la posición 34 es E o K.
- 5 25. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la B en la posición 36 es L o I.
26. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la X en la posición 41 es E, G o K.
- 10 27. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la B en la posición 42 es C o G.
28. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la X en la posición 48 es K, N o I.
- 15 29. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, en donde la X en la posición 50 es K, Q o I.
30. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la secuencia de aminoácido NANNF.
- 20 31. El inhibidor de plasmina de las reivindicaciones 1 o 30, que comprende adicionalmente la secuencia de aminoácido YGGC.
- 25 32. El inhibidor de plasmina de las reivindicaciones 30 o 31 que comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de:
- (a) SEQ ID NO:2
- (b) SEQ ID NO:4
- 30 33. un fragmento biológicamente activo de una cualquiera de la SEQ ID NO:2 o 4, que comprende por lo menos 15 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:2 o 4 y que retiene la inhibición competitiva de única etapa de plasmina; y
- (d) un polipéptido que tiene por lo menos 90% de identidad para la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2, o 4, y que retiene la inhibición competitiva de única etapa de plasmina.
- 35 33. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 32, en donde el polipéptido comprende por lo menos 15 aminoácidos contiguos que retienen la inhibición competitiva de única etapa de plasmina y un péptido líder que comprende la secuencia SEQ ID NO: 14, o un fragmento biológicamente activo del mismo.
- 40 34. El inhibidor de plasmina de la reivindicación 33, en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:18.
35. El inhibidor de plasmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34 **caracterizado** adicionalmente porque este tiene una constante de disociación para plasmina en el rango de $1 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ a $1 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$.
- 45 36. El inhibidor de plasmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34 **caracterizado** adicionalmente porque este tiene una constante de disociación para plasmina en el rango de $5 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ a $8 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$.
37. El inhibidor de plasmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34 **caracterizado** adicionalmente porque este tiene una constante de disociación para plasmina en el rango de $1 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ a $5 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$.
- 50 38. El inhibidor de plasmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34 **caracterizado** adicionalmente porque este tiene una constante de velocidad de disociación para plasmina en el rango de $4 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a $5 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$.
- 55 39. El inhibidor de plasmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34 **caracterizado** adicionalmente porque este tiene una constante de velocidad de disociación para plasmina en el rango de $1 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a $1 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$.
- 60 40. El inhibidor de plasmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34 **caracterizado** adicionalmente porque este tiene una constante de velocidad de disociación para plasmina en el rango de $2 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a $9 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$.
41. El inhibidor de plasmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40 en donde por lo menos 60% del material total en la preparación es el inhibidor de plasmina.
- 65 42. El inhibidor de plasmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40 en donde por lo menos 75% del material total en la preparación es el inhibidor de plasmina.

ES 2 332 249 T3

43. El inhibidor de plasmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40 en donde por lo menos 90% del material total en la preparación es el inhibidor de plasmina.
- 5 44. El inhibidor de plasmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40 en donde por lo menos 95% del material total en la preparación es el inhibidor de plasmina.
- 10 45. Un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34.
- 15 46. El polinucleótido aislado de la reivindicación 45 seleccionado del grupo que consiste de:
- (a) SEQ ID NO:1;
- (b) SEQ ID NO:3; y
- (c) un polinucléotido que hibrida bajo condiciones exigentes a cualquiera de las secuencias de polinucleótido anteriores y que codifica un polipéptido que retiene la inhibición competitiva de única etapa de plasmina.
- 20 47. El polinucleótido de la reivindicación 46 que comprende adicionalmente una secuencia de nucleótido que codifica un péptido líder.
- 25 48. El polinucleótido de la reivindicación 47, en donde la secuencia de nucleótido comprende la secuencia SEQ ID NO:13 o un polinucléotido que hibrida bajo condiciones exigentes a la secuencia anterior y que codifica un polipéptido que retiene la inhibición competitiva de única etapa de plasmina.
- 30 49. El polinucleótido de la reivindicación 47, en donde dicho polinucleótido se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:43.
- 35 50. Una composición farmacéutica para aliviar la pérdida de sangre en un paciente, dicha composición comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34 y un portador farmacéuticamente aceptable.
51. Uso del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, formulado opcionalmente con un portador farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento para aliviar la pérdida de sangre.
52. Un agente antineoplásico que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34 conjugado con un anticuerpo antifibrina.

