



11 Número de publicación: **2 374 054**

21 Número de solicitud: 201031031

51 Int. Cl.:
C12N 15/15 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)
A61K 38/57 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **03.07.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
13.02.2012

71 Solicitante/s: **Instituto de Salud Carlos III
c/ Sinesio Delgado, 6
28029 Madrid, ES
Universidad Central de Venezuela Caracas**

72 Inventor/es: **Gárate Ormaechea, Teresa;
Perteguer Prieto, María Jesús;
Rodríguez de las Parras, Esperanza y
Valdivieso, Elizabeth**

74 Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

54 Título: **Nuevo inhibidor de serina proteasa y su uso.**

57 Resumen:

Nuevo inhibidor de serina proteasa y su uso. La invención se refiere a una nueva proteína, identificada mediante rastreo de una genoteca de cDNA de *Anisakis simplex*, así como a su secuencia codificante y a sus vectores de expresión. Dicha proteína, miembro de la familia de las serpinas, es capaz de inhibir de manera dependiente de dosis a la trombina humana, sin afectar al factor Xa de la coagulación, y sin que la heparina altere su actividad inhibitoria. Así, la invención se refiere también al uso de esta proteína para la preparación de un medicamento, especialmente si se trata de un anticoagulante. Su administración tendría especial interés en los casos de hipercoagulopatías asociadas a la administración de heparina. Además, representa una alternativa a los anticoagulantes derivados de la cumarina, a los que podría sustituir en cualquiera de las situaciones en las que se administran.

ES 2 374 054 A1

DESCRIPCIÓN

Nuevo inhibidor de serina proteasa y su uso.

5 Campo técnico

La invención se inscribe en el campo de la Biotecnología y en la aplicación de moléculas biológicas en el campo clínico. Más concretamente, la invención se refiere a un nuevo inhibidor de serina proteasa aislada del nematodo *Anisakis simplex* y a su uso como anticoagulante.

10

Antecedentes de la invención

La cascada de la coagulación sanguínea es un complejo proceso que se desencadena en respuesta a una lesión en un vaso sanguíneo y que comprende una secuencia compleja de reacciones en cadena, en la que participan varios tipos celulares y proteínas solubles de la sangre, y que culmina con la formación de un coágulo que evita la pérdida de sangre a través de la lesión inicial. Se denomina coágulo a una red de proteínas insolubles compuesta por fibrina, en la que quedan atrapadas otras proteínas, agua, sales, plaquetas y otras células sanguíneas, que impide la salida de la sangre hasta que el tejido lesionado se repara.

15

20

El proceso de prevención de la pérdida de sangre comienza con la constricción del vaso sanguíneo, para disminuir el flujo sanguíneo al área de la lesión. A continuación, cuando las plaquetas entran en contacto con las fibras de colágeno expuesto debido a la ruptura del recubrimiento epitelial de los vasos, se produce su agregación, uniéndose al colágeno para formar un tapón plaquetario, así como su activación, que da lugar a que se liberen distintos factores como el tromboxano A2, inductor de la agregación plaquetaria, así como fosfolípidos, lipoproteínas y otras proteínas importantes de la cascada de coagulación.

25

La cascada de coagulación propiamente dicha, que conduce a la formación de la malla de fibrina que recubre al tapón, es una secuencia de reacciones proteolíticas que se inicia mediante sustancias activadoras secretadas por el vaso, por las plaquetas y por proteínas sanguíneas adheridas a la pared del vaso. Tal como se esquematiza en la Fig. 1, la cascada de coagulación está formada por dos vías, cuya denominación hace referencia al lugar en donde se inicia la cascada de coagulación en cada una de ellas: la vía extrínseca (que se inicia fuera del vaso sanguíneo, cuando el factor VII activo (VIIa) se une al factor tisular (TF) o tromboplastina de las membranas de las células que están fuera de los vasos y originan el complejo VIIa/TF) y la vía intrínseca (que se activa en el interior del vaso sanguíneo, por el contacto de la pared del mismo con las partículas de lipoproteínas y quilomicrones). Ambas vías confluyen en la formación de factor X activo (Xa), que da lugar a la conversión de la protrombina en trombina, enzima responsable de la transformación del fibrinógeno en la fibrina que finalmente genera el coágulo.

30

35

La trombina, por ello, es considerada a menudo la enzima clave de la coagulación, por ser la proteasa que da lugar a la formación de fibrina al actuar sobre el fibrinógeno. Se trata de una serina proteasa, es decir, una hidrolasa que degrada enlaces peptídicos y que posee en su centro activo un resto de serina esencial para la catálisis enzimática. Se genera por la acción del factor Xa sobre la protrombina, una glicoproteína que se sintetiza en el hígado y que requiere vitamina K como cofactor para su síntesis.

40

Otros factores de coagulación también necesitan vitamina K para su síntesis en el hígado, por lo que el déficit en esta vitamina puede afectar seriamente a la coagulación de la sangre, dando lugar a aparición de hemorragias.

45

Adicionalmente a los factores de coagulación, existen otras proteínas muy importantes para el control del proceso: las del sistema anticoagulante, que evita la formación de trombos o émbolos y la oclusión de las zonas no dañadas, confinando la formación del coágulo a la zona lesionada. La proteína C, la proteína S, la trombomodulina (TM) y la antitrombina (AT) son elementos importantes de este sistema.

50

La antitrombina III en particular se considera la principal inhibidora fisiológica de la coagulación. Es una glicoproteína que se sintetiza en el hígado sin depender de la vitamina K y que actúa inhibiendo irreversiblemente a varios factores procoagulantes activos, entre los cuales está la trombina, pero también el factor Xa, la calicreína y los factores XIa y XIIa. La actividad de la antitrombina III es uno de los mecanismos fisiológicos principales de control de la cantidad de trombina, aunque otros inhibidores, como el cofactor II de la heparina humana (HCII), también tienen relevancia en ese aspecto. La acción de la antitrombina, que se produce por la formación de complejos con los factores de coagulación a los que inhibe, se incrementa notablemente en presencia de heparina, un heteropolisacárido presente en el endotelio de los vasos sanguíneos y en los gránulos de las células cebadas, que facilita la unión de la antitrombina III con los correspondientes factores procoagulantes activos.

55

60

Existen diversas situaciones clínicas en las que es conveniente retrasar o impedir la coagulación de la sangre. Para ello, se han empleado tradicionalmente distintos fármacos anticoagulantes, que son compuestos que dificultan o impiden la agregación plaquetaria o algún otro paso de la cascada de la coagulación. Destaca entre ellos la propia heparina, un compuesto fisiológico presente en gran cantidad en los mamíferos, que alarga el tiempo de coagulación, y cuya administración se suele utilizar cuando se precisa de acción anticoagulante rápida y por poco tiempo, como puede ser en la prevención de trombosis venosas de cirugía, donde se utiliza a bajas dosis.

65

La administración de heparina, sin embargo, no siempre es recomendable, pues puede dar lugar a estados de hipercoagulabilidad. Así, por ejemplo, entre los pacientes a los que se les administra heparina en el período preoperatorio, como pueden ser los que van a ser sometidos a un bypass cardiopulmonar, se ha observado que un porcentaje de ellos presenta un déficit significativo de antitrombina III y necesitan reposición de la misma previa a la realización de la intervención, bien en forma de plasma fresco congelado, bien como concentrado de antitrombina III: la administración previa de heparina, para potenciar la acción anticoagulante de la antitrombina III, ocasiona el consumo de la antitrombina y una disminución progresiva de la misma. También se observa reducción de la antitrombina III en los pacientes que sufren enfermedad hepática, en coagulopatías de consumo con CID (coagulación intravascular diseminada) y en caso de hemorragias masivas, dando lugar a un aumento del riesgo de episodios trombóticos perioperatorios. Por ello, también en estos casos se realiza reposición de la antitrombina III, mediante el uso de plasma fresco congelado o concentrados de antitrombina. Aunque, en general, se considera que el tratamiento previo al que se someten los concentrados de antitrombina III disponibles en Europa y Estados Unidos hace que sea prácticamente nulo el riesgo de transmisión de agentes infecciosos, siempre existe un riesgo residual y además son productos extremadamente caros, por lo que dan lugar a un sensible aumento de los costes del tratamiento.

Otro estado de hipercoagulabilidad, muy temido en pacientes críticamente enfermos, es la trombosis relacionada con la trombopenia asociada a la heparina. La heparina provoca un grado leve de trombocitopenia, trastorno que se ha comprobado que es mediado por un anticuerpo que estimula la agregación y activación plaquetaria en presencia de heparina. Los pacientes que padecen este trastorno suelen sufrir episodios venosos, así como accidentes arteriales trombóticos graves. Si el síndrome no se identifica en seguida, puede conducir a la pérdida de miembros, infartos viscerales y cardíacos e, incluso, mortalidad en grado elevado. Su tratamiento incluye el cese inmediato de la administración de heparina, sustituyéndola en ocasiones por heparina de bajo peso molecular (que tiene predominantemente una actividad anti-factor Xa, aunque es también dependiente de antitrombina III) o combinándola con hirudina para disminuir la dosis administrada; también puede utilizarse el tratamiento antiagregante con ácido acetilsalicílico como alternativa.

Todos estos problemas han llevado a que se busquen alternativas con las que sustituir la heparina.

Otros anticoagulantes de uso común son los anticoagulantes dicumarínicos, los cuales son inhibidores de la vitamina K, lo que da lugar a que aparezcan en la sangre formas inactivas de los factores en cuya síntesis interviene dicha vitamina. Así, la acción de estos anticoagulantes, como sucede con la heparina, no se limita a un paso concreto de la cascada de coagulación, sino que afecta a varios puntos de la misma, dificultando su control preciso y aumentando el riesgo de que se produzcan hemorragias. Además, el tratamiento continuado con anticumarínicos, como sucede, por ejemplo, en los pacientes con válvulas cardíacas o prótesis mecánicas o articulares, así como en los que padecen fibrilación auricular o embolia pulmonar, incrementa el riesgo de calcificación de las arterias y de las válvulas cardíacas.

La importancia del control de la coagulación en distintas situaciones clínicas ha llevado a buscar otros nuevos anticoagulantes, teniendo preferencia por aquellos que actúan exclusivamente en un paso concreto de la cascada de coagulación. Así recientemente se han descrito una serie de compuestos de síntesis que específicamente inhiben a la trombina (dabigatran) y al factor Xa (rivaroxaban), cuyo uso está aprobado para la prevención de tromboembolismo venoso tras prótesis total de rodilla y cadera (Ufer, 2010). Además el dabigatran está siendo evaluado en ensayos clínicos de fase III como anticoagulante oral para diferentes patologías como síndrome coronario agudo, enfermos crónicos, y estados relacionados con cirugías cardíacas (Ahrens *et al.*, 2010).

Por otra parte, también se han tratado de caracterizar moléculas de seres vivos con propiedades anticoagulantes. Algunas de las proteínas con actividad anticoagulante pertenecen al grupo de las serpinas. Se denomina así a una superfamilia de proteínas, a la que pertenecen la antitrombina y la antitripsina, que comparten una estructura similar, y que deben su nombre a que la mayoría de ellas inhiben serina proteasas, aunque también se han identificado serpinas que inhiben caspasas y cisterna proteasas similares a la papaína, a las que se denomina serpinas de clase cruzada (Sakata *et al.*, 2004; Law *et al.*, 2006). Forman un grupo diverso, al que pertenecen varias proteínas humanas, así como moléculas de plantas, bacterias, parásitos pluricelulares como helmintos nematodos, y ciertos virus. Las serpinas han evolucionado para modular la hidrólisis de los enlaces peptídicos mediante un mecanismo de inhibición irreversible similar al de los sustratos suicidas (Silverman & Lomas, 2004), compuestos que se enlazan al centro activo de una enzima y químicamente se transforman en una especie reactiva que modifica de forma irreversible al aminoácido del sitio activo. Las serpinas, por su parte, experimentan importantes cambios en su estructura en el proceso de la inhibición enzimática.

Las serpinas en las que se ha identificado actividad anticoagulante se han aislado de diversos organismos. Así, por ejemplo, puede citarse la proteína PTI de origen humano descrita por Coughlin *et al.* (Coughlin *et al.*, 1993), que supuestamente es una molécula intracelular que carece de péptido señal, pero que tiene capacidad de inhibir la trombina de manera independiente a la presencia de heparina, y que inhibe también tanto la tripsina como el factor de coagulación Xa (Morgenstern *et al.*, 1994). También se ha aislado una serpina del virus mixoma (Nash *et al.*, 1998) que, además de inhibir la trombina y la catepsina G, inhibe también el factor Xa. Otra serpina capaz de inhibir trombina se ha detectado en el cangrejo *Tachipleus tridentatus* (Miura *et al.*, 1994).

Otras muchas serpinas no presentan actividad anticoagulante. Así, en organismos evolutivamente bastante distantes de cualquiera de los mencionados, como son los nematodos, no se han descrito serpinas que actúen sobre las serina

proteasas de la coagulación, ni siquiera en los nematodos parásitos, a pesar de que, recientemente, se ha publicado que, en general, los inhibidores de serina proteasas de parásitos de la familia de las serpinas están entre los mejores ejemplos de genes que interactúan con los procesos fisiológicos del hospedador (Zang & Maizels, 2001). Se sabe que los inhibidores de proteasas de los parásitos no sólo interactúan con proteasas endógenas del mismo parásito, regulando su propia actividad como proteasas, sino que se supone que juegan otros papeles importantes en la defensa contra la digestión por las proteasas del hospedador, en la inhibición de las proteasas del hospedador implicadas en la respuesta inmune, o incluso actuando como inmunomoduladores. Así, en los nematodos, se han asignado algunos papeles hipotéticos a las serpinas como, por ejemplo, la protección del ambiente hostil proteolítico. Pero sólo en el caso de la serpina SPN-2 de *Brugia malayi* hay evidencias experimentales que apoyan que las serpinas tengan en los nematodos parásitos una función de evasión de la respuesta inmune del hospedador, pues la serpina SPN-2 es capaz de inhibir dos serina proteasas derivadas de neutrófilos (Zang *et al.*, 1999), la elastasa y la catepsina G, aunque no se ha descrito que dicha serpina sea capaz de actuar sobre las serina proteasas de la coagulación.