40

45

50

55

60

65

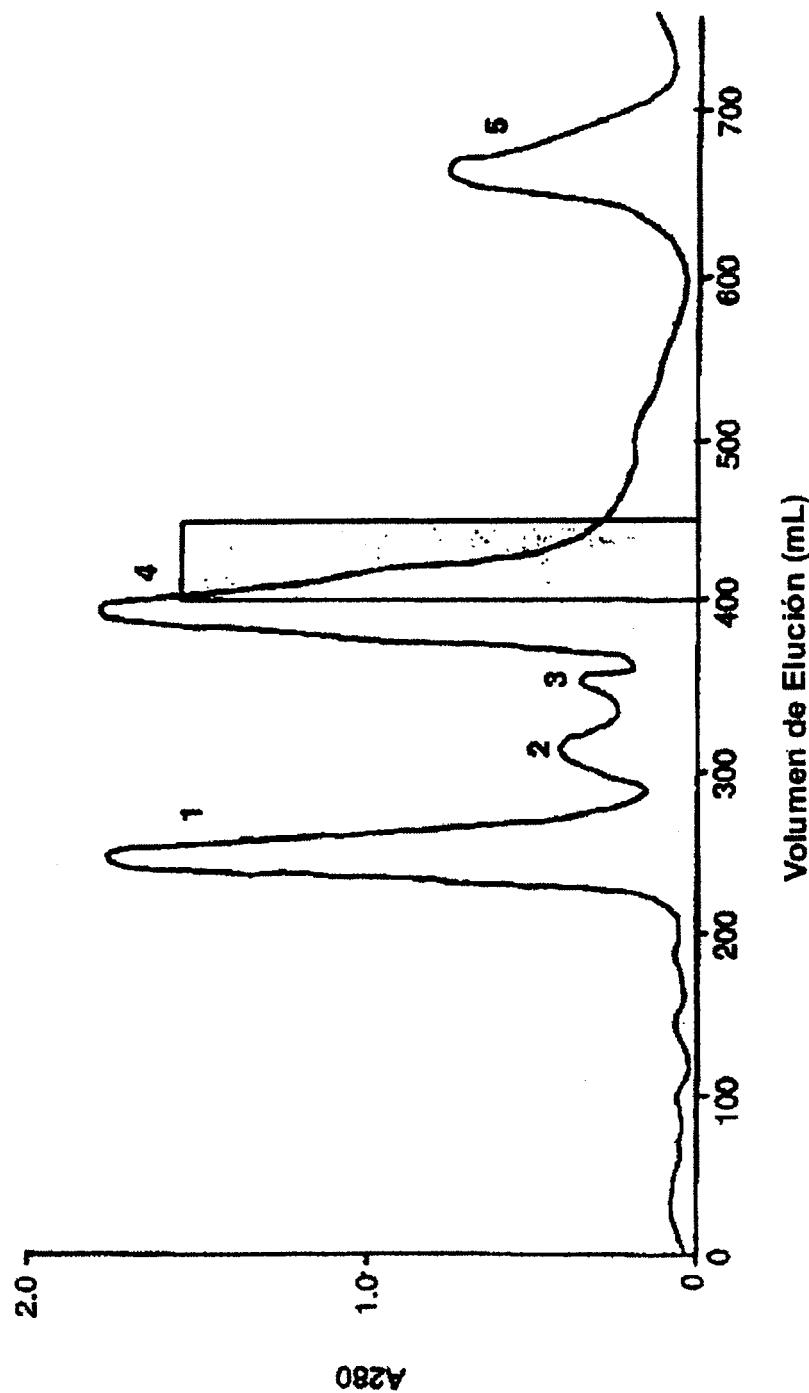


FIG. 1

ES 2 332 249 T3

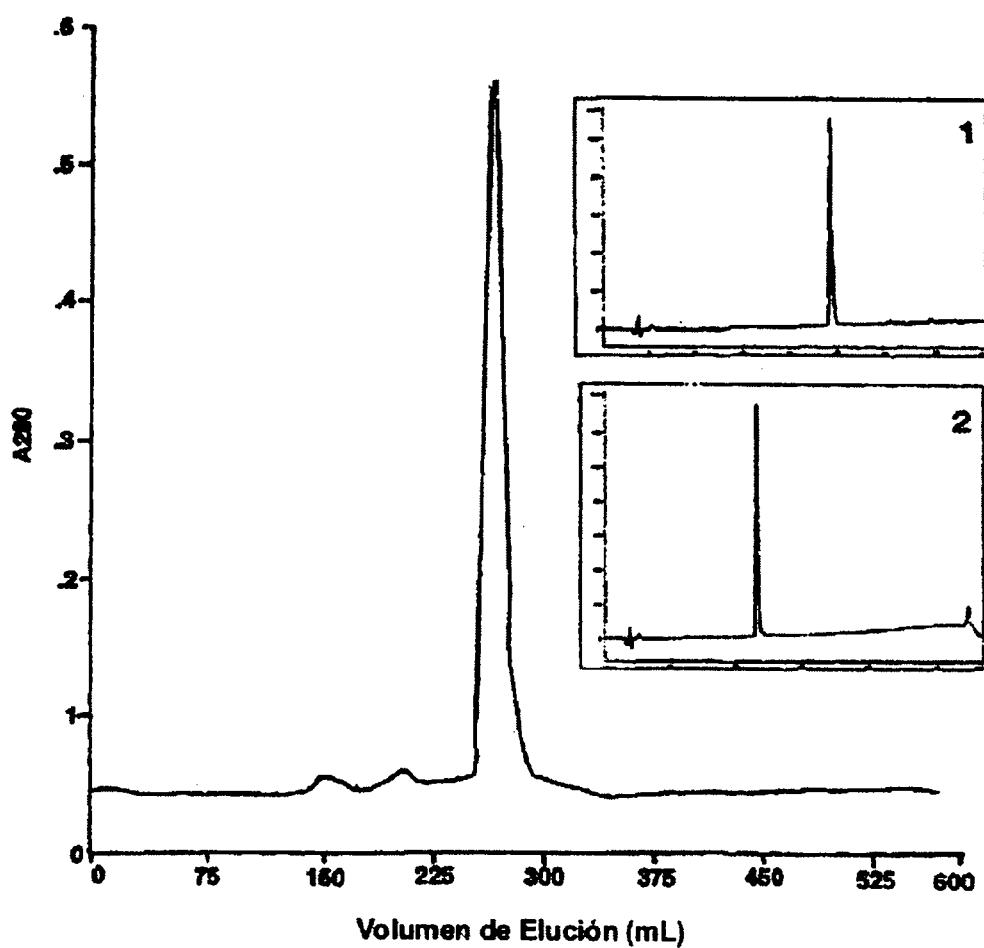
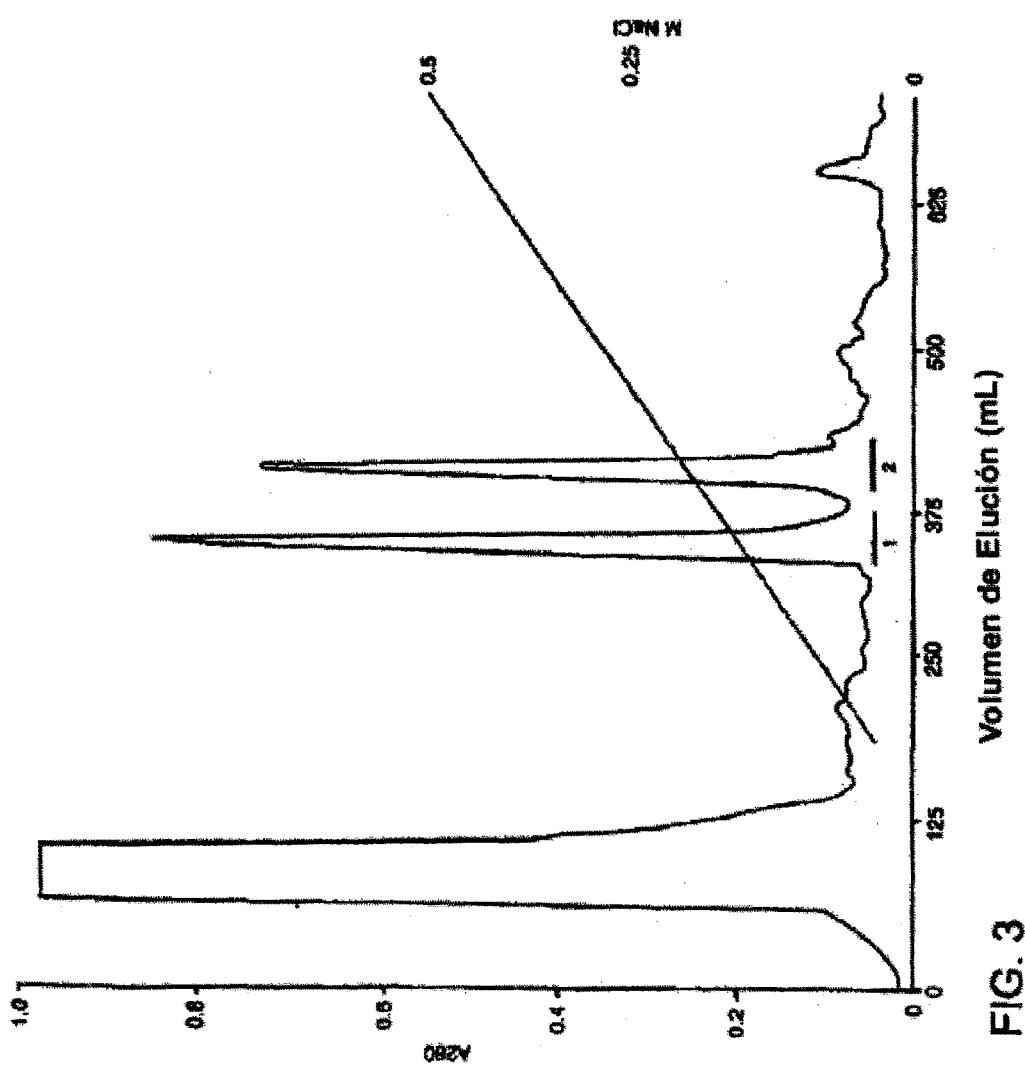


FIG. 2

ES 2 332 249 T3



ES 2 332 249 T3

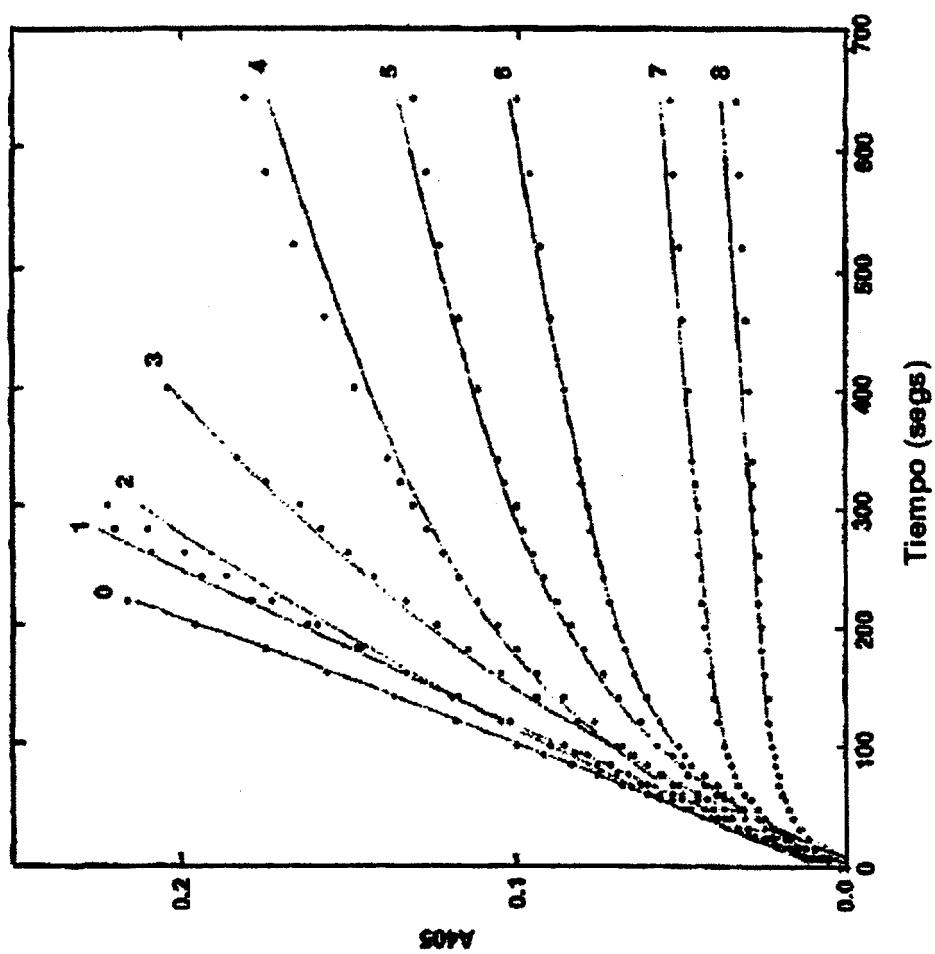


FIG. 4

10	20	30	40	50	59
KDRPDE <u>CELP</u>	ADTG <u>PCRVRF</u>	PSFYNNP <u>DZK</u>	KCL2FIYGG <u>C</u>	EGNANNF <u>ITK</u>	EECE <u>STCGS</u>
KDRPE <u>LELP</u>	PDTG <u>PCRVRF</u>	PSFYNNP <u>DEQ</u>	K <u>CLEFIYGGC</u>	EENANAF <u>ITK</u>	EE <u>CESTCGG</u>
KDRPK <u>FECHLP</u>	PKPG <u>PCRAAI</u>	PRFYNN <u>PKSK</u>	Q <u>CEKFIYGGC</u>	HGNANK <u>FKTP</u>	DECNYT <u>CLGVSL</u>
R <u>PDFC</u> LEP	PYTG <u>PCKARI</u>	TRYFYN <u>AKAG</u>	L <u>QQTFTVYGGC</u>	RAKRNN <u>FKSA</u>	EDQMRT <u>CGGA</u>

APRO

FIG. 5

ATG AAG GAC CGG CCT GAT TTT TGT GAA CTG CCT GCT GAC ACC GGA CCA TGT
M K D R P D F C E L P A D T G P C

AGA GTC AGA TTC CCA TCC TTG TAC AAC CCA GAT GAA AAA AAA TGC CTC
R V R F P S F Y Y N P D E K K C L

GAG TTT ATT TAT GGT GGA TGC GAA GGG ATT GCT AAG GAT TTT ATG ACC AAA
E F I Y G C C E G N A N F I T K

GAG GAG TGT GAA AGC ACG TGT GG(N) AGT
E E C E S T C G S

FIG. 6

ATG AAG GAC CGG CCT GAG TTG TGT GAA CTG CCT CCT GAC ACC GGA CCA TGT
M K D R P E L C E I P P D T G P C
AGA GTC AGA TTC CCA TCC TTG TAC AAC CCA GAT GAA CAA AAA TGC CTC
R V R F P S F Y Y N P D E Q K C L
GAG TTT ATT TAT GGT GGA TGC GAA GAG AAT GAT AAC GCT TTT ATG ACC AAA
E F I Y G G C E E N A N A F I T K
GAG GAG TGT GAA AGC ACG TGT CC(N) GGT
E E C E S T C G G