En nematodos no parásitos, de vida libre, como es el caso de *Caenorhabditis elegans*, se han descrito hasta nueve serpinas (Pak *et al.*, 2004), para ninguna de las cuales se ha mencionado que tenga actividad antitrombina. Además, en el momento de su aislamiento, se consideró que sus características eran suficientemente distintivas de otros grupos de serpinas como para crear para ellas un nuevo clade, diferente de los establecidos hasta entonces. Aun requiriendo una clasificación específica para ellas, Pak *et al.* (2004) comentan que las serpinas de *Caenorhabditis elegans* se parecen fundamentalmente al clade B de serpinas, que son proteínas intracelulares. Una de estas nueve serpinas, SRP-2, es considerada por los autores del artículo una serpina inhibitoria clásica de clase cruzada; esto es así porque inhibe principalmente a la granzima B (serina proteasa) y, en menor medida, a la catepsina V (cisterna proteasa). Además de no sugerirse en el artículo, es improbable que SRP-2 tenga actividad antitrombina, porque los aminoácidos presentes en su centro activo, P1-P1', son la pareja Glu-Met, mientras que la trombina es una enzima Arg específica, aunque no todos sus inhibidores presentan dicho aminoácido en su sitio reactivo, siendo el HCII una de esas excepciones.

En nematodos parásitos sí se han descrito inhibidores de proteasas que inhiben la coagulación, pero pertenecen a otras familias inhibidores de serina proteasas, tales como la de las esmapinas. Es el caso, por ejemplo, de los inhibidores de las serina proteasas caracterizados a partir de *Ancylostoma caninum* y *Ancylostoma ceylanicum*, nematodos intestinales que causan graves anemias. Ninguno de los inhibidores identificados a partir de estos nematodos inhibe directamente la trombina, sino que actúan sobre otras serina proteasas de la coagulación: NAP5, sobre los factores Xa y Xia; NAP6, sobre el factor Xa; AceAP1 sobre el factor Xa; y NAP2, sobre el complejo factor VIIa/TF (Capello *et al.*, 1995; Stassens *et al.*, 1996).

Otro de los nematodos parásitos en los que se ha identificado alguna proteína con capacidad anticoagulante es *Anisakis simplex*. *Anisakis simplex* es un nematodo parásito que infecta a mamíferos acuáticos, produciendo úlceras gástricas, con gusanos unidos a la mucosa gástrica o libres en el estómago, así como exudados hemorrágicos y perforación de la cavidad abdominal (Geraci & St. Aubin, 1987). El ser humano es un hospedador accidental que adquiere la infección mediante la ingestión de larvas de *Anisakis simplex* presentes en alimentos de origen marino crudos o poco cocinados. La infección de seres humanos por *Anisakis simplex* es una causa bien conocida de enfermedad gastrointestinal, con síntomas clínicos de moderados a graves tales como náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal y epigástrico (Ishikura *et al.*, 1993), encontrándose a menudo sangre oculta en el jugo gástrico o las heces (Bier, 1988). En muchos casos los síntomas gastrointestinales están asociados con alteraciones inmuno lógicas, habitualmente reacciones de tipo alérgico (Audicana & Kennedy, 2008). Sin embargo, a pesar de los muchos estudios que se están efectuando sobre este parásito, por el alto grado de infección que se está detectando en seres humano, existe un espacio vacío en el conocimiento de genes que interactúan con procesos fisiológicos del hospedador. En *Anisakis simplex* sólo se han descrito inhibidores de serina proteasas pertenecientes a la familia de Kunitz y a la de las esmapinas (Morris & Sakanary, 1994; Nguyem *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2008). Las esmapinas descritas en *Anisakis simplex* (ASPI-1 y ASPI-2) inhiben la elastasa y en el caso de ASPI-3, se desconoce cual es su diana. Aunque las esmapinas caracterizadas en otros nematodos, como *Ancylostoma caninum* y *Ancylostoma ceylanicum* presentan actividad anticoagulante, su punto de intervención en la cascada de coagulación es la inhibición de los factores Xa y VIIa. Hasta ahora, en el nematodo *Anisakis simplex* no se han identificado anticoagulantes de la familia de las serpinas.

Como se ve, los factores anticoagulantes capaces de interactuar directamente con la trombina comercialmente disponibles no abundan. Además, en muchos casos, su actividad depende o se ve potenciada por la presencia de heparina. Dada la importancia que la prevención de la coagulación de la sangre tiene en muchas situaciones clínicas, es importante disponer de anticoagulantes alternativos a los actualmente existentes. Dichos anticoagulantes deberían actuar preferiblemente sobre la trombina de manera que, si existe alguna deficiencia o alteración tanto en la vía extrínseca como en la intrínseca de la coagulación, la actividad del anticoagulante no se vería afectada, porque actuaría específicamente sobre la molécula clave y final de la cascada de coagulación: sobre la enzima que reacciona con el fibrinógeno y lo convierte en fibrina que forma el coágulo. Más preferiblemente, el anticoagulante debería ser selectivo, con acción directa sobre la trombina sin necesitar heparina, por lo que su uso evitaría los efectos perjudiciales derivados del empleo indiscriminado de este último compuesto y, además, sería de utilidad potencial en aquellas situaciones en las que no se pueden emplear heparinas, así como en pacientes inmunodeprimidos o sometidos a tratamientos continuados con concentrados de plasma fresco o antitrombina III, disminuyendo con ello el riesgo de que adquieran alguna enfermedad infecciosa de transmisión parenteral y su alto coste económico.

La presente invención proporciona una solución a esos problemas.

Compendio de la invención

La invención se basa en la caracterización bioquímica y bioinformática de una serpina recombinante de *Anisakis simplex*, a la que en lo sucesivo se hará referencia en la presente solicitud como AniSerp. En particular, la invención se basa en el descubrimiento de que dicha serpina es capaz de inhibir la trombina humana, de manera dependiente de dosis, sin afectar al factor Xa de la coagulación y sin que la heparina tenga ningún efecto en esta actividad inhibitoria. Además, AniSerp es también capaz de inhibir, aunque con menor actividad y de manera reversible, a las catepsinas G y L.

La capacidad de esta nueva serpina de inhibir a la trombina y no al factor de la coagulación Xa (la otra serina proteasa que es inhibida por la antitrombina III) la hace adecuada para uso como anticoagulante en pacientes en los que se sospeche que pueda existir alguna deficiencia o alteración tanto en la vía extrínseca como en la vía intrínseca de coagulación, pues el empleo de esta nueva serpina no interferiría, ya que actúa específicamente sobre la molécula clave y final de la cascada de coagulación. Esto hace que la utilización de AniSerp como anticoagulante presente la ventaja, frente al uso de otros anticoagulantes, de que se puede administrar a pacientes inmunodeprimidos, o sometidos a tratamientos continuados con concentrados de plasma fresco o antitrombina III, que además de ser caros, los pone en riesgo de adquirir alguna enfermedad infecciosa de transmisión parenteral, riesgo que se elimina con la utilización de una proteína aislada o sintética. Así, la expresión de AniSerp en sistemas de expresión a través de hospedadores transformados con vectores recombinantes que contengan una secuencia codificante de AniSerp bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas, que permitan su expresión en dicho hospedador, facilitaría la producción y aislamiento de la proteína recombinante, lo que sería de utilidad para la preparación de formas de administración médicas más seguras, disminuyendo el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas por vía parenteral, además de abaratar los costes de los tratamientos alternativos.

Por otra parte, el hecho de que la actividad anticoagulante de AniSerp no se vea potenciada por la heparina posibilita la aplicación terapéutica de AniSerp en situaciones en las que existe riesgo de que se desarrollen estados de hipercoagulabilidad que se asocian con la heparina, tales como el déficit adquirido de antitrombina, que se produce muchas veces en el contexto de la terapia con heparina, o incluso para el tratamiento de dichos estados de hipercoagulabilidad. Una de las situaciones en las que podría ser adecuada su administración serían los períodos preoperatorios previos a ciertas intervenciones quirúrgicas, tales como las de bypass cardiopulmonar, lo que permitiría rebajar las cantidades de heparina utilizadas, evitándose el consumo masivo de antitrombina producido por la heparina y la hipercoagulabilidad generada como consecuencia de la disminución de dicha proteína. También podría administrarse posteriormente a la operación quirúrgica, en lugar de los concentrados de antitrombina III, extremadamente caros, que se utilizan a menudo para reponer la antitrombina III cuando se produce un déficit de la misma. Igualmente estaría indicada en otras situaciones clínicas en las que la antitrombina III está reducida, tales como la enfermedad hepática, en coagulopatías de consumo con CID (coagulación intravascular diseminada) y hemorragias masivas, así como en la trombosis relacionada con la trombopenia asociada a la heparina.

AniSerp, además, supone una alternativa como anticoagulante a los derivados de la cumarina, respecto a los cuales presenta las ventajas de actuar sobre la trombina sin interferir con el factor Xa, posibilitando un control más preciso de las dosis según los requerimientos del paciente y sus condiciones específicas, disminuyendo con ello el riesgo de hemorragias. Además, el hecho de que AniSerp no interraccione con la vitamina K disminuye también el riesgo de calcificación arterial y de las válvulas asociado al consumo continuado de anticoagulantes derivados de la cumarina. De esta manera, AniSerp representa una alternativa adecuada para ser suministrada como anticoagulante, por ejemplo, a los enfermos con válvulas cardíacas o prótesis mecánicas o articulares, así como en los que padecen fibrilación auricular, síndrome coronario agudo, embolia pulmonar o enfermedad cardíaca crónica.

Su seguridad como anticoagulante se ve reforzada, además, por el hecho de que AniSerp no es reconocida por anticuerpos IgE de pacientes que padecen anisakidosis, lo cual indica que esta nueva serpina no presenta propiedades alérgicas/inmunogénicas, una característica muy importante para cualquier compuesto que se desee utilizar como anticoagulante.

Merece destacarse también que la secuencia proteica de AniSerp presenta un grado de identidad relativamente baja (menor del 40%) con otras serpinas, entendiéndose como tal el grado de invariabilidad entre las secuencias de aminoácidos. Así, por ejemplo, en lo que se refiere a serpinas mencionadas en la presente solicitud, los porcentajes de identidad obtenidos con las secuencias proteicas accesibles a través del European Bioinformatic Institute (bases de datos UniProt, aaGeneSeq, Euro Patents, Japan Patents, US Patents y Korea Patents), utilizando el algoritmo FASTA y el programa fasta 3, son: 33,1% con la serpina de *Tachipleus tridentatus* (GenBank D14483); 37,4% con la proteína humana PTI (SPB6_HUMAN, nº acceso: P35237 en UniProtKB); 35,1% con la serpina SRP-2 de *Caenorhabditis elegans* (GenBank AY525079); 30,3% con la serpina de *Brugia malayi* (GenBank U04206).

Por todo lo cual, la invención se refiere, en un primer aspecto, al polipéptido de la invención, es decir, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de AniSerp (bien en su forma madura (SEQ ID NO:3) sin péptido señal, o en la forma inmadura (SEQ ID NO:2) con péptido señal, o un polipéptido que presenta su misma actividad y que guarda un alto porcentaje de identidad (superior al de otras serpinas con actividad anticoagulante conocidas) con AniSerp. Así, la invención se refiere, a un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende:

- a) la secuencia representada por SEQ ID NO:3, o

ES 2 374 054 A1

- b) una secuencia idéntica al menos en un 40% a SEQ ID NO:3 que presenta estructura de serpina y capacidad de inhibir a la trombina humana.

5 Se prefiere que la secuencia de aminoácidos comprenda la secuencia representada por SEQ ID NO:3. También son realizaciones posibles de la invención aquellas en las que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que presenta estructura de serpina con capacidad de inhibir la trombina humana, en la que dicha secuencia es idéntica a SEQ ID NO:3 en un porcentaje que se selecciona del grupo del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5%, y 99,9%.

10 Tal como se ha mencionado, no sólo la forma madura, carente del péptido señal, sino la forma inmadura de AniSerp, que comprende a la forma madura y al péptido señal, está comprendida también dentro del alcance de la invención. Por ello, son también realizaciones posibles del polipéptido de la invención aquellas en la que su secuencia comprende:

- 15 a) la secuencia representada por SEQ ID NO:2, o
- b) una secuencia idéntica al menos en un 40% a SEQ ID NO:2 que presenta estructura de serpina con capacidad de inhibir a la trombina humana.

20 Se prefiere que la secuencia de aminoácidos comprenda la secuencia representada por SEQ ID NO:2. También son realizaciones posibles de la invención aquellas en las que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que presenta estructura de serpina con capacidad de inhibir la trombina humana, en el que dicha secuencia es idéntica a SEQ ID NO:2 en un porcentaje que se selecciona del grupo del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5%, y 99,9%.

30 En otra posible realización de este aspecto de la invención, el polipéptido es una proteína de fusión que comprende, adicionalmente, a la secuencia de AniSerp o de una serpina capaz de inhibir a la trombina humana con un alto grado de identidad con ella, la secuencia de una segunda proteína, de manera que el polipéptido es una proteína de fusión. Esta segunda proteína puede ser, por ejemplo, la glutatión-S-transferasa, como en los Ejemplos de la presente solicitud, u otra proteína cualquiera de interés.

35 AniSerp, como se ha comentado, presenta la particularidad de que su capacidad de inhibir la actividad de la trombina no se ve alterada por la presencia de heparina. Por ello, es una realización compatible con cualquiera de las anteriores aquella en la que el polipéptido de la invención presenta una capacidad de inhibir trombina que no se ve afectada por la presencia de heparina.

40 Igualmente, es una realización compatible con cualquiera de las anteriores aquella en la que el polipéptido, además, presenta capacidad de inhibición de las catepsinas G y L, tal como se describe para AniSerp en los Ejemplos presentados más adelante en la presente solicitud.