FIG. 7

ES 2 332 249 T3

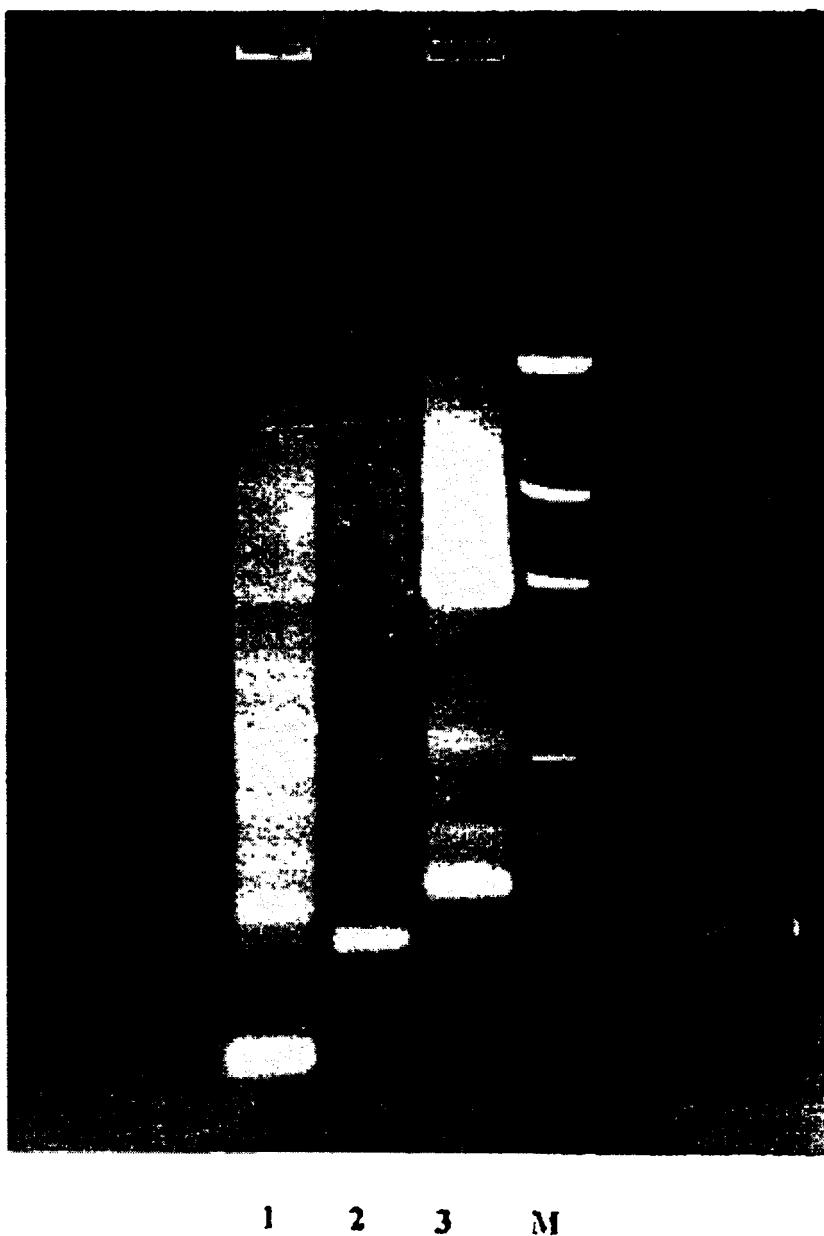


FIG. 8

ggagcttcatCATGTCTGGAGGTCTTCTCCTGCTGGACTCCTCACCCCTCTGGAGGTG
CTGACCCCCCGTCTCCAGCAAGGAACCGTCCAGAGTTGTGTGAACCTGCCTCCTGACACCGACCCATGTAGAAGTC
AGATCCCCATCCTTCTACTACACCCAGATGAAACAATAAGCTTAGAGTTTATTATGGTGGATGCCAAGGG
ATGCTAACCAATTATCACCAAAGAGGAATGCGAAAGCACCCTGTGCCTGCCTGAatgaggagaaccctccctg
attggatcgacagtccaaacttgacccaaagaccctgtccctgaccacccctggacaccacccttcccc
caaaccaccctggacttaattccctttctctqcaataaaagcttttgttccagct

FIG. 9

ES 2 332 249 T3

Tdin 1

MSSGGLLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPDFCELPADTGPCRVR
FPSFYYPDKEKKCLEPFIYGGCEGNANNFTIKEECESTCAA

Tdin 1

ATGTCTTCTGGAGGTCTTCTTCTGCTGGACTCCTCACC
CTCTGGGAGGTGCTGACCCCCGTCTCCAGCAAGGACCCTCCGGATTCTG
TGAAC TGCTGCTGACACCGGACCATGTAGAGTCAGATTCCCATCCTCT
ACTACAACCCAGATGAAAAAAAGTGCCTAGAGTTATTTATGGTGGATG
CGAAGGGAATGCTAACAAATTATCACCAAAAGAGGAATGCGAAAGCACC
TGTGCTGCCTGA

Tdin 2

MSSGGLLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPELCELPDTGPCRVR
FPSFYYPDQEKKCLEPFIYGGCEGNANNFTIKEECESTCAA

Tdin 2

ATGTCTTCTGGAGGTCTTCTTCTGCTGGACTCCTCACC
CTCTGGGAGGTGCTGACCCCCGTCTCCAGCAAGGACCCTCCAGAGTTGTG
TGAAC TGCTGCTGACACCGGACCATGTAGAGTCAGATTCCCATCCTCT
ACTACAACCCAGATGAAACAAAATGCCTAGAGTTATTTATGGTGGATG
CGAAGGGAATGCTAACAAATTATCACCAAAAGAGGAATGCGAAAGCACC
TGTGCTGCCTGA

FIG. 10

Txin 3

MSSGGLLLLLGLLTWEVLTIPVSSKDRPNPCKLPAETGRCNAK
IPRFYYNPRQHQCLIEFLYGGCGGNANNFKTIKECESTCAA

Txin 3

ATGTCTTCTGGAGGTCTTCTTCTCCTGCTGGACTCCTCACC
CTCTGGGAGGTGCTGACCCCCGTCTCCAGCAAGGACCGTCCAAAATTCTG
TAAACTGCCTGCTGAAACCOGGACGATGTAATGCCAAATCCCACGCTTCT
ACTACAACCCACGTCAACATCAATGCATAGAGTTCTCTATGGTGGATG
GGAGGGAATGCTAACAAATTAAAGACCATAAGGAATGCGAAAGCACCT
GTGCTGCATGA

Txin 4

MSSGGLLLLLGLLTWEVLTIPVSSKDHPKFCELPADTGSKGN
PVRFYYNADHHQCLKFIYGGCGGNANNFKTIECKSTCAA

Tx-4 n

ATGTCTTCTGGAGGTCTTCTTCTCCTGCTGGACTCCTCACC
CTCTGGGAGGTGCTGACCCCCGTCTCCAGCAAGGACCATCCAAAATTCTG
TGAACCTCCCTGCTGAAACCOGGATCATGTAAGGCAACGTCCACGCTTCT
ACTACAACGCAGATCATCATCAATGCCTAAAATTATTTATGGTGGATG
GGAGGGAATGCTAACAAATTAAAGACCATAAGAGGAAGGCAAAAGCACCT
GTGCTGCCTGA

FIG. 10 Continúa.

Tdin 5

MSSGGLLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPKFCLELPDTGSCEDP
TGAPHYSTRDRECIEFTYGGCGCNANNFNTKEECESTCAA

Tdin 5

ATGTCTTCTGGAGGTCTTCTTCTCCTGCTGGACTCCTCACC
CTCTGGAGGTGCTGACCCCCGTCTCCAGCAAGGACCGTCCAAAATTCTG
TGAAC TGCTTCTGACACCGGATCATGTGAAGACTTTACCGGAGCCTTCC
ACTACAGCACACGTGATCGTAATGCATAGAGTTTATTATGGTGGATGC
GGAGGGAAATGCTAACAACTTTATCACCAAAGAGGAATGCGAAAGCACCT
GTGCTGCCTGA

Tdin 6

MSSGGLLLLLGLLTLWEVLTPVSSKDRPKFCLELPADIGPCDDF
TGAPHYSPREHECTEFTYGGCKGNANNFNTQECESTCAA

Tdin 6

ATGTCTTCTGGAGGTCTTCTTCTCCTGCTGGACTCCTCACC
CTCTGGAGGTGCTGACCCCCGTCTCCAGCAAGGACCGTCCAAAAGTTCTG
TGAAC TGCTGCTGACATCGAACCATGGGATGACTTTACCGGAGCCTTCC
ACTACAGCCCACGTGAAACATGAATGCATAGAGTTTATTATGGTGGATGC
AAAGGGAAATGCTAACAACTTTAACCCAAGAGCAATGCGAAAGCACCT
GTGCTGCCTGA

FIG. 10 Continúa.

Secuencia Consensus para Textilinias

83
1
1. Txln1-
2. Txln2-
3. Txln3-
4. Txln4-
5. Txln5-
6. Txln6-
consensus-
MSSGGMLLIGLLFLMEVLIPVSSKDRP fcelpdadGPC r p fymprek cIeFIYGC GUAHNFITxeCESTCAA

FIG. 11

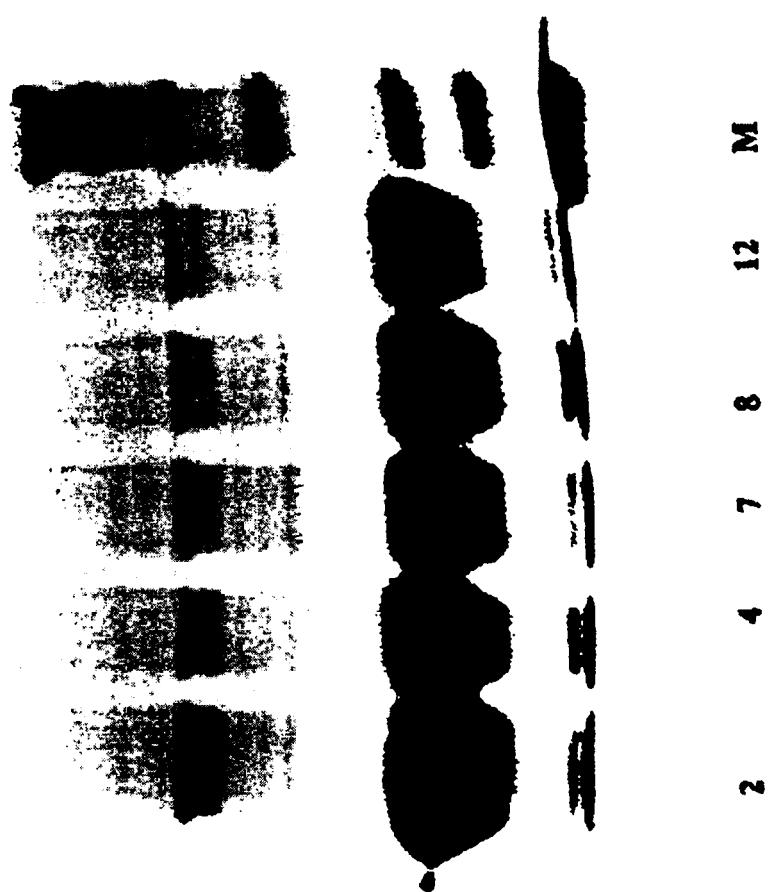


FIG. 12

ES 2 332 249 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> La Universidad de Queensland
Instituto Nacional de Estándares Biológicos y Control
5
<120> Agentes anti-fibrinolíticos novedosos

<130> Textilinans
10
<140> PCT/AU99/0XXX
<141> 1999-05-10

15 <150> AU PP3450
<151> 1999-05-11

<160> 44
20
<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
25 <211> 180
<212> ADN
<213> *Pseudonaja textilis*

30 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(180)

35 <220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(180)

40 <400> 1

45 aag gac cgt ccg gat ttc tgt gaa ctg cct gct gac acc gga cca tgt 48
 Lys Asp Arg Pro Asp Phe Cys Glu Leu Pro Ala Asp Thr Gly Pro Cys
 1 5 15

50 aga gtc aga ttc cca tcc ttc tac tac aac cca gat gaa aaa aag tgc 96
 Arg Val Arg Phe Pro Ser Phe Tyr Tyr Asn Pro Asp Glu Lys Lys Cys
 20 30

55 cta gag ttt att tat ggt gga tgc gaa ggg aat gct aac aat ttt atc 144
 Leu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Ala Asn Asn Phe Ile
 35 45

60 acc aaa gag gaa tgc gaa agc acc tgt gct gcc tga 180
 Thr Lys Glu Glu Cys Glu Ser Thr Cys Ala Ala
 50 60

65 <210> 2
<211> 59
65 <212> PRT
<213> *Pseudonaja textilis*

ES 2 332 249 T3

<400> 2

	Lys	Asp	Arg	Pro	Asp	Phe	Cys	Glu	Leu	Pro	Ala	Asp	Thr	Gly	Pro	Cys
5	1									10					15	
	Arg	Val	Arg	Phe	Pro	Ser	Phe	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Asp	Glu	Lys	Lys	Cys
		20							25					30		
10	Leu	Glu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Gly	Cys	Glu	Gly	Asn	Ala	Asn	Asn	Phe	Ile
		35						40					45			
15	Thr	Lys	Glu	Glu	Cys	Glu	Ser	Thr	Cys	Ala	Ala					
		50				55										

<210> 3

<211> 180

20 <212> ADN

<213> *Pseudonaja textilis*

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(180)

<220>

30 <221> mat_peptide

<222> (1)..(180)

35 <400> 3

	aag	gac	cgt	cca	gag	ttg	tgt	gaa	ctg	cct	cct	gac	acc	gga	cca	tgt	48
	Lys	Asp	Arg	Pro	Glu	Leu	Cys	Glu	Leu	Pro	Pro	Asp	Thr	Gly	Pro	Cys	
40	1				5					10					15		
	aga	gtc	aga	ttc	cca	tcc	ttc	tac	tac	aac	cca	gat	gaa	caa	aaa	tgc	96
	Arg	Val	Arg	Phe	Pro	Ser	Phe	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Asp	Glu	Gln	Lys	Cys	
45					20				25					30			
	cta	gag	ttt	att	tat	ggt	gga	tgc	gaa	ggg	aat	gct	aac	aat	ttt	atc	144
	Leu	Glu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Gly	Cys	Glu	Gly	Asn	Ala	Asn	Asn	Phe	Ile	
											35		40		45		
50	acc	aaa	gag	gaa	tgc	gaa	agc	acc	tgt	gct	gcc	tga					180
	Thr	Lys	Glu	Glu	Cys	Ser	Thr	Cys	Ala	Ala							
							50		55		60						
55	<210> 4																
	<211> 59																
60	<212> PRT																
	<213> <i>Pseudonaja textilis</i>																

ES 2 332 249 T3

<400> 4

Lys	Asp	Arg	Pro	Glu	Leu	Cys	Glu	Leu	Pro	Pro	Asp	Thr	Gly	Pro	Cys
1				5					10				15		
Arg	Val	Arg	Phe	Pro	Ser	Phe	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Asp	Glu	Gln	Lys	Cys
			20				25						30		
Leu	Glu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Gly	Cys	Glu	Gly	Asn	Ala	Asn	Asn	Phe	Ile
			35				40						45		

15

Thr Lys Glu Glu Cys Glu Ser Thr Cys Ala Ala
20 50 55

<210> 5

<211> 180

25 <212> ADN

<213> *Pseudonaja textilis*

<220>

<221> CDS

<222> (1), (180)

ω_5 <220>

<221> mat peptide

<222> (1),(180)

40 <400> 5

aag gac cgt cca aat ttc tgt aaa ctg cct gct gaa acc gga cga tgt 48
Lys Asp Arg Pro Asn Phe Cys Lys Leu Pro Ala Glu Thr Gly Arg Cys
1 5 10 15

```

aat gcc aaa atc cca cgc ttc tac tac aac cca cgt caa cat caa tgc  96
Asn Ala Lys Ile Pro Arg Phe Tyr Tyr Asn Pro Arg Gln His Gln Cys
          20           25           30

```

60

<210> 6

212 EBT

65 <212> PRI

ES 2 332 249 T3

<400> 6

5	Lys Asp Arg Pro Asn Phe Cys Lys Leu Pro Ala Glu Thr Gly Arg Cys 1 5 10 15
10	Asn Ala Lys Ile Pro Arg Phe Tyr Tyr Asn Pro Arg Gln His Gln Cys 20 25 30
15	Ile Glu Phe Leu Tyr Gly Gly Cys Gly Asn Ala Asn Asn Phe Lys 35 40 45
	Thr Ile Lys Glu Cys Glu Ser Thr Cys Ala Ala 50 55

20	<210> 7
25	<211> 180
	<212> ADN
	<213> <i>Pseudonaja textilis</i>
30	<220>
	<221> CDS
	<222> (1)..(180)
35	<220>
	<221> mat_peptide
	<222> (1)..(180)
	<400> 7

40	aag gac cat cca aaa ttc tgt gaa ctc cct gct gaa acc gga tca tgt Lys Asp His Pro Lys Phe Cys Glu Leu Pro Ala Glu Thr Gly Ser Cys 1 5 10 15 48
45	aaa ggc aac gtc cca cgc ttc tac tac aac gca gat cat cat caa tgc Lys Gly Asn Val Pro Arg Phe Tyr Tyr Asn Ala Asp His His Gln Cys 20 25 30 96
50	cta aaa ttt att tat ggt gga tgt gga ggg aat gct aac aat ttt aag Leu Lys Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly Asn Ala Asn Asn Phe Lys 35 40 45 144
55	acc ata gag gaa ggc aaa agc acc tgt gct gcc tga Thr Ile Glu Glu Gly Lys Ser Thr Cys Ala Ala 50 55 60 180
	<210> 8
	<211> 59
60	<212> PRT
	<213> <i>Pseudonaja textilis</i>