45 En un segundo aspecto, la invención se refiere a una molécula de ADN que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la invención, es decir, a una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una serpina con capacidad de inhibir la trombina humana, seleccionada del grupo que consiste en:

- a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica idéntica al menos en un 40% a la secuencia representada por SEQ ID NO:3
- 50 b) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica idéntica al menos en un 40% a la secuencia representada por SEQ ID NO:2;
- c) una molécula de ácido nucleico complementaria a una de las anteriores.

55 Son realizaciones preferidas de dicho aspecto de la invención aquellas en las que la secuencia comprendida en la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia polipeptídica idéntica a la representada por SEQ ID NO:3 o a la representada por SEQ ID NO:2. En este último caso, la molécula de ácido nucleico puede tener la secuencia de la molécula aislada que se describen en los Ejemplos de la presente solicitud, es decir, la secuencia representada por SEQ ID NO:1. También son posibles realizaciones de este aspecto de la invención aquellas en las que la molécula de ácido nucleico comprende un fragmento de secuencia que codifica una secuencia polipeptídica que es idéntica a la representada por SEQ ID NO:2 al menos en un porcentaje que se selecciona del grupo de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5%, 99,9%, prefiriéndose particularmente que los cambios en aminoácidos sean cambios conservativos.

65 Tal como se utiliza en la presente solicitud, se entiende por cambios (sustituciones conservativas) de aminoácidos los cambios en una posición específica de la secuencia polipeptídica que preservan las propiedades físico-químicas del residuo original. Existen diversos algoritmos para valorar esta cuestión pero la manera más general y estricta de

ES 2 374 054 A1

considerar que un cambio es conservativo es considerar que se produce cuando se intercambian aminoácidos con cadenas laterales de similares tamaños y parecida carga o polaridad en condiciones fisiológicas. Así, serían cambios conservativos los cambios entre:

- 5 - ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp) (aminoácidos ácidos, con carga negativa a pH fisiológico);
- glutamina (Gln) y asparagina (Asn) (aminoácidos básicos, con carga positiva a pH fisiológico);
- 10 - valina (Val), leucina (Leu) e isoleucina (Ile): aminoácidos hidrofóbicos de cadena corta; dependiendo de su función estructural específica en el plegamiento de la proteína y el mantenimiento de su estructura, pueden incluirse también en este grupo cisterna (Cys) (si su cambio no da lugar, por ejemplo, a la pérdida de un puente disulfuro), glicina (Gly) (si su pequeño tamaño no es imprescindible para permitir un cambio brusco en la progresión de la estructura secundaria, por ejemplo, sino que es más importante su polaridad) o metionina (Met).
- 15 - serina (Ser) y treonina (Thr), aminoácidos polares a pH fisiológico que presentan un grupo -OH en su cadena lateral.

20 Otro objeto de la invención es un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN de la invención, unida operativamente a una secuencia de control de la expresión. El vector de expresión puede ser, por ejemplo, un plásmido, como en el Ejemplo 2 de la presente solicitud, o un sistema más complejo, como, por ejemplo, un virus recombinante.

25 Un objeto adicional de la invención es una célula hospedadora transformada con un vector de expresión de la invención. La célula hospedadora puede ser, entre otras, una bacteria, una levadura, o una célula derivada de un organismo eucariota superior, tal como una célula humana o derivada de células humanas. En cada uno de los casos, lógicamente, el vector de expresión con el que se haya transformado la célula hospedadora comprenderá como secuencia de control de la expresión unida operativamente a la secuencia que codifica la serpina idéntica o similar a la forma inmadura o madura de AniSerp (SEQ ID NO:2 ó SEQ ID NO:3), una secuencia de control que pueda dar lugar a proteína codificada en dicha célula hospedadora. Así, por ejemplo, si se desea la expresión en una bacteria, la secuencia codificante de la serpina estará unida operativamente a un promotor que permita la expresión en esa bacteria; si se desea la expresión en una célula eucariótica, la secuencia codificante de la serpina estará unida operativamente a, al menos, un promotor que permita la expresión en esa célula. Tal como se utiliza en la presente solicitud, se entiendo por “transformación” cualquier proceso en el que se introduce un ácido nucleico exógeno en una célula.

35 Un objeto más es un método para producir una proteína que comprende las etapas de:

- 40 a) cultivar la célula hospedadora transformada con un vector de expresión de la invención en condiciones que permiten la expresión del polipéptido con actividad de serpina capaz de inhibir la trombina humana codificado en dicho vector de expresión;
- b) purificar el polipéptido sintetizado en la etapa a) de la célula o del medio celular.

45 Otro aspecto adicional de la invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:2 o la secuencia de una serpina capaz de inhibir la trombina humana cuya secuencia de aminoácidos difiere de la secuencia de SEQ ID NO:2 únicamente por sustituciones conservativas de aminoácidos. Por sustituciones conservativas deben entenderse cambios en una posición específica de un aminoácido que preservan las propiedades físico-químicas del residuo original. Sustituciones conservativas típicas son la sustitución de un residuo ácido por otro (cambios entre los ácidos glutámico y aspártico), cambios de un residuo básico por otro (cambios entre glutamina y asparagina), cambios de un residuo apolar por otro (alanina, valina, leucina, isoleucina ...).

55 En un aspecto más, la invención se refiere al uso del polipéptido de la invención como agente anticoagulante. Así, otro aspecto de la invención es el uso del polipéptido de la invención (un polipéptido que comprende la secuencia de una serpina capaz de inhibir la trombina humana con al menos un 40% de identidad con SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID:3) para la preparación de un medicamento. Preferiblemente, el medicamento estará destinado a ser utilizado como anti-coagulante. Se prefiere especialmente que el medicamento esté destinado a pacientes en los que se sospeche que puede haber alguna alteración en proteínas de la cascada de coagulación distintas de la trombina, a pacientes inmunodeprimidos, a pacientes con trastornos hepáticos, a pacientes con coagulopatías de consumo con coagulación intravascular diseminada, a pacientes que presenten estados de hipercoagulabilidad asociados al uso de heparina o a pacientes con déficit de antitrombina III. También se tiene particular preferencia por la administración del medicamento como anti-coagulante durante períodos perioperativos en general como la cirugía cardiopulmonar (con o sin la administración simultánea de heparina), la cirugía traumatológica especialmente en tratamientos de sustitución completa de cadera y rodilla. En otra posible realización del uso de la invención, el polipéptido de la invención puede utilizarse como alternativa a los anticoagulantes convencionales tales como los anticoagulantes cumarínicos, estando destinado a pacientes con patologías como síndrome coronario agudo, fibrilación auricular, embolia pulmonar, enfermedad coronaria crónica, o a enfermos con válvulas cardíacas o vasculares o con prótesis mecánicas o articulares.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Cascada de coagulación. El esquema muestra la secuencia de reacciones entre factores de coagulación que conforman las vías extrínseca (parte izquierda) e intrínseca (parte derecha) de la coagulación y que confluyen en la generación del factor Xa y las etapas comunes subsiguientes (nombres de las proteínas en negrita). Se indican junto a las reacciones factores complementarios (Ca^{2+} : calcio, PL: fosfolípidos ...). También se indican los puntos de acción de proteínas implicadas en el sistema anticoagulante (líneas discontinuas punteadas, terminadas en elipses), así como las reacciones potenciadas por la trombina (líneas discontinuas terminadas en flecha).

Fig. 2: Actividad como inhibidor de AniSerp: El gráfico muestra el efecto del inhibidor recombinante AniSerp (AniSerp-GST: proteína de fusión AniSerp con glutation-S-transferasa) sobre la actividad proteolítica de las enzimas indicadas bajo las parejas de barras (proteasa endógena de *Anisakis simplex*; plasmina humana; trombina humana; catepsina B; Factor Xa; tripsina; catepsina L; catepsina G), representada como % de actividad residual calculado con respecto a la actividad detectada en presencia de la proteína GST sola.

Fig. 3: Efecto del inhibidor recombinante AniSerp-GST sobre la actividad proteolítica de la trombina humana. El gráfico muestra el porcentaje de fluorescencia residual debida al AMC liberado del sustrato Boc-Val-Pro-Arg-AMC por la trombina, en función de la concentración de la proteína de fusión AniSerp-GST presente. Los datos mostrados son la media \pm desviación estándar (S.D.) de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Las barras indican la S.D.

Fig. 4: Modelos estructurales basados en la homología de las formas latente (panel B) y activa (panel C) de AniSerp (no unida a trombina). El panel A muestra el alineamiento de múltiples secuencias entre AniSerp (secuencia encabezada por la palabra "serpin") y los moldes 1DVN_A (forma latente del inhibidor 1 del activador de plasminógeno humano) y 2DUT_D (conformación nativa de la proteína MENT: *Myeloid and Erythroid Nuclear Termination stage-specific*: proteína de terminación nuclear eritroide y mielóide específica de estadio). Los paneles B y C muestran los modelos estructurales de las formas latente (panel B) y activa (panel C) de AniSerp deducidos a partir de los moldes 1DVN_A y 2DUT_D respectivamente, modelos en 3D en los que se indica la posición del bucle del centro reactivo (RCL).

Fig. 5: Modelo de la interacción entre la serpina de *Anisakis simplex* (AniSerp) y la trombina humana:

- El panel A muestra un modelo de tres dimensiones en el que la trombina humana (parte superior del dibujo) aparece unida a la serpina de *Anisakis simplex* (parte inferior del dibujo del panel); se indica la localización del RCL (residuos del bucle catalítico) de la serpina de *Anisakis simplex* en el surco estructural de la trombina. Las zonas de color más oscuro sobre la superficie de la trombina indican zonas de carga electrostática teórica positiva o negativa.

- El panel B: Representación, como modelo de bolas y varillas, de los residuos de la cadena pesada de la trombina humana (leyendas en negrita) que entran en contacto con los aminoácidos Pro365 a Ile372 de AniSerp.

- El panel C: Detalle de la interacción entre AniSerp y los residuos His43 (H43), Asp99 (D99) y Ser205 (S205) de la triada catalítica de la trombina humana.

Fig. 6: Alineamientos de secuencia de la Serpina de *Anisakis simplex* (secuencia encabezada con la leyenda "serpin"), Antitrombina-III humana (secuencia encabezada con la leyenda "1ATH_A") y el cofactor II de la heparina humana (secuencia encabezada con la leyenda "1JMO"). Las esferas oscuras representadas bajo la secuencia 1JMO indican los residuos clave implicados en la unión a la heparina descritos para el cofactor II de la heparina.

Descripción de la invención

Tal como se ha mencionado anteriormente, la invención se refiere a una nueva proteína del nematodo *Anisakis simplex*, que tiene actividad anticoagulante. Concretamente, su actividad se basa en su capacidad para inhibir la trombina humana, de forma dosis dependiente, e independiente de la presencia de heparina. Además, la nueva proteína tiene también capacidad de inhibir, aunque en menor medida, la actividad de otra serina proteasa, la catepsina G, así como la de una cisterna proteasa, la catepsina L. A dicha proteína se alude en la presente solicitud con la abreviatura de AniSerp.

AniSerp es el resultado de un rastreo con anticuerpos de una genoteca de cDNA del nematodo *Anisakis simplex* y de la clonación de un nuevo inhibidor de serina proteasas de entre todos los EST (*Expressed sequence tags*, marcadores de secuencias expresadas) cribados. Dicho cDNA permite la obtención de una proteína de 397 aminoácidos (SEQ ID NO:2), de los cuales los 25 primeros constituyen un péptido señal que parecen conferir a AniSerp una naturaleza secretora, a diferencia de lo que sucede con otras serpinas, como PTI o las serpinas identificadas en *Caenorhabditis elegans*, que parecen ser intracelulares.

AniSerp es estructuralmente una serpina, pues presenta el ensamblaje tridimensional clásico de esta familia de inhibidores, que es necesario para ejercer su mecanismo de acción. AniSerp tiene una conformación compuesta por nueve hélices α y tres hojas β , con un hipotético centro reactivo (RCL: *reactive centre loop*) de 27 residuos aminoácidos (347-GSEAAAATGLFMVFRSSRPMPVTPPIR-373), que queda expuesto en su forma activa. Esto la convierte

en el primer inhibidor tipo serpina de nematodos parásitos que presenta capacidad anticoagulante, por lo que no era obvio esperar que un nematodo, *Anisakis simplex*, produjera una proteína con actividad anticoagulante que tuviera actividad de inhibidor de serina proteasas y que perteneciera a la familia de las serpinas. Tal como se ha comentado previamente, se habían caracterizado anteriormente en otros nematodos inhibidores de serina proteasas pertenecientes a otras familias, tales como las esmapinas, que presentan actividad anticoagulante. Así, por ejemplo, las esmapinas NAP5, NAP6 y NAP2 de *Ancylostoma ceylanicum*, que son responsables de las propiedades anticoagulantes de este parásito intestinal hematófago, causante de graves anemias. Cada una de estas esmapinas afecta a un tipo diferente de serina proteasa de la coagulación de la sangre, pero ninguna inhibe directamente a la trombina (Capello *et al.*, 1995, Stassens *et al.*, 1996), como lo hace AniSerp. Además, tanto la secuencia de aminoácidos como la estructura de estos inhibidores es diferente de la de AniSerp.

En lo que se refiere a las serpinas identificadas en nematodos de vida libre como *Caenorhabditis elegans*, presentan bastantes diferencias con AniSerp. Por una parte, como se ha comentado, parece tratarse de proteínas intracelulares, que carecen de péptido señal, mientras que la forma madura de AniSerp parece ser extracelular. Además, las serpinas de *Caenorhabditis elegans* constituyen por sí mismas un clade específico dentro de la familia, el clade L, aunque se parecen fundamentalmente al clade B de serpinas intracelulares, mientras que AniSerp presenta mayor similitud con las serpinas del clade C1, donde se encuentra clasificada la antitrombina III humana. Aunque una de las serpinas de *Caenorhabditis elegans*, SRP-2, parece ser también una serpina de clase cruzada, inhibe a proteínas de naturaleza diferente de las que se ven afectadas por AniSerp: la granzima B como serina proteasa y, en menor medida, la cathepsina V como cisterna proteasa. Además, considerando la estructura de su sitio catalítico, es improbable que SRP-2 presente actividad antitrombina, una de las características principales de AniSerp.