ES 2 332 249 T3

<400> 8

	Lys	Asp	His	Pro	Lys	Phe	Cys	Glu	Leu	Pro	Ala	Glu	Thr	Gly	Ser	Cys
5	1				5				10				15			
	Lys	Gly	Asn	Val	Pro	Arg	Phe	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Asp	His	His	Gln	Cys
					20				25					30		
10	Leu	Lys	Phe	Ile	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Ala	Asn	Asn	Phe	Lys
					35				40				45			
15	Thr	Ile	Glu	Glu	Gly	Lys	Ser	Thr	Cys	Ala	Ala					
					50				55							

<210> 9

20 <211> 180

<212> ADN

<213> *Pseudonaja textilis*

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(180)

30 <220>

<221> mat_peptide

<222> (1).. (180)

35 <400> 9

	aag	gac	cgt	cca	aaa	ttc	tgt	gaa	ctg	ctt	cct	gac	acc	gga	tca	tgt	48
40	Lys	Asp	Arg	Pro	Lys	Phe	Cys	Glu	Leu	Leu	Pro	Asp	Thr	Gly	Ser	Cys	
	1			5				10			15						

	gaa	gac	ttt	acc	gga	gcc	ttc	cac	tac	agc	aca	cgt	gat	cgt	gaa	tgc	96
45	Glu	Asp	Phe	Thr	Gly	Ala	Phe	His	Tyr	Ser	Thr	Arg	Asp	Arg	Glu	Cys	
			20				25			30							

	ata	gag	ttt	att	tat	ggt	gga	tgc	gga	ggg	aat	gct	aac	aat	ttt	atc	144
50	Ile	Glu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Ala	Asn	Asn	Phe	Ile	
					35			40			45						

	acc	aaa	gag	gaa	tgc	gaa	agc	acc	tgt	gct	gcc	tga					180
55	Thr	Lys	Glu	Glu	Cys	Ser	Thr	Cys	Ala	Ala							
					50			55			60						

55

<210> 10

<211> 59

60 <212> PRT

<213> *Pseudonaja textilis*

65

ES 2 332 249 T3

<400> 10

```

5      Lys Asp Arg Pro Lys Phe Cys Glu Leu Leu Pro Asp Thr Gly Ser Cys
      1           5           10          15

10     Glu Asp Phe Thr Gly Ala Phe His Tyr Ser Thr Arg Asp Arg Glu Cys
      20          25          30

15     Ile Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly Asn Ala Asn Asn Phe Ile
      35          40          45

20     Thr Lys Glu Glu Cys Glu Ser Thr Cys Ala Ala
      50          55

```

<210> 11

20 <211> 180

<212> ADN

<213> *Pseudonaja textilis*

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(180)

30 <220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(180)

35 <400> 11

```

40      aag gac cgt cca aag ttc tgt gaa ctg cct gct gac atc gga cca tgg    48
      Lys Asp Arg Pro Lys Phe Cys Glu Leu Pro Ala Asp Ile Gly Pro Trp
      1           5           10          15

45      gat gac ttt acc gga gcc ttc cac tac agc cca cgt gaa cat gaa tgc    96
      Asp Asp Phe Thr Gly Ala Phe His Tyr Ser Pro Arg Glu His Glu Cys
      20          25          30

50      ata gag ttt att tat ggt gga tgc aaa ggg aat gct aac aac ttt aat   144
      Ile Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Lys Gly Asn Ala Asn Asn Phe Asn
      35          40          45

55      acc caa gag caa tgc gaa agc acc tgt gct gcc tga                180
      Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ser Thr Cys Ala Ala
      50          55          60

```

55 <210> 12

<211> 59

60 <212> PRT

<213> *Pseudonaja textilis*

ES 2 332 249 T3

<400> 12

Lys Asp Arg Pro Lys Phe Cys Glu Leu Pro Ala Asp Ile Gly Pro Trp
1 5 10 15

Asp Asp Phe Thr Gly Ala Phe His Tyr Ser Pro Arg Glu His Glu Cys
20 25 30

10 Ile Glu Phe Ile Tyr Gly Cys Lys Gly Asn Ala Asn Asn Phe Asn
35 40 45

Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ser Thr Cys Ala Ala
50 55

15 <210> 13

<211> 72

<212> ADN

20 <213> *Pseudonaja textilis*

<220>

25 <221> sig_peptide

<222> (1)..(72)

<220>

30 <221> CDS

<222> (1)..(72)

<400> 13

35 atg tct tct gga ggt ctt ctt ctc ctg ctg gga ctc ctc acc ctc tgg 48
Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp
1 5 10 15

40 gag gtg ctg acc ccc gtc tcc agc 72
Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser
20

<210> 14

45 <211> 24

<212> PRT

<213> *Pseudonaja textilis*

50 <400> 14

Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp
1 5 10 15

55

Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser
20

<210> 15

<211> 252

65 <212> ADN

<213> *Pseudonaja textilis*

ES 2 332 249 T3

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(252)
5
<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(72)
10
<220>
<221> mat_peptide
<222> (73)..(252)
15
<400> 15

20      atg tct tct gga ggt ctt ctt ctc ctg ctg gga ctc ctc acc ctc tgg    48
        Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp
        -20           -15           -10
25      gag gtg ctg acc ccc gtc tcc agc aag gac cgt ccg gat ttc tgt gaa    96
        Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Asp Phe Cys Glu
        -5            -1   1           5
30      ctg cct gct gac acc gga cca tgt aga gtc aga ttc cca tcc ttc tac    144
        Leu Pro Ala Asp Thr Gly Pro Cys Arg Val Arg Phe Pro Ser Phe Tyr
        10           15           20
35      tac aac cca gat gaa aaa aag tgc cta gag ttt att tat ggt gga tgc    192
        Tyr Asn Pro Asp Glu Lys Lys Cys Leu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys
        25           30           35           40
40      gaa ggg aat gct aac aat ttt atc acc aaa gag gaa tgc gaa agc acc    240
        Glu Gly Asn Ala Asn Asn Phe Ile Thr Lys Glu Glu Cys Glu Ser Thr
        45           50           55
45      tgt gct gcc tga                                         252
        Cys Ala Ala
        60
50      <210> 16
        <211> 83
50      <212> PRT
        <213> Pseudonaja textilis
55      <400> 16
55
        Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp
        1           5           10          15
60      Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Asp Phe Cys Glu
        20          25          30

```

ES 2 332 249 T3

Leu Pro Ala Asp Thr Gly Pro Cys Arg Val Arg Phe Pro Ser Phe Tyr
 35 40 45

5 Tyr Asn Pro Asp Glu Lys Lys Cys Leu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys
 50 55 60

10 Glu Gly Asn Ala Asn Asn Phe Ile Thr Lys Glu Glu Cys Glu Ser Thr
 65 70 75 80

Cys Ala Ala

15 <210> 17

<211> 252

<212> ADN

<213> *Pseudonaja textilis*

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(252)

25 <220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(72)

30 <220>

<221> mat_peptide

<222> (73)..(252)

35 <400> 17

40 atg tct tct gga ggt ctt ctt ctc ctg ctg gga ctc ctc acc ctc tgg 48
 Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp
 -20 -15 -10

45 gag gtg ctg acc ccc gtc tcc agc aag gac cgt cca gag ttg tgt gaa 96
 Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Glu Leu Cys Glu
 -5 -1 1 5

50 ctg cct cct gac acc gga cca tgt aga gtc aga ttc cca tcc ttc tac 144
 Leu Pro Pro Asp Thr Gly Pro Cys Arg Val Arg Phe Pro Ser Phe Tyr
 10 15 20

55 tac aac cca gat gaa caa aaa tgc cta gag ttt att tat ggt gga tgc 192
 Tyr Asn Pro Asp Glu Gln Lys Cys Leu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys
 25 30 35 40

60 gaa ggg aat gct aac aat ttt atc acc aaa gag gaa tgc gaa agc acc 240
 Glu Gly Asn Ala Asn Asn Phe Ile Thr Lys Glu Glu Cys Glu Ser Thr
 45 50 55

65 tgt gct gcc tga 252
 Cys Ala Ala

60

<210> 18

<211> 83

ES 2 332 249 T3

<212> PRT

<213> *Pseudonaja textilis*

5 <400> 18

Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp
1 . 5 10 15

10 Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Glu Leu Cys Glu
20 25 30

15 Leu Pro Pro Asp Thr Gly Pro Cys Arg Val Arg Phe Pro Ser Phe Tyr
35 40 45

20 Tyr Asn Pro Asp Glu Gln Lys Cys Leu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys
50 55 60

25 Glu Gly Asn Ala Asn Asn Phe Ile Thr Lys Glu Glu Cys Glu Ser Thr
65 70 75 80

Cys Ala Ala

<210> 19

30 <211> 252

<212> ADN

<213> *Pseudonaja textilis*

35 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(252)

40 <220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(72)

45 <220>

<221> mat_peptide

<222> (73)..(252)

50

55

60

65

ES 2 332 249 T3

<400> 19

atg tct tct gga ggt ctt ctt ctc ctg ctg gga ctc ctc acc ctc tgg 48
 Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp
 -20 -15 -10

 gag gtg ctg acc ccc gtc tcc agc aag gac cgt cca aat ttc tgt aaa 96
 Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Asn Phe Cys Lys
 -5 -1 1 5

 ctg cct gct gaa acc gga cga tgt aat gcc aaa atc cca cgc ttc tac 144
 Leu Pro Ala Glu Thr Gly Arg Cys Asn Ala Lys Ile Pro Arg Phe Tyr
 10 15 20

 tac aac cca cgt caa cat caa tgc ata gag ttt ctc tat ggt gga tgc 192
 Tyr Asn Pro Arg Gln His Gln Cys Ile Glu Phe Leu Tyr Gly Gly Cys
 25 30 35 40

 gga ggg aat gct aac aat ttt aag acc att aag gaa tgc gaa agc acc 240
 Gly Gly Asn Ala Asn Asn Phe Lys Thr Ile Lys Glu Cys Glu Ser Thr
 45 50 55

 tgt gct gca tga 252

 30

 Cys Ala Ala 60

 35
 <210> 20
 <211> 83
 <212> PRT
 40 <213> *Pseudonaja textilis*

 <400> 20

 45 Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp
 1 5 10 15

 50 Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Asn Phe Cys Lys
 20 25 30

 55 Leu Pro Ala Glu Thr Gly Arg Cys Asn Ala Lys Ile Pro Arg Phe Tyr
 35 40 45

 60 Tyr Asn Pro Arg Gln His Gln Cys Ile Glu Phe Leu Tyr Gly Gly Cys
 50 55 60

 Gly Gly Asn Ala Asn Asn Phe Lys Thr Ile Lys Glu Cys Glu Ser Thr
 65 70 75 80

65 <210> 21
<211> 252

ES 2 332 249 T3

<212> ADN
 <213> *Pseudonaja textilis*

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(252)

10 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(72)

15 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (73)..(252)

20 <400> 21

25	atg tct tct gga ggt ctt ctt ctc ctg ctg gga ctc ctc acc ctc tgg Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp	48		
	-20	-15	-10	
30	gag gtg ctg acc ccc gtc tcc agc aag gac cat cca aaa ttc tgt gaa Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp His Pro Lys Phe Cys Glu	96		
	-5	-1	1	5
35	ctc cct gct gaa acc gga tca tgt aaa ggc aac gtc cca cgc ttc tac Leu Pro Ala Glu Thr Gly Ser Cys Lys Gly Asn Val Pro Arg Phe Tyr	144		
	10	15	20	
	tac aac gca gat cat cat caa tgc cta aaa ttt att tat tgt gga tgt	192		
40				
	Tyr Asn Ala Asp His His Gln Cys Leu Lys Phe Ile Tyr Gly Gly Cys			
	25	30	35	40
45	gga ggg aat gct aac aat ttt aag acc ata gag gaa ggc aaa agc acc Gly Gly Asn Ala Asn Asn Phe Lys Thr Ile Glu Glu Gly Lys Ser Thr	240		
	45	50	55	
50	tgt gct gcc tga Cys Ala Ala	252		
	60			
55	<210> 22			
	<211> 83			
	<212> PRT			
60	<213> <i>Pseudonaja textilis</i>			

ES 2 332 249 T3

<400> 22

5	Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp			
	1	5	10	15
	Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp His Pro Lys Phe Cys Glu			
10	20	25	30	
	Leu Pro Ala Glu Thr Gly Ser Cys Lys Gly Asn Val Pro Arg Phe Tyr			
	35	40	45	
15	Tyr Asn Ala Asp His His Gln Cys Leu Lys Phe Ile Tyr Gly Gly Cys			
	50	55	60	
	Gly Gly Asn Ala Asn Asn Phe Lys Thr Ile Glu Glu Gly Lys Ser Thr			
20	65	70	75	80
	Cys Ala Ala			

25 <210> 23

<211> 252

<212> ADN

<213> *Pseudonaja textilis*

30 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(252)

35 <220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(72)

40 <220>

<221> mat_peptide

<222> (73)..(252)

45 <400> 23

50	atg tct tct gga ggt ctt ctt ctc ctg ctg gga ctc ctc acc ctc tgg	48	
	Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp		
	-20	-15	-10

55	gag gtg ctg acc ccc gtc tcc agc aag gac cgt cca aaa ttc tgt gaa	96
----	---	----

60

65

ES 2 332 249 T3

	Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Lys Phe Cys Glu	
	-5 -1 1 5	
5	ctg ctt cct gac acc gga tca tgt gaa gac ttt acc gga gcc ttc cac	144
	Leu Leu Pro Asp Thr Gly Ser Cys Glu Asp Phe Thr Gly Ala Phe His	
	10 15 20	
10	tac agc aca cgt gat cgt gaa tgc ata gag ttt att tat ggt gga tgc	192
	Tyr Ser Thr Arg Asp Arg Glu Cys Ile Glu Phe Ile Tyr Gly Cys	
	25 30 35 40	
15	gga ggg aat gct aac aat ttt atc acc aaa gag gaa tgc gaa agc acc	240