En cuanto a otras serpinas que ya se conocían que presentan actividad anticoagulante y que, concretamente, son capaces de inhibir la trombina, se han identificado a partir de organismos evolutivamente bastante distantes de los nematodos, como son los propios seres humanos, el cangrejo *Tachipleus tridentatus* o el virus mixoma. La identidad de la secuencia de cualquiera de estas serpinas con AniSerp no alcanza, en ninguno de los casos, el 40%. Además, sus propiedades son, en general, diferentes de las de AniSerp, bien por inhibir la trombina, por ejemplo, al mismo tiempo que algún otro factor de coagulación (Xa en el caso de las serpinas de PTI o el virus mixoma) o bien por inhibir otras serina proteasas tales como plasmina y tripsina (caso de la serpina de *Tachipleus tridentatus*). Todo ello es una indicación de que no era obvio pensar que podía existir una serpina capaz de inhibir la trombina de forma independiente de la presencia de heparina, que pudiera identificarse en *Anisakis simplex*, pues ni su estructura ni sus propiedades parecían esperables a partir de los conocimientos previos existentes.

La capacidad de inhibición de la trombina humana por parte de AniSerp, como se ha comentado, es dependiente de la dosis. Según los ensayos descritos más adelante en los Ejemplos de la presente solicitud, presenta una concentración inhibitoria 50 (CI50) de 36,68 $\mu\text{g/ml}$, y un mecanismo de inhibición que se mantiene, como mínimo, hasta 24 horas. Las evidencias apuntan a que la inhibición es irreversible. Además, esta actividad probablemente podría explicar en parte la acción anticoagulante *in vitro* sobre plasma humano que se ha descrito para los extractos crudos y excretos-secretos de *Anisakis simplex* (Perteguer *et al.*, 1996).

Por otra parte, los estudios de dinámica molecular que se describen más adelante en la presente memoria mostraron que AniSerp parece inhibir la trombina mediante un mecanismo similar al del sustrato suicida, parecido al mecanismo que muestran los inhibidores de la coagulación en mamíferos como la antitrombina III (AT) (el inhibidor natural de la trombina) y el cofactor II de la heparina (HCII). Así, AniSerp presenta una estructura terciaria similar a la que exhiben estos inhibidores humanos de serina proteasas, que pueden considerarse los principales reguladores de la coagulación sanguínea.

La especificidad de ambos factores de control de la coagulación, sin embargo, no es la misma: la AT humana se une tanto al factor Xa como a la trombina y es capaz de inhibir ambas, mientras que el HCII inhibe selectivamente a la trombina, no afectando la actividad del factor Xa. Se ha descrito que las diferentes especificidades de la AT, que es capaz de inhibir trombina y Xa, en comparación con HCII, que sólo inhibe la trombina, parecen ser debidas a cambios de aminoácidos en el P1 y los residuos inmediatamente adyacentes localizados dentro de la secuencia de reconocimiento del RCL de la enzima. La AT con una Arg en P1 es un inhibidor de las proteasas específicas de Arg, trombina y Xa, mientras que HCII proporciona un inhibidor específico de trombina a pesar de tener un P1 desfavorable, con Leu. (Gettins & Olson, 2009).

AniSerp, por su parte, inhibe selectivamente a la trombina, sin afectar a la actividad del factor Xa, tal como sucede con el HCII. Estas características podrían explicarse por el hecho de que aunque AniSerp presenta una Arg (R) en posición P1, como lo hace la AT, también muestra más de diez cambios en los residuos adyacentes del RCL. Además, 8 de estos residuos diferentes entre la AT y AniSerp se mantienen con respecto al HCII, que al igual que AniSerp inhibe selectivamente la trombina pero no el factor Xa.

También, una de las características interesantes de AniSerp es que la actividad de la molécula no se ve afectada por la presencia de heparina. En esto difiere tanto de la AT como del HCII, en los que la heparina actúa potenciando la propiedad anticoagulante de ambos inhibidores. Dicha cualidad se explica por la ausencia de residuos cargados positivamente en los sitios potenciales de unión a heparina en AniSerp. El hecho de tener una molécula anticoagulante cuya acción no se ve potenciada por heparina permite la aplicación terapéutica de AniSerp en procesos tales como estados de hipercoagulabilidad asociados al uso de heparina, como en el déficit adquirido de AT, que se produce

muchas veces en el contexto de la terapia con heparina. Así, en los pacientes a los que se les administra heparina en el período preoperatorio (por ejemplo en intervenciones de bypass cardiopulmonar), se observa que un porcentaje de ellos presentan un déficit significativo de AT y necesitan reposición del producto previo a la realización de la intervención, bien en forma de plasma fresco congelado, bien como concentrado de AT. Por consiguiente, AniSerp se podría aplicar, en general, a casos en los que la AT está reducida, tanto en los preoperatorios antes mencionados, como en enfermedad hepática, en coagulopatías de consumo con coagulación intravascular diseminada y hemorragias masivas. El uso de AniSerp no produciría consumo y después déficit de AT como produce la heparina. También podría utilizarse en casos de trombosis relacionada con la trombopenia asociada a la heparina, cuando se precise de un nuevo tratamiento con anticoagulantes. Y en general, AniSerp se podría aplicar en cualquier caso en que se necesite anticoagulación, evitando los efectos secundarios que conllevan la administración de heparina o los asociados a la inhibición de la vitamina K y/o a la depleción de factores de coagulación dependientes de la misma.

Hay que comentar que AniSerp es también capaz de inhibir, aunque con menor actividad y de manera reversible, a las catepsinas G y L. Esta función requiere dosis mayores de AniSerp que la utilizada para conseguir la actividad anticoagulante. La catepsina L es una cisterna proteasa mientras que la catepsina G es una serina proteasa. El hecho de que AniSerp sea capaz de inhibir tanto a serina como a cisterna proteasa la convierte en lo que se denomina serpina de clase cruzada (*cross-class serpins*). Ejemplo de ellas serían el antígeno 1 del carcinoma de células escamosas.

Por último, debe comentarse que se ha comprobado el reconocimiento de anticuerpos IgE de pacientes afectados de anisakidosis frente a AniSerp, observándose que no existían IgE específicas frente a AniSerp en ninguno de ellos. Estos resultados, realizados en individuos con probabilidades de haber desarrollado esos anticuerpos, por estar teóricamente expuestos a la proteína, parecen indicar que la administración de AniSerp no daría lugar a reacciones alérgicas/inmunogénicas adversas. Los estudios preliminares realizados inmunizando conejos con adyuvantes muy potentes dan lugar a títulos bajos de anticuerpos, lo que apoya aún más el escaso potencial inmunogénico de AniSerp y su seguridad en su posible administración a seres humanos.

Así, AniSerp es el primer inhibidor de serina proteasas perteneciente a la familia de las serpinas descrito para el nematodo *Anisakis simplex*. Además, es el primer informe de una serpina de nematodo que inhibe específicamente la trombina, cuya actividad no es modificada por la heparina. El hecho de que AniSerp inhiba la trombina independientemente de la heparina le confiere gran utilidad como anticoagulante. También, su selectividad por la trombina hace de ella un miembro de la nueva clase de agentes antitrombóticos sobre los que hay gran interés, los inhibidores selectivos de factores de coagulación específicos. Comparados con los fármacos convencionales, tienen el potencial de ser más eficaces, seguros y fáciles de usar (Bauer, 2008). La utilidad de AniSerp viene apoyada por los buenos resultados obtenidos al evaluar las propiedades anticoagulantes de otra proteína recombinante anticoagulante diferente de nematodos, NAPc2, que han sido evaluadas para la prevención del tromboembolismo venoso postoperatorio, en pacientes sometidos a artroplastia selectiva de la rodilla (Lee *et al.*, 2001). Es más, los estudios clínicos con intervalos de dosis terapéuticas, a continuación de administraciones subcutáneas repetidas, también muestran una respuesta inmune baja a NAPc2, infrecuente y no robusta que fuerza a continuar con dichos estudios (Vlasuk *et al.*, 2003). El hecho de que AniSerp parezca no ser reconocida tampoco por los sueros de pacientes que padecen anisakidosis es también un punto de interés, pues es otra prueba de la seguridad que ofrecería su uso. Así, parece que AniSerp podría ser un nuevo fármaco anticoagulante alternativo, con propiedades que hacen interesante su uso en aplicaciones específicas, particularmente, como se ha comentado, en los casos en los que se haya producido o se quiera evitar la aparición de un déficit adquirido de antitrombina III.

La invención se explicará ahora con más detalle por medio de los Ejemplos y Figuras que aparecen a continuación.

Ejemplos

- Ejemplo 1

Clonación de AniSerp

El gen AniSerp se clonó en dos etapas, i) En una primera etapa se obtuvo el gen incompleto y, posteriormente, ii) se aisló el gen completo.

i) El gen incompleto se obtuvo al realizar un cribado de una genoteca de expresión del nematodo *Anisakis simplex* con anticuerpos monoclonales, en el que AniSerp fue un clon irrelevante (no reactivo) para los objetivos del inmunocribado realizado.

Brevemente:

- A partir de larvas 3 (L3) del nematodo *Anisakis simplex* extraídas manualmente de bacaladillas (*Micromesistius poutassou*), se sintetizaron ARN mensajeros (ARNm) utilizando el kit comercial "Fast Track mRNA isolation kit" (Invitrogen).

- Utilizando como molde 5 μ g de los ARN mensajeros, se sintetizó una colección de ADN complementarios (ADNc) utilizando el kit comercial "ZAP-cDNA synthesis kit" (Stratagene), que posteriormente fueron ligados en el vector de expresión λ -ZAP usando el kit comercial para la construcción de genotecas de ADNc en fagos λ escindibles

ES 2 374 054 A1

“Uni-ZAP XR library kit”, siguiendo las instrucciones de la casa comercial Stratagene. El título final de la genoteca de expresión, una vez amplificada, fue de 1.3×10^{10} ufp/ml (unidades formadoras de placa) con un 1% de fagos no recombinantes.

5 - Se realizó un cribado con anticuerpos de la genoteca de expresión. Los fagos se adsorbieron sobre filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) impregnados en 10 mM *isopropyl thio- β -D-galactoside* (IPTG). Tras realizar una fase de bloqueo con TBS (tampón Tris pH 7,4 con 3% de albúmina sérica bovina (BSA)) una hora a 37°C, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales a la dilución adecuada en el tampón TBS, durante toda la noche a 4°C. Tras la adición de los anticuerpos secundarios correspondientes se visualizaron los inmunocomplejos
10 usando como sustrato NBT (*nitro-blue tetrazolium salt*: sal de nitroazul de tetrazolio) y BCIP (sal de 5 bromo-4-cloro-3-indolil fosfato de p-toluidina) (Sigma). A partir de los clones de λ -ZAP se obtuvieron los fagémidos mediante escisión “*in vivo*”, utilizando un fago de rescate “helper” (Short *et al.*, 1988).

15 - La secuencia del ADN de uno de los clones (clon irrelevante para los objetivos del inmunocribado realizado, que expresó una proteína recombinante no reconocida por el monoclonal que se utilizó en su aislamiento) mostró similitud (2. 2e-36) en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con serpinas (NA: Q608754 Serine Protease Inhibitor 3), si bien el gen se hallaba incompleto (clon 3A22). El fragmento del gen constaba de 1005 nucleótidos con una secuencia deducida de 334 aminoácidos (aa), faltándole el extremo 5' de la molécula.

20 ii) *Obtención del gen completo*

La información de la secuencia del gen incompleto permitió la síntesis de cebadores para aislar el gen completo a partir de una colección de ADNc con adaptadores de secuencia conocida en sus extremos 5' y 3'.

25 Brevemente

- A partir del ARNm obtenido de L3 de *Anisakis simplex*, se sintetizó una colección de ADNc a cuyos extremos se ligó un adaptador de secuencia conocida (AP1). Para la reacción se utilizó el kit comercial “Marathon cDNA amplification” (Clontech), que incluye el adaptador AP1.

- Obtención del gen completo, a partir de la colección de ADNc anteriormente sintetizados:

35 ■ Amplificación rápida del extremo 5' del clon 3A22 (RACE-PCR): Se utilizaron los siguientes cebadores:
Cebador directo AP1 (5' CTAATACGACTCACTATAGGGC 3': SEQ ID NO:4), cebador correspondiente al adaptador AP1 creado en el extremo 5' de los ADNc sintetizados.

40 Cebador reverso SR1 (5' ACCCGCAGTAGTTTTATCCATTTGTTTCG 3': SEQ ID NO:5), diseñado a partir de la secuencia obtenida del clon 3A22 que solamente abarcaba el extremo 3' del gen (nucleótidos de la posición 160 a 186 en la secuencia nucleotídica del gen completo, como se comprobó posteriormente).

45 ■ Amplificación por PCR de la secuencia completa codificante: Se diseñaron dos cebadores para la clonación del gen completo, un cebador directo SER5' (5' ATGATGACAGCATTACCGTTTTTAAC 3': SEQ ID NO:6), con el codón de inicio ATG y parte de la nueva secuencia 5' del gen y un cebador reverso SER3' (5' TCAGTGGAAACGACCAATAAACAGAATGCG 3': SEQ ID NO:7) con el codón de terminación TGA y parte de la secuencia 3'. Como resultado se obtuvo un ADNc completo de 1194 nucleótidos (397 aa), representada por la secuencia de SEQ ID NO:1, correspondiente a la serpina de *Anisakis simplex*.

50 - Ejemplo 2

Subclonación, expresión y purificación de AniSerp

55 Una vez clonado el gen, la primera etapa para iniciar la caracterización de AniSerp fue la subclonación del ADNc en un vector de expresión para después inducir su expresión, seguida de la purificación de la proteína recombinante. El análisis de la secuencia con el programa SignalP 3.0 Server (Bendtsen *et al.*, 2004) mostró que la molécula contenía un posible péptido señal (Met1-Gly25).

60 i) *Subclonación*

Se diseñaron dos cebadores con los sitios de restricción SmaI y NotI para facilitar la posterior subclonación del ADNc de AniSerp en el vector de expresión pGEX-4T2 (Amersham). Además para hacer posible su expresión, se escindió la secuencia correspondiente al péptido señal, empleando el cebador directo 5'-SER-SPS (5' CCCGGGATG CAGCAGACAATCGATGAT 3') (SEQ ID NO:8). Como cebador reverso se utilizó 3'-SER-SPS (5' GCGGCCGCT CAGTGGAAACGACCAATAA 3') (SEQ ID NO:9) que incluyó el codón de terminación TGA. Así, se obtiene un ADNc de 1119 nucleótidos (372 aa más codón de parada), correspondiente a la serpina de *Anisakis simplex* (AniSerp).

ES 2 374 054 A1

Como molde para la PCR se utilizó una dilución 1/100 del gen completo de la serpina de *Anisakis simplex* previamente clonado.

Tras purificar los productos de amplificación de AniSerp, estos y el vector comercial pGEX-4T2 (Amersham Biosciences) fueron digeridos con las enzimas de restricción SmaI y NotI. Se ligó el gen de AniSerp (sin el péptido señal) al vector pGEX-4T2, previamente desfosforilado, con la enzima T4 ligasa (Promega) durante toda la noche a 16°C. Con el plásmido recombinante producido se transformaron células competentes XLIBLue [recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr))] (Stratagene) de *Escherichia coli* siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Se realizó una selección de los recombinantes positivos por PCR usando los cebadores 5'-SER-SPS y 3'-SER-SPS y como molde el ADN de las colonias crecidas. A partir de cultivos, en LB-ampicilina, de los recombinantes positivos se extrajo el ADN plasmídico con el kit comercial QIAGEN. Tras confirmar por secuenciación la correcta subclonación, con el plásmido recombinante producido se transformaron células competentes BL21 [F-, ompT, hsdS (rb-, mb-), gal] (Amersham Biosciences) de *Escherichia coli* mediante choque térmico siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial.

ii) Expresión de la proteína recombinante

La expresión de la proteína recombinante se indujo de acuerdo a diferentes protocolos con el fin de obtener proteínas de fusión solubles y con plegamiento similar al nativo, de forma que se pudieran llevar a cabo ensayos enzimáticos con el producto de expresión purificado. Se ensayaron varios protocolos de expresión, en los que se combinaban distintas temperaturas de incubación con diferentes concentraciones de inductor, IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido, de SIGMA) y diversos tiempos de incubación. Los protocolos testados fueron los siguientes.

- T^a incubación= 37°C, IPTG= 1 mM, Tiempo=4 horas.
- T^a incubación= 37°C, IPTG= 0,5 mM, Tiempo=4 horas.
- T^a incubación= 37°C, IPTG= 0,1 mM, Tiempo=4 horas.
- T^a incubación= 37°C, IPTG= 0,01 mM, Tiempo=4 horas.
- T^a incubación= 16°C, IPTG= 1 mM, Tiempo=24 horas.
- T^a incubación= 16°C, IPTG= 0,5 mM, Tiempo=24 horas.
- T^a incubación= 16°C, IPTG= 0,1 mM, Tiempo=24 horas.
- T^a incubación= 16°C, IPTG= 0,01 mM, Tiempo=24 horas.

El protocolo con T^a incubación=16°C, IPTG= 0,01 mM, Tiempo=24 horas, proporcionó la proteína de fusión AniSerp como un producto soluble. La proteína recombinante AniSerp, sin el péptido señal, tenía un marco abierto de lectura de 1119 nucleótidos, que codificaban 372 residuos aminoacídicos, a los que hay que sumar los aminoácidos de la molécula de GST (glutación-S-transferasa).

iii) Purificación de la proteína recombinante (AniSerp)

Una vez obtenida la proteína de fusión AniSerp en su forma soluble, se purificó mediante cromatografía de afinidad al glutatión empleando perlas de glutatión-Sefarosa (Amersham Biosciences), seguida de elución utilizando un tampón de elución con glutatión 10 mM (Amersham Biosciences). Esta cromatografía se basa en el hecho de que las proteínas de fusión a GST facilitan la purificación de los recombinantes gracias a la alta afinidad de la GST por la molécula de glutatión. A través de este proceso se logró purificar la proteína recombinante en un estado similar a la molécula nativa. Después, la AniSerp recombinante purificada se dializó y posteriormente se determinó la concentración de proteína mediante el kit de ensayo de proteínas de BCA (Pierce, Smith *et al.*, 1985), usando albúmina sérica bovina como patrón.

60 - Ejemplo 3

Ensayos inhibitorios

Una vez purificada la proteína recombinante en su supuesta forma activa, se llevó a cabo el análisis de la secuencia mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con el fin de seleccionar las posibles dianas a estudiar. Las comparaciones con la base de datos mostraron similitudes con diferentes inhibidores de serina proteasas descritas en otros organismos. Los mayores valores de similitud se encontraron con el inhibidor de la serina proteasa, similar al del clade B, de *Bos taurus* (XP001254097, valor E < 6,10⁻⁶⁰), la serpina 3b de ratón (*Mus musculus*, AAR89288, valor

E < 4,10⁻⁵⁹) y la proteína 1 relacionada con el antígeno 2 de carcinoma de células escamosas, también de ratón (*Mus musculus*, AAN62872, valor E < 1,10⁻⁵⁸), con un 37,2% de identidad con la primera y 36,7% con las dos últimas, respectivamente, cuando la comparación se hace con el péptido señal, siendo aún menor la identidad (36,1% con cualquiera de las tres proteínas citadas) cuando la comparación se hace sin el péptido señal. Como se ve, tanto en el caso de la proteína madura como en el caso de la forma inmadura, no se encuentra ninguna secuencia con una identidad con AniSerp que llegue al 40%). El valor E, que mide la Habilidad del porcentaje de similitud encontrado, siendo éste más fiable cuanto menor sea el valor de E, es en todos los casos bastante bajo.

Debido a esta variabilidad, se decidió llevar a cabo los ensayos de actividad de inhibición de las siguientes serina-proteasas: tripsina, plasmina, y trombina. Puesto que se encontraron coincidencias con una similitud significativa con el antígeno 2 de carcinoma de células escamosa y las proteínas relacionadas, y estas serpinas son serpinas de clase cruzada capaces de inhibir tanto cisterna proteasas como serina proteasas (Sakata *et al.*, 2004), también se ensayó la inhibición de la actividad de las cisterna proteasas cathepsina B y L y de la serina proteasa cathepsina G, cuya inhibición de la actividad ha sido descrita para la serpina de clase cruzada 3b. Finalmente, se comprobó también la actividad inhibitoria utilizando un sustrato que es hidrolizado específicamente por una serina proteasa de *Anisakis simplex* descrita por Morris & Sakanary (1994) (SIGMA Aldrich).

Así, se estableció la actividad inhibitoria de AniSerp sobre ocho proteasas (plasmina, factor Xa, trombina, tripsina, cathepsina B, cathepsina L, cathepsina G y la actividad serina proteasa de *Anisakis simplex*) midiendo la actividad proteolítica residual después de la incubación de cada una de estas enzimas con AniSerp recombinante purificada (serpina recombinante de *Anisakis simplex* más GST). Los sustratos utilizados para los ensayos enzimáticos de tripsina, plasmina, trombina, factor Xa y cathepsina B, L, y cathepsina G fueron Boc-Gln-Ala-Arg-AMC en Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 1 mM; Boc-Val-Leu-Lys-AMC en Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM; Boc-Val-Pro-Arg-AMC en Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM; Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC en Tris-HCl 50 mM pH 8,3, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,2 mM y Z-Arg-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC en Citrato sódico 50 mM pH 5,5, EDTA 5 mM, DTT 20 mM, BSA al 0,005% y N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA en Tris-HCl 50 mM pH 7,5 respectivamente. También se realizaron ensayos con el sustrato NCBZ-Gly-Pro-Arg-AMC en Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con NaCl 20 mM que es específicamente hidrolizado por la serina proteasa de *Anisakis simplex* descrita por Morris & Sakanary (1994), utilizando un extracto crudo del nematodo como fuente de la enzima. Todos los sustratos se adquirieron a SIGMA Aldrich. Los ensayos se llevaron a cabo con la incubación previa de AniSerp con cada enzima durante 10 min a 37°C, en su tampón de reacción previamente indicado. La concentración óptima de cada enzima utilizada se determinó con anterioridad mediante estudio de cinética enzimática seleccionando aquella concentración que mostraba una relación lineal con el tiempo de reacción (30 min). Después de la adición de sustrato 100 µM a la mezcla de reacción, se midió la actividad residual de la enzima mediante monitorización continua empleando, para los sustratos fluorescentes (con AMC), longitudes de onda de excitación y emisión de 380 y 460 nm respectivamente, en un lector de fluorescencia de microplacas Victor 3, 1420 de Perkin Elmer y para el sustrato cromogénico (pNA) una longitud de onda de 405 nm en un lector de absorbancia de microplacas ELX 800TM de Biotek. Como control se utilizó la proteína glutatión transferasa (GST). Los ensayos fueron realizados por triplicado y bajo condiciones en las que el tiempo de incubación y la concentración de enzima guardaron una relación lineal con la actividad.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 2. Dicha Fig. 2 muestra que AniSerp fue capaz de inhibir sólo la trombina y las cathepsina L y G a una concentración de 500 µg/ml; Las otras proteasas no fueron inhibidas por AniSerp. Merece destacarse que, mientras que la trombina fue completamente inhibida a esta concentración, el porcentaje de inhibición de cathepsinas fue significativamente menor, 36% para la cathepsina L y 58% para la cathepsina G. Estos últimos resultados están en consonancia con la hipotética naturaleza de serpina de clase cruzada de AniSerp.

Además, debe resaltarse que sólo la inhibición de la trombina humana se mantuvo en el tiempo y fue dependiente de dosis, mostrando una CI₅₀ de 36,68 µg/ml, y observándose una inhibición de más del 90% con 200 µg/ml (Fig. 3).

- Ejemplo 4

Modelado estructural y de la interacción con trombina

Una vez demostrada la actividad antitrombina, se decidió llevar a cabo un análisis “*in silico*” de la molécula de AniSerp con el fin de definir su posible modelo estructural y su interacción con la trombina humana, puesto que, en general, las serpinas son una superfamilia de proteínas caracterizadas por plegarse en una estructura conservada y por emplear un mecanismo inhibitorio único similar al de los sustratos suicidas. Con el fin de obtener una representación fiable de las supuestas interacciones entre AniSerp y la trombina humana, se generaron tres modelos diferentes en 3D basados en la homología, correspondientes a los tres estadios diferentes de la serpina: inactivo o latente, activo o nativo, y unido a trombina. Los modelos estructurales en tres dimensiones de AniSerp se ensamblaron utilizando procedimientos de modelado por homología basados en las estructuras del Banco de Datos de Proteínas, seleccionadas en base a la similitud superior de secuencias, cobertura y compatibilidad de secuencia respecto a la estructura.

Para generar los dos primeros modelos (inactivo o latente y activo o nativo), se aplicó una estrategia mixta basada en búsqueda de moldes por secuencia y por secuencia frente a estructura, utilizando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997) y el servidor de engarzado (reconocimiento de plegamiento) Phyre (Bennett-Lovsey *et al.*, 2008) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>).

Los moldes seleccionados fueron dos serpinas diferentes, una en estado latente y otra en estado nativo, ambas con un alto grado de similitud (valor $E < 10^{-38}$) con respecto a la búsqueda original (secuencia de AniSerp). Los moldes seleccionados fueron concretamente: 1DVN (forma latente del inhibidor I del activador del plasminógeno humano; Stout *et al.*, 2000) y 2DUT (conformación nativa de MENT: *Myeloid and Erythroid Nuclear Termination stage-specific protein*, McGowan *et al.*, 2006).

Una vez que se seleccionaron los moldes, se utilizaron procedimientos normalizados de modelado para generar los modelos finales en 3D. Dichos modelos se construyeron utilizando las herramientas del servidor SWISS-MODEL (Guex *et al.*, 1999; Peitsch, 1996; Schwede *et al.*, 2003) en <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>, y su calidad estructural se comprobó empleando los programas de análisis proporcionados por el mismo servidor (Anolea/Gromos/Verify3D). Para optimizar las geometrías, se buscó la minimización de la energía en los modelos utilizando el campo de fuerza de GROMOS 43B1 implementado en DeepView (Guex & Peitsch, 1997), utilizando 500 pasos de la minimización descendente con mayor pendiente, seguidos de 500 pasos de minimización de gradiente-conjugado.

Los modelos finales en 3D se muestran en la Fig. 4. El modelo de AniSerp latente mostró todas las características descritas de las serpinas clásicas de mamíferos, con la presencia de una lámina β antiparalela de seis hebras, en las que la hebra central contiene varios residuos del bucle central reactivo (RCL). Esta observación está en consonancia con el hecho descrito por Zang & Maizels (2001), quienes comunicaron que, aunque las serpinas de nematodos tienen una baja similitud en la secuencia primaria global con respecto a las serpinas de especies de mamíferos, son capaces de adquirir una estructura terciaria común altamente ordenada que consiste en nueve hélices α y tres láminas β , que permiten que el inhibidor interaccione específicamente con la enzima. La comparación de los modelos de la forma latente y activa y, particularmente, de la posición del bucle del centro reactivo (RCL) en cada una de ellas, muestra la gran reorganización estructural, asociada al cambio conformacional de la proteína, que se produce al pasar de una a otra forma.

Para conseguir un modelo del complejo propuesto de AniSerp y trombina humana, se aplicó una estrategia similar a la anterior, basada en búsqueda de moldes por secuencia y por secuencia frente a estructura, utilizando el algoritmo Blast y el servidor de engarzado (reconocimiento de plegamiento) Phyre. De esta manera, se seleccionó el molde de trombina 1JMO (Baglin *et al.*, 2002), obtenido de la estructura cristalina del complejo trombina-co factor II de la heparina humana, que incluye una forma inactiva de la trombina humana y el cofactor II de la heparina humana (HCII), una proteína con un alto grado de similitud de secuencia (valor $E < 10^{-33}$) con AniSerp. Además, previamente a la dinámica molecular y, con el fin de obtener un modelo más realista, también se remodeló la estructura de la trombina humana incluida en el archivo tipo PDB 1JMO, colocando un residuo de serina (Ser205) en el centro activo, en la posición catalítica, en lugar de la alanina (Ala205) mutada que aparece en la forma inactiva cristalizada de la trombina humana. El modelo global inicial de interacción obtenido se muestra en la Fig. 5A, en la que se puede ver cómo el RCL expuesto de AniSerp interacciona con la trombina humana.

Finalmente, para obtener un modelo de alta calidad para el contacto propuesto entre la trombina humana y AniSerp, la estructura resultante de los procedimientos de modelado por homología se sometió a una etapa corta, de 2 nanosegundos, de simulación de dinámica molecular normalizada utilizando el módulo PMEMD del paquete AMBER9 (Case *et al.*, 2005) y el juego de parámetros parm99 de esta distribución. El objetivo de esta etapa es ayudar a que los aminoácidos de las cadenas laterales, así como el esqueleto del RCL, encuentren una conformación estable de baja energía. La estructura minimizada fue útil para analizar la naturaleza de los contactos específicos entre ambas proteínas. La Fig. 5B muestra el surco del sustrato trombina (que implica a los aminoácidos de AniSerp Met358 a Phe374). La Fig. 5C incluye los contactos con el centro activo, que implican a la tríada catalítica de la trombina His43, Asp99 y Ser205, y los residuos de AniSerp Arg361 (P1) y Ser362 (P1').

Como la antitrombina humana (AT) inhibe la actividad coagulatoria de las serina proteasas trombina y factor Xa, también se ensayó el efecto de AniSerp sobre la actividad del factor Xa y no se encontró efecto alguno (Fig. 2-Factor Xa).

- Ejemplo 5

55 *Ensayo del efecto de la heparina*

Está bien documentado que la actividad de inhibidores tales como AT y HCII se ve potenciada en gran medida por la heparina, así que se decidió ensayar el efecto de la heparina sobre la actividad de AniSerp.

El ensayo se llevó a cabo en 200 μ l de NaCl 0,15 mM, HEPES 0,02 mM, 1 mg/ml de polietilenglicol (Mr = 8.000), y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), pH 7,4. Las mezclas de la reacción de inhibición contenían 0,1 μ g/ml-100 μ g/ml de heparina y 30 μ g/ml de serpina. La reacción se inició añadiendo trombina 5 nM. Después de 5 minutos de incubación, se añadieron 50 μ l de una solución que contenía Boc-Val-Pro-Arg-AMC 100 μ M y 1,5 mg/ml de Polybrene. La actividad residual de la trombina se determinó midiendo la hidrólisis del sustrato fluorescente en un lector de fluorescencia de microplacas (Víctor 3, 1420 de Perkin Elmer).

La heparina (0,1 a 100 μ g/ml) no tuvo ningún efecto sobre la actividad de AniSerp aunque incrementó la actividad inhibitoria de la AT de control.

Con el fin de estudiar el diferente comportamiento de AniSerp, se investigaron los residuos de AniSerp que pudieran ser sitios hipotéticos de unión de heparina mediante el alineamiento de la secuencia con los residuos de los sitios de unión de AT y HCII, con heparina que han sido previamente descritos (Baglin *et al.*, 2002). Adicionalmente para comparar la posición en 3D de los sitios de unión de heparina, se llevó a cabo el alineamiento estructural entre el modelo de AniSerp obtenido tras los procedimientos de dinámica molecular y las estructuras del Banco de Datos de Proteínas 1JMO (HCII humana; Baglin *et al.*, 2002) y 1ATH (antitrombina-III humana; Schreuder *et al.*, 1994) utilizando el programa Dali (Holm *et al.*, 2008). Los trazados de la estructura se generaron utilizando PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA).

La Fig. 6 muestra la secuencia y el alineamiento estructural de las tres proteínas. Ninguno de los seis residuos críticos (marcados como esferas en la Fig. 6) e implicados en la unión de la heparina al HCII (Lys173, Arg184, Lys185, Arg189, Arg192, y Arg193) están presentes en la secuencia de AniSerp, y sólo se reconoce una sustitución conservativa en la posición 192 (Arg/Lys). Esta carencia de conservación de residuos críticos puede explicar los resultados obtenidos cuando la actividad de inhibición de AniSerp se ensayó en presencia de heparina.

Referencias bibliográficas

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.

Ahrens I, Lip GY, Peter K (2010) New oral anticoagulant drugs in cardiovascular disease. *Thromb Haemost.* 104.1: 1-12.

Audicana MT, Kennedy MW (2008) *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin Microbiol Rev* 21:360-379.

Baglin TP, Carrell RW, Church FC, Esmon CT, Huntington JA (2002) Crystal structures of native and thrombin-complexed heparin cofactor II reveal a multistep allosteric mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11079-11084.

Bauer KA. New anticoagulants (2008) *Curr Opin Hematol* 15: 509-515.

Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340:783-795.

Bennett-Lovsey RM, Herbert AD, Sternberg MJ, Kelley LA (2008) Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins* 70: 611-625.

Bier JW (1988) Anisakiasis. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Vol I. Bacterial, Mycotic and Parasitic Diseases. (Edited by Balows A., Hausler, W. J. Jr, Ohashi M., Turano A.), pp. 768-774. Springer, New York.

Cappello M, Vlasuk GP, Bergum PW, Huang S, Hotez PJ. (1995) *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide: a hookworm-derived inhibitor of human coagulation factor Xa. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6152-6156.

Case DA, Cheatham TE 3rd, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM Jr, Onufriev A, Simmerling C, Wang B, Woods RJ (2005) The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* 26: 1668-1.

Coughlin P, Sun J, Cerruti L, Salem HH, Bird P (1993) Cloning and molecular characterization of a human intracellular serine proteinase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9417-9421.

Geraci JR, St Aubin DJ (1987) Effects of parasites on marine mammals. *Int J Parasitol* 17: 407-414.

Gettins PG, Olson ST (2009) Exosite determinants of serpin specificity. *J Biol Chem* 284:20441-20445.

Guex N, Diemand A, Peitsch MC (1999) Protein modelling for all. *Trends Biochem Sci* 24: 364-367.

Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.

Holm L, Kaariainen S, Rosenstrom P, Schenkel A. (2008) Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics* 24:2780-2781.

Ishikura H, Kikuchi K, Nagasawa K, Ooiwa T, Takamiya H, Sato N, Sugane K (1993) Anisakidae and anisakidosis. *Prog Clin Parasitol* 3: 43-102.

Kobayashi Y, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K (2008) Ani s 1, the major allergen of *Anisakis simplex*: purification by affinity chromatography and functional expression in *Escherichia coli*. *Parasitol Int* 57: 314-319.

- Kobayashi Y, Ishizaki S, Shimakura K, Nagashima Y, Shiomi K (2007)** Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*. *Parasitol Res* 100: 1233-1241.
- Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC. (2006)** An overview of the serpin superfamily *Genome Biol* 7: 216.
- Lee A, Agnelli G, Büller H, Ginsberg J, Heit J, Rote W, Vlasuk G, Costantini L, Julian J, Comp P, van Der Meer J, Piovella F, Raskob G, Gent M. (2001)** Dose-response study of recombinant factor VIIa/tissue factor inhibitor recombinant nematode anticoagulant protein c2 in prevention of postoperative venous thromboembolism in patients undergoing total knee replacement. *Circulation* 104: 74-78.
- McGowan S, Buckle AM, Irving JA, Ong PC, Bashtannyk-Puhlovich TA, Kan WT, Henderson KN, Bulynko YA, Popova EY, Smith AI, Bottomley SP, Rossjohn J, Grigoryev SA, Pike RN, Whisstock JC (2006)** X-ray crystal structure of MENT: evidence for functional loop-sheet polymers in chromatin condensation. *EMBO J* 25: 3144-3155.
- Miura Y, Kawabata S, Iwanaga S (1994)** A *Limulus* intracellular coagulation inhibitor with characteristics of the serpin superfamily. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J Biol Chem* 269:542-547.
- Morgenstern KA, Sprecher C, Holth L, Foster D, Grant FJ, Ching A, Kisiel W (1994)** Complementary DNA cloning and kinetic characterization of a novel intracellular serine proteinase inhibitor: mechanism of action with trypsin and factor Xa as model proteinases. *Biochemistry* 33:3432-3441.
- Morris SR, Sakanari JA (1994)** Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode *Anisakis simplex*. *J Biol Chem* 269: 27650-27656.
- Nash P, Whitty A, Handwerker J, Macen J, McFadden G (1998)** Inhibitory specificity of the anti-inflammatory myxoma virus serpin, SERP-1. *J Biol Chem* 273:20982-20991.
- Nguyen TT, Qasim MA, Morris S, Lu CC, Hill D, Laskowski M Jr, Sakanari JA (1999)** Expression and characterization of elastase inhibitors from the ascarid nematodes *Anisakis simplex* and *Ascaris suum*. *Mol Biochem Parasitol* 102: 79-89
- Pak SC, Kumar V, Tsu C, Luke CJ, Askew YS, Askew DJ, Mills DR, Brömme D, Silverman GA (2004)** SRP-2 is a cross-class inhibitor that participates in postembryonic development of the nematode *Caenorhabditis elegans*: initial characterization of the clade L serpins. *J Biol Chem* 279:15448-15459.
- Peitsch MC (1996)** ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans* 24: 274-279.
- Perteguer MJ, Raposo R, Cuéllar C (1996)** *In vitro* study on the effect of larval excretory/secretory products and crude extracts from *Anisakis simplex* on blood coagulation. *Int J Parasitol* 26: 105-108.
- Sakata Y, Arima K, Takai T, Sakurai W, Masumoto K, Yuyama N, Suminami Y, Kishi F, Yamashita T, Kato T, Ogawa H, Fujimoto K, Matsuo Y, Sugita Y, Izuhara Kt (2004)** The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1. *J Biol Chem* 279: 5081-5087.
- Short JM, Fernández JM, Sorge JA, Huse WD (1988)** λ -ZAP: a bacteriophage expression vector with *in-vivo* excision properties. *Nucleic Acid Res* 16: 7583-7600.
- Schreuder HA, de Boer B, Dijkema R, Mulders J, Theunissen HJ, Grootenhuis PD, Hol WG (1994)** The intact and cleaved human antithrombin III complex as a model for serpin-proteinase interactions. *Nat Struct Biol* 1: 48-54.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003)** SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31: 3381-3385.
- Silverman GA, Lomas DA (2004)** Serpin identification, production, and characterization. *Methods* 32: 71-72.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985)** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
- Stassens P, Bergum PW, Gansemans Y, Jespers L, Laroche Y, Huang S, Maki S, Messens J, Lauwereys M, Cappello M, Hotez PJ, Lasters I, Vlasuk GP (1996)** Anticoagulant repertoire of the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2149-2154.
- Stout TJ, Graham H, Buckley DI, Matthews DJ (2000)** Structures of active and latent PAI-1: a possible stabilizing role for chloride ions. *Biochemistry* 39: 8460-8469.

ES 2 374 054 A1

Ufer M. (2010) Comparative efficacy and safety of the novel oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban and apixaban in preclinical and clinical development. *Thromb Haemost* 103:572-585.

5 **Vlasuk GP, Bradbury A, López-Kininger L, Colón S, Bergum PW, Maki S, Rote WE** (2003) Pharmacokinetics and anticoagulant properties of the factor VIIa-tissue factor inhibitor recombinant Nematode Anticoagulant Protein c2 following subcutaneous administration in man. Dependence on the stoichiometric binding to circulating factor X. *Thromb Haemost* 90: 803-812.

10 **Zang X, Maizels RM** (2001) Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. *Trends Biochem Sci* 26:191-197.

Zang X, Yazdanbakhsh M, Jiang H, Kanost MR, Maizels RM (1999) A novel serpin expressed by blood-borne micro filariae of the parasitic nematode *Brugia malayi* inhibits human neutrophil serine proteinases *Blood* 94:1418-1428.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende:

- a) la secuencia representada por SEQ ID NO:3, o
- b) una secuencia idéntica al menos en un 40% a SEQ ID NO:3 que presenta estructura de serpina con capacidad de inhibir a la trombina humana, o
- c) la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:2, o
- d) una secuencia idéntica al menos en un 40% a SEQ ID NO:2, que presenta estructura de serpina con capacidad de inhibir a la trombina humana.

2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:3.

3. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta estructura de serpina con capacidad de inhibir a la trombina humana, en el que dicha secuencia es idéntica a SEQ ID NO:3 en un porcentaje que se selecciona del grupo del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5% y 99,9%.

4. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:2.

5. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta estructura de serpina con capacidad de inhibir a la trombina humana, en el que dicha secuencia es idéntica a SEQ ID NO:2 en un porcentaje que se selecciona del grupo del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5% y 99,9%.

6. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una proteína de fusión que comprende la secuencia de una segunda proteína.

7. Polipéptido según la reivindicación 6, en el que la segunda proteína es la glutatión-S-transferasa.

8. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuya capacidad de inhibición de la trombina humana no se ve afectada por la presencia de heparina.

9. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que presenta también capacidad de inhibir las catepsinas G y L.

10. Una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una serpina con capacidad de inhibir la trombina humana seleccionada del grupo que consiste en:

- a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica idéntica al menos en un 40% a la secuencia representada por SEQ ID NO:3
- b) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica idéntica al menos en un 40% a la secuencia representada por SEQ ID NO:2;
- c) una molécula de ácido nucleico complementaria a una de las anteriores.

11. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 10, que comprende una secuencia que codifica una secuencia polipeptídica idéntica a la representada por SEQ ID NO:3.

12. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 10, que comprende una secuencia que codifica una secuencia polipeptídica idéntica a la representada por SEQ ID NO:2.

13. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12, que comprende la secuencia representada por SEQ ID NO: 1.

14. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 10, que comprende un fragmento de secuencia que codifica una secuencia polipeptídica que es idéntica a la representada por SEQ ID NO:2 al menos en un porcentaje que se selecciona del grupo de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5% y 99,9%.

15. Un vector de expresión que comprende la secuencia de ADN correspondiente a la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 unida operativamente a una secuencia de control de la expresión.

ES 2 374 054 A1

16. Una célula hospedadora transformada con un vector de expresión de la reivindicación 15.

17. Célula hospedadora según la reivindicación 16, que es una bacteria, una levadura, o una célula eucariótica.

5 18. Un método para producir una proteína que comprende las etapas de:

a) cultivar la célula hospedadora transformada con un vector de expresión de la reivindicación 15 que permite la expresión del polipéptido con capacidad de inhibir la trombina humana codificado en dicho vector de expresión;

10

b) purificar el polipéptido sintetizado en la etapa a) de la célula o del medio celular.

19. Uso de un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la preparación de un medicamento.

15

20. Uso según la reivindicación 19, en el que el medicamento está destinado a ser utilizado como anticoagulante.

21. Uso según la reivindicación 20, en el que el medicamento está destinado a pacientes en los que se sospeche que puede haber alguna alteración en proteínas de la cascada de coagulación distintas de la trombina, a pacientes inmunodeprimidos, a pacientes con trastornos hepáticos, a pacientes con coagulopatías de consumo con coagulación intravascular diseminada, a pacientes que presenten estados de hipercoagulabilidad asociados al uso de heparina o a pacientes con déficit de antitrombina III.

20

22. Uso según la reivindicación 20, en el que el medicamento está destinado a ser administrado como anticoagulante durante períodos perioperatorios.

25

23. Uso según la reivindicación 22, en el que el medicamento está destinado a ser administrado durante el período perioperatorio de la cirugía cardiopulmonar, y de la cirugía traumatológica.

24. Uso según la reivindicación 23, en el que el medicamento está destinado a ser administrado durante el período perioperatorio de la cirugía traumatológica en tratamientos de sustitución completa de cadera y rodilla.

30

25. Uso según la reivindicación 19, en el que el medicamento está destinado a pacientes con síndrome coronario agudo, fibrilación auricular, enfermedad coronaria crónica, prótesis mecánicas o articulares y válvulas cardíacas o vasculares.

35

26. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, en el que el medicamento está destinado a ser administrado sin la administración simultánea de heparina.

40

45

50

55

60

65

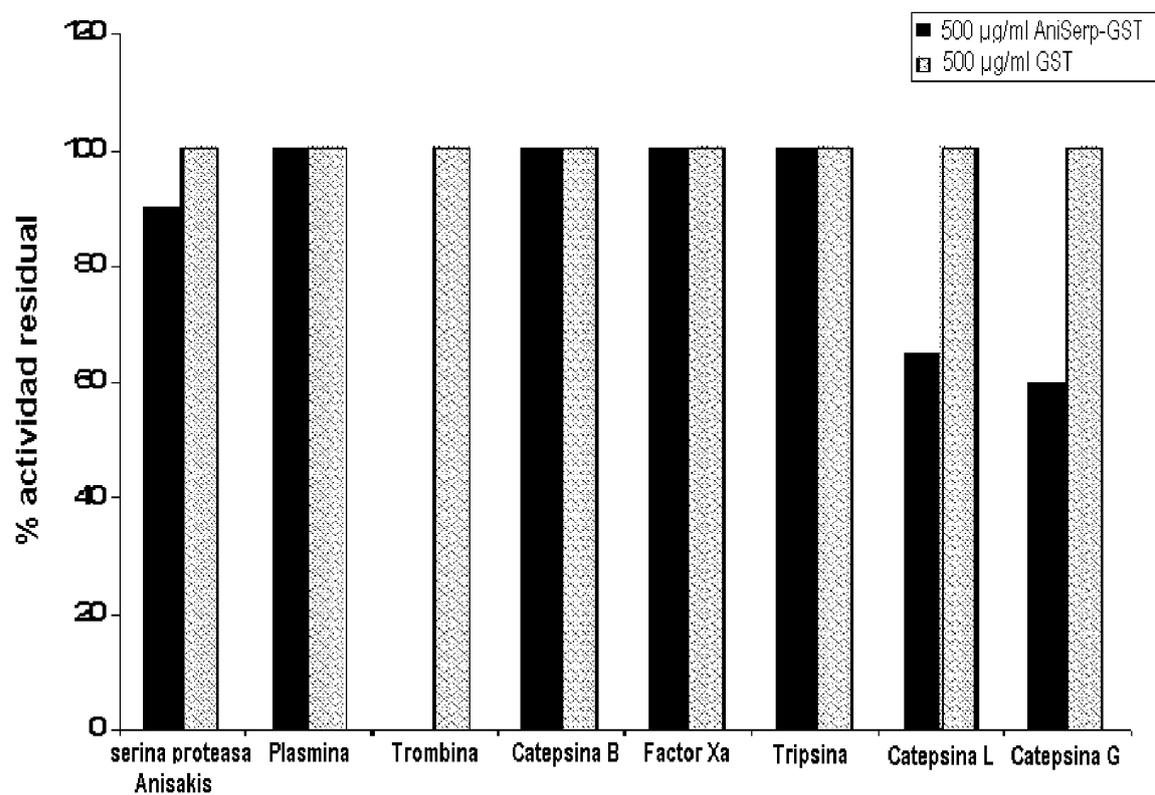


Fig. 2

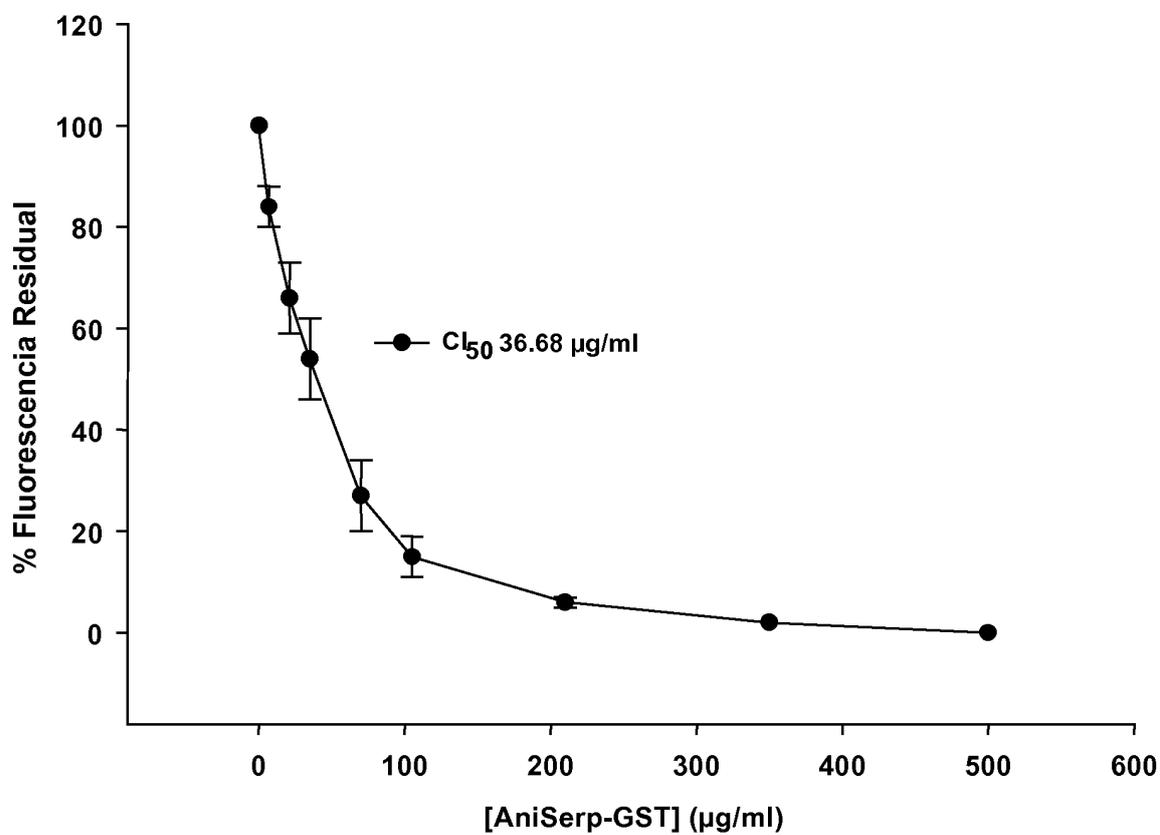


Fig. 3

A

```

serpin MMTALPFLTLGLHFLLMGVIIVQGGQQTEDDAQAFAMNLEASG--PQTFVLEPPSSIALKLVVACIDENKTDGNTLAKGVNNSALIDYESSAAEQMDKTTAG 108
1DVN_A -----VHHPPSYVAHLASDFGVRDFQOVAQASKRPMVDFEPYGVAEVLAQLQTTGGETQQQIQAAAGFKID-IRGMAPALRHYKELMGFVWK 86
2DUT_D -----MEQVSASIGHFTVDFLNKLNENRDKDFEPEUSIHEALALTYLAKGSTARHAEVLEHF-----IHSCKEELTAFNKEPNN 76

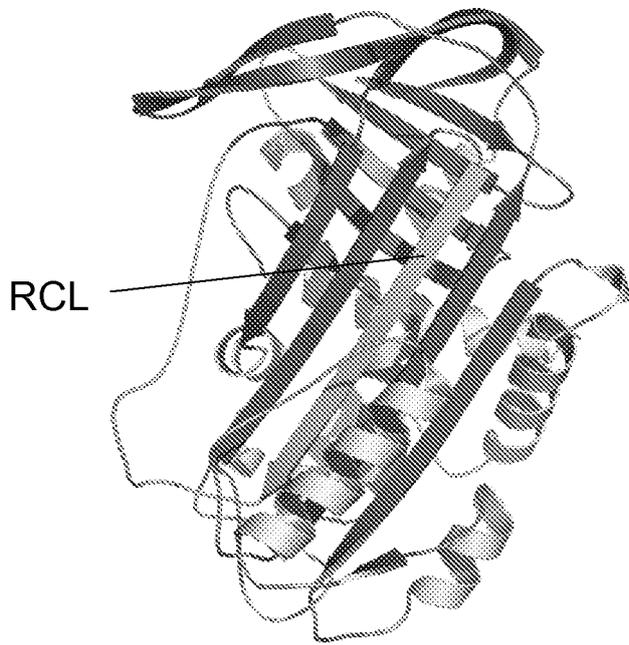
serpin FQSNVANKVYIQDKFELKSPENIIOKTAASEIGCVDFAA-NRETAELINAVVEKTKNSPRINLQPMQESACTANALIMATYFZGDMKTKNAEETTKKMFHAFENSDR 217
1DVN_A DEESTTALFVGRDLKLVQGMPHFFRLPESTVGVDFESE-VLRAPFIINDVYTHTEKMSNLGGKGAADQLTRVLAVALYFMQOKRFPDSETHRRLFKKSDGQTV 197
2DUT_D YSLPFRNRITFKTYALLPTYLQLSKKYFLAEPKLVNFKTAPKQSRKEINTVYKQESKKIKMLSSDDYKATITHEILVQAIYVFAEWEVVKFOAKTSIQFRL-FKSK 187

serpin EVDNHAIYSCKSYAETE----DVQVLELPYKDPETTFVWFLFETRFGRQFEKSNMGKKIMQLMNG-CHPENKIIIVLEPKFKLGGQLENKVLKELGTFEAFDAEKAN 320
1DVN_A SVPNHAQINKNYIEFTTPDGHYDIEELPYHGDLEHFLAARYKEVPSALTNIESAGLEEH-WKQ-NHTLPRLEVLPKPSLETEVDLRKPLEHCHTEHFRFOAK 305
2DUT_D PPKHHYMRDTPVLI MEKM---NFKKIKLPIVKRELEDFELLEDS--TGSEQLEREETVYRLESEWADSKNMTETLVDQHLKKSLEDRIDLEDTETFNKHTTAF-TNAG 291

serpin FDFIKKNDSEVFDVWVHMANVEYNEEGTAAATGLFMVFRSSRPMPTVFPIRPIADHPIITVVS--QNRLEFGREH 397
1DVN_A FTSLSDQEPHSAQALGVKTEVMESGTVASST----AVI--VSARMAPEEIIIMDFPELVVRRNPTGTFVNG-- 375
2DUT_D FRKHTS---EATEKVIKDSFNAVDEKGTLLAAT----AVIISFTTISVHVLKRVDFEYHFFIRHNSKKTILETFGRG 362
    
```

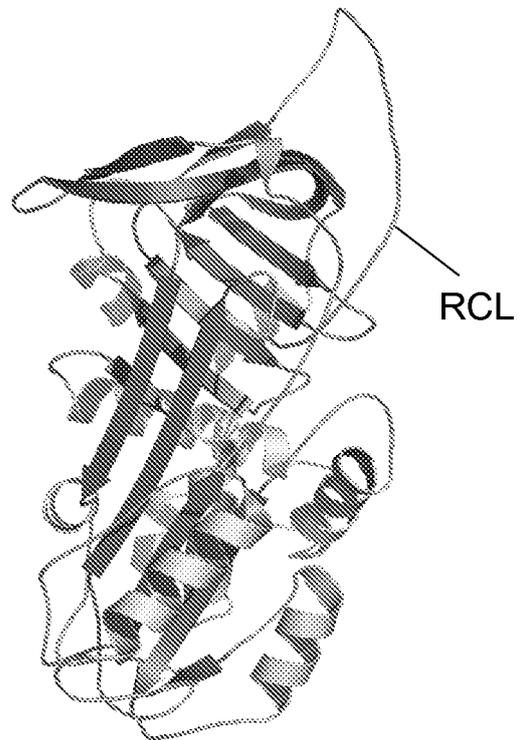


B



LATENTE. Molde: 1DVN

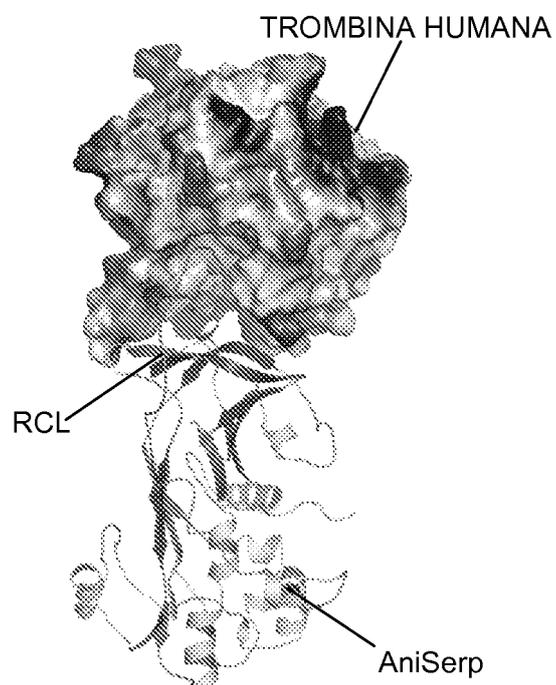
C



ACTIVA. Molde: 2DUT

Fig. 4

A



B

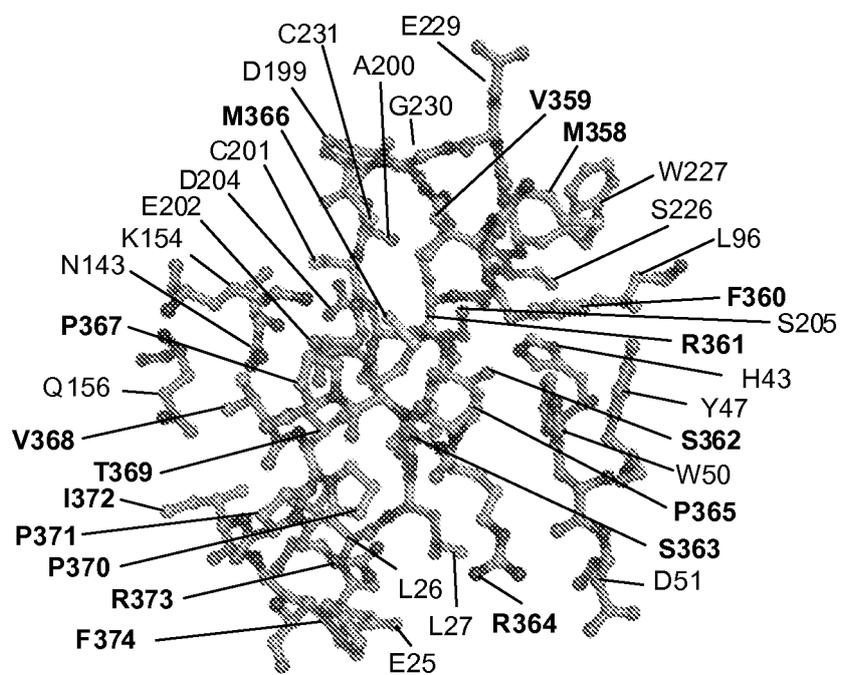


Fig. 5

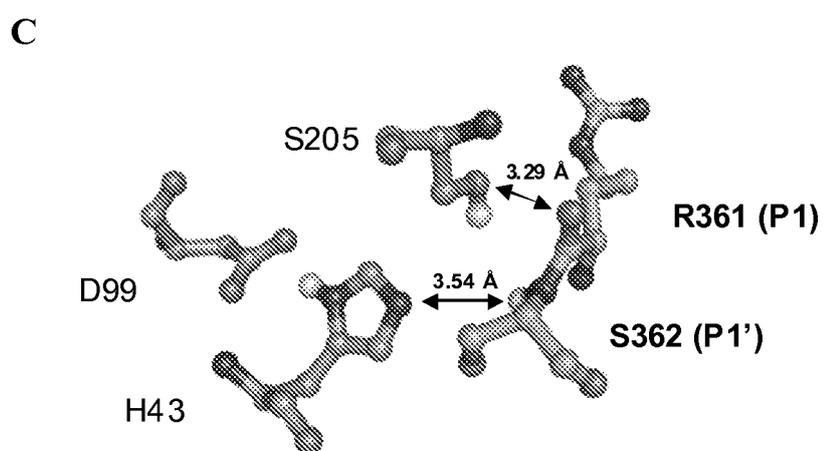


Fig. 5 (cont.)

A

serpin	MNTALPFLTLLGHEFLLMGCVIVVQSGQTEEDVACDPAWMLLEASG---PQCTQFVDEEYFS	57
1ATH_A	-----SEVWELKVAHNRKATTFKRLAARPNININILKSLK	82
1JMO	-----KIQREKILNKAEPFLKRVLRDGVNIFNIFLAEVGG	138
serpin	ESIKLAEVYAGALGQIKTQIGNTIA-KGVIND--SA-----LIDYESSA--AEQMDKTT	106
1ATH_A	ESYTFARTYELGACNDLQGLKHEVFK-SFYIIEYTD-----QINKEFAMLNQWLYPSAA	135
1JMO	ESTACRISLGLRKEITHEQVMSLHPKLFVNA--SENYEITTIHNLKRL--THPLFEP	194
serpin	ASPQNTANENYIIDRFEILKSEVNIQKFASTIQCVSFAARRETEL-IMAEVFEKTN	165
1ATH_A	KNSKLVANPLFGUKLTPNKEIQDDEELVPCAKLQPLDEKENACQRAAINTKYSKTE	195
1JMO	FQYTLQVNDLQIQKQPIILLDETEVREYFRLAQILAEKSDPAFISKY--KNSHMLK	252
serpin	SPINLQVQMLSAQYAAALINATYPRGPNTEFNAESITRENPAFENSIPREVDMAIT	225
1ATH_A	SRITFVISEKAEKDELTVIVVNTIYKGLKSKSEKSFENIPKELKRAKQKCSASNNYQK	255
1JMO	GLYFALEN--EAFATQAMELSCVYFSGSIVYKKEPVENKHNENRNLNPEVVVYVSHLYK	310
serpin	SGFSKAEET-K-DVQULELQVYKDPETTFNYVFEETERFQERQFEEKNGEKINGLMNGCMPK	283
1ATH_A	SPFPRRRVAK--DTQVLELQVYKDPETTFNYVFEETERFQERQFEEKNGEKINGLMNGCMPK	313
1JMO	QNELAANDQQLCCELLQEVVSGIS-NLDVDEHKMSKTKLEAGLTPVYKKEKQESNTYK	369
serpin	NKIKVELPFFKLSQLPKNNVLEELGERRAFRAENANFDGIE--KMSGLVYSEVY-KRAN	340
1ATH_A	NMLKVVHHPFFKLSQLPKNNVLEELGERRAFRAENANFDGIE--KMSGLVYSEVY-KRAN	372
1JMO	YREML-LRFEELKNNYNEVSLKLNQERMLYS-KNGCHAGES-----QRIAIKLEKNGT	423
	P1, P1'	
serpin	QENSRKQKAAKSGPRVVFSSSNPSEPPPIKLAQHPFSTI--VSCAPVYK	395
1ATH_A	EYVNEEGTQATTYVITVGFHPLSTQ-----VRETVVDFPFLSLYVHPTECLLPNGK	425
1JMO	LENNRQKAAKSNANVIAQKSLANRST-----KMSRREKVVYKRVFLKTLKNG	473

B

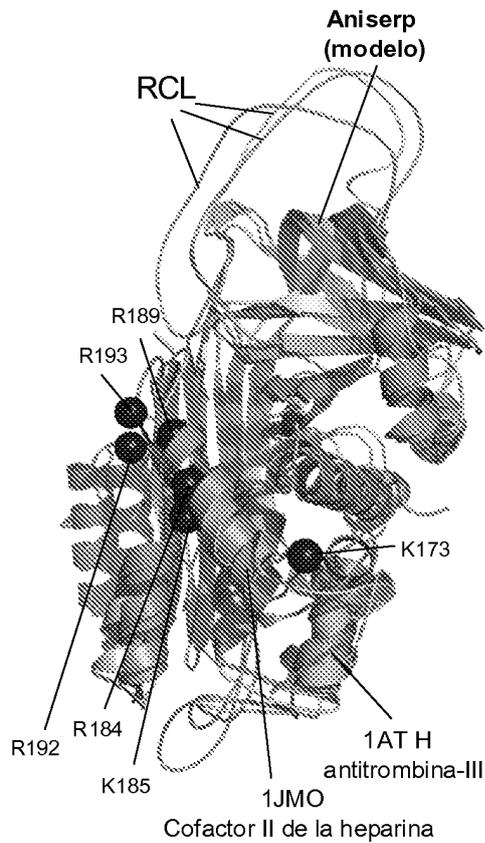


Fig. 6

ES 2 374 054 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUTO DE SALUD CARLOS III;
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA CARACAS

5

<120> NUEVO INHIBIDOR DE SERINA PROTEASA Y SU USO

<130> P-100994

10

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

15

<210> 1
<211> 1194
<212> DNA

20

<213> *Anisakis simplex*

<220>
<221> CDS

25

<222> (1)..(1191)
<223> Secuencia codificante de AniSerp, inhibidor de serina proteasa

<220>
<221> sig peptide

30

<222> (1)..(25)
<223> Péptido señal

35

<400> 1

	atg atg aca gca tta ccg ttt tta acg ctt ctg ggt atg ttc ttg ctg	48
	Met Met Thr Ala Leu Pro Phe Leu Thr Leu Leu Gly Met Phe Leu Leu	
40	1 5 10 15	
	atg gaa ggt gtc atc gtc gta caa ggt cag cag aca atc gat gat gcc	96
	Met Glu Gly Val Ile Val Val Gln Gly Gln Gln Thr Ile Asp Asp Ala	
	20 25 30	
45	caa gct gat ttt gca tgg aat tta ctt gaa gca agt gga ccc caa acc	144
	Gln Ala Asp Phe Ala Trp Asn Leu Leu Glu Ala Ser Gly Pro Gln Thr	
	35 40 45	
50	caa ttc ata gtg ctc tct cca ttc tca ata tca atc gca ctg gcg atg	192
	Gln Phe Ile Val Leu Ser Pro Phe Ser Ile Ser Ile Ala Leu Ala Met	
	50 55 60	
55	gtc tac gct ggt gct gaa gga aac aca aaa aca caa atc ggc aat acg	240
	Val Tyr Ala Gly Ala Glu Gly Asn Thr Lys Thr Gln Ile Gly Asn Thr	
	65 70 75 80	
60	att gcg aaa ggt gtt aac aat gat agt gcg ctg att gat tat ttt tcg	288
	Ile Ala Lys Gly Val Asn Asn Asp Ser Ala Leu Ile Asp Tyr Phe Ser	
	85 90 95	
	tca gct gcc gaa caa atg gat aaa acc act gcg ggt ttc caa ctg aat	336
	Ser Ala Ala Glu Gln Met Asp Lys Thr Thr Ala Gly Phe Gln Leu Asn	
	100 105 110	
65	acg gcg aat aaa gtt tac att caa gat aaa ttc gag att ctc aaa agc	384
	Thr Ala Asn Lys Val Tyr Ile Gln Asp Lys Phe Glu Ile Leu Lys Ser	

ES 2 374 054 A1

	115	120	125	
5	ttc gag aat atc att aag caa aaa ttc gca agt gaa ata caa cag gtg Phe Glu Asn Ile Ile Lys Gln Lys Phe Ala Ser Glu Ile Gln Gln Val 130 135 140			432
10	gat ttc gct gca aac aga gaa aca gca gag tta atc aat gca tgg gtt Asp Phe Ala Ala Asn Arg Glu Thr Ala Glu Leu Ile Asn Ala Trp Val 145 150 155 160			480
15	gag aag aaa acg aat tca cgc atc aga aat tta gtg cag cca caa atg Glu Lys Lys Thr Asn Ser Arg Ile Arg Asn Leu Val Gln Pro Gln Met 165 170 175			528
20	tta agc gct caa acc gct atg gca ctt atc aat gcg ata tat ttc aaa Leu Ser Ala Gln Thr Ala Met Ala Leu Ile Asn Ala Ile Tyr Phe Lys 180 185 190			576
25	ggt gat tgg aaa act aaa ttc aat gcg gaa tca acc acc aag aaa atg Gly Asp Trp Lys Thr Lys Phe Asn Ala Glu Ser Thr Thr Lys Lys Met 195 200 205			624
30	ttc cat gct ttc gaa aac tca gat cga gag gtt gat atg atg gca att Phe His Ala Phe Glu Asn Ser Asp Arg Glu Val Asp Met Met Ala Ile 210 215 220			672
35	acg agt ggt ttc tcg tat gct gag act gag gat gtg caa gtg ctt gag Thr Ser Gly Phe Ser Tyr Ala Glu Thr Glu Asp Val Gln Val Leu Glu 225 230 235 240			720
40	cta ccg tat aaa gat cct gaa acg ttc atg tac gtt ttc cta cct act Leu Pro Tyr Lys Asp Pro Glu Thr Phe Met Tyr Val Phe Leu Pro Thr 245 250 255			768
45	gaa cgt ttc gga ctg agg caa ttc gag aag tcg atg aac ggc gag aaa Glu Arg Phe Gly Leu Arg Gln Phe Glu Lys Ser Met Asn Gly Glu Lys 260 265 270			816
50	atc atg cag ttg