	Gly Gly Asn Ala Asn Asn Phe Ile Thr Lys Glu Glu Cys Glu Ser Thr	
	45 50 55	
20	tgt gct gcc tga	252
	Cys Ala Ala	
	60	
25	<210> 24	
	<211> 83	
	<212> PRT	
	<213> <i>Pseudonaja textilis</i>	
30	<400> 24	
	Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp	
	1 5 10 15	
35	Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Lys Phe Cys Glu	30
	20 25	
40	Leu Leu Pro Asp Thr Gly Ser Cys Glu Asp Phe Thr Gly Ala Phe His	45
	35 40 45	
45	Tyr Ser Thr Arg Asp Arg Glu Cys Ile Glu Phe Ile Tyr Gly Cys	60
	50 55	
	Gly Gly Asn Ala Asn Asn Phe Ile Thr Lys Glu Glu Cys Glu Ser Thr	80
	65 70 75	
50	Cys Ala Ala	
	<210> 25	
	<211> 252	
55	<212> ADN	
	<213> <i>Pseudonaja textilis</i>	
60	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(252)	
65	<220>	
	<221> sig_peptide	
	<222> (1)..(72)	

ES 2 332 249 T3

<220>

<221> mat_peptide

<222> (73)..(252)

5

<400> 25

atg tct tct gga ggt ctt ctt ctc ctg ctg gga ctc ctc acc ctc tgg Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp	48
	-20 -15 -10

10

gag gtg ctg acc ccc gtc tcc agc aag gac cgt cca aag ttc tgt gaa Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Lys Phe Cys Glu	96
	-5 -1 1 5

15

ctg cct gct gac atc gga cca tgg gat gac ttt acc gga gcc ttc cac Leu Pro Ala Asp Ile Gly Pro Trp Asp Asp Phe Thr Gly Ala Phe His	144
	10 15 20

20

tac agc cca cgt gaa cat gaa tgc ata gag ttt att tat ggt gga tgc Tyr Ser Pro Arg Glu His Glu Cys Ile Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys	192
	25 30 35 40

25

aaa ggg aat gct aac aac ttt aat acc caa gag caa tgc gaa agc acc Lys Gly Asn Ala Asn Asn Phe Asn Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ser Thr	240
	45 50 55

30

tgt gct gcc tga Cys Ala Ala	252
	60

35

<210> 26

<211> 83

<212> PRT

<213> *Pseudonaja textilis*

40

<400> 26

Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp	
	1 5 10 15

45

Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Lys Phe Cys Glu	
	20 25 30

50

Leu Pro Ala Asp Ile Gly Pro Trp Asp Asp Phe Thr Gly Ala Phe His	
	35 40 45

55

Tyr Ser Pro Arg Glu His Glu Cys Ile Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys	
	50 55 60

55

Lys Gly Asn Ala Asn Asn Phe Asn Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ser Thr	
	65 70 75 80

60

Cys Ala Ala

<210> 27

<211> 24

65

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 332 249 T3

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Codificante degenerado
5 <400> 27
atgaargaya grcchgaryt ngar 24

10 <210> 28
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador anticodeficante degenerado
20 <400> 28
gtrctytert gytctcy 18

25 <210> 29
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
30 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador delantero específico de gen para Txln1
35 <400> 29
atatatggat ccaaggaccg gcctgactc 30

40 <210> 30
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
45 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador inverso específico de gen para Txln1
50 <400> 30
aacggaaatt ctcagagcca cacgtgcattt c 31

55 <210> 31
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
60 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador inverso específico de gen para Txln1
65 <400> 31
aacggaaatt ctcatgagcc acaggttagac tc 32

ES 2 332 249 T3

<210> 32
<211> 45
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador inverso universal largo listo RACE

<400> 32

ctaatacgac tcactatagg gcaaggcgtg gtaacaacgc agagt 45
15
<210> 33
<211> 22
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador inverso universal corto listo RACE

25 <400> 33

ctaatacgac tcactatagg gc 22

30 <210> 34
<211> 23
<212> ADN
35 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador inverso universal anidado listo RACE

40 <400> 34

aagcagtggt aacaacgcag agt 23

45 <210> 35
<211> 24
<212> ADN
50 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador delantero específico de gen Txln1
55 <400> 35

atcagccgat ccatgtctgg aggt 24

60 <210> 36
<211> 27
<212> ADN
65 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 332 249 T3

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador inverso específico de gen Txln1
<400> 36
5 ttcctgaat ttcaggcag cacaggt 27

<210> 37
10 <211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador delantero de secuencia de péptido activo Txln1

<400> 37
20 attataggat ccaaggaccg tccggat 27

<210> 38
25 <211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador delantero de gen para txln2

<400> 38
35 attataggat ccaaggaccg tccagag 27

<210> 39
40 <211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador delantero de gen para Txln3

<400> 39
50 aacgtcgat ccaaggaccg tccaaat 27

<210> 40
55 <211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador delantero de gen para Txln4

<400> 40
65 aacgtcgat ccaaggacca tccaaa 27

aacgtcgat ccaaggacca tccaaa

ES 2 332 249 T3

<210> 41
<211> 27
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador delantero de gen para Txln5
<400> 41

aacgtcgat tcaaggaccg tccaaaaa 27
15
<210> 42
<211> 27
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador delantero de gen para Txln6
<400> 42

attgtcgat ccaaggacct gccaaag 27
30
<210> 43
<211> 408
<212> ADN
35 <213> *Pseudonaja textilis*

<220>
40 <221> CDS
<222> (12)..(191)

<220>
45 <221> sig_peptide
<222> (12)..(83)

<220>
50 <221> mat_peptide
<222> (84)..(191)

55

60

65

ES 2 332 249 T3

<400> 43

<pre>ggagcttcat c atg tct tct gga ggt ctt ctt ctc ctg ctg gga ctc ctc</pre>	<pre>-20</pre>	<pre>50</pre>
<pre>Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu</pre>		
	<pre>-15</pre>	

5

<pre>acc ctc tgg gag gtg ctg acc ccc gtc tcc agc aag gac cgt cca gag</pre>	<pre>-10</pre>	<pre>98</pre>
<pre>Thr Leu Trp Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Glu</pre>	<pre>-5</pre>	<pre>5</pre>
	<pre>-1</pre>	<pre>1</pre>

10

<pre>ttg tgt gaa ctg cct gac acc gga cca tgt aga gtc aga tcc cca</pre>	<pre>10</pre>	<pre>146</pre>
<pre>Leu Cys Glu Leu Pro Pro Asp Thr Gly Pro Cys Arg Val Arg Ser Pro</pre>	<pre>15</pre>	<pre>20</pre>

15

<pre>tcc ttc tac tac aac cca gat gaa caa aaa tgc cta gag ttt att</pre>	<pre>25</pre>	<pre>191</pre>
<pre>Ser Phe Tyr Tyr Asn Pro Asp Glu Gln Lys Cys Leu Glu Phe Ile</pre>	<pre>30</pre>	<pre>35</pre>

20

tatggtgat gcgaaggaa tgctaaccaa ttttatcacc aaagaggaat gcgaaagcac 251

25

<pre>ctgtgctgcc tgaatgagga gaccctcctg gattggatcg acagttccaa cttgacccaa</pre>	<pre>311</pre>
<pre>agaccctgct tctgccctgg accaccctgg acacccttcc cccaaacccc accctggact</pre>	<pre>371</pre>

30

<pre>aattcctttt ctctgcaata aagcttggt tccagct</pre>	<pre>408</pre>
--	----------------

<210> 44

<211> 60

35

<212> PRT

<213> *Pseudonaja textilis*

<400> 44

40

<pre>Met Ser Ser Gly Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Thr Leu Trp</pre>	<pre>-20</pre>	<pre>-15</pre>	<pre>-10</pre>
--	----------------	----------------	----------------

45

<pre>Glu Val Leu Thr Pro Val Ser Ser Lys Asp Arg Pro Glu Leu Cys Glu</pre>	<pre>-5</pre>	<pre>-1</pre>	<pre>1</pre>	<pre>5</pre>
--	---------------	---------------	--------------	--------------

50

<pre>Leu Pro Pro Asp Thr Gly Pro Cys Arg Val Arg Ser Pro Ser Phe Tyr</pre>	<pre>10</pre>	<pre>15</pre>	<pre>20</pre>
--	---------------	---------------	---------------

55

<pre>Tyr Asn Pro Asp Glu Gln Lys Cys Leu Glu Phe Ile</pre>	<pre>25</pre>	<pre>30</pre>	<pre>35</pre>
--	---------------	---------------	---------------

60

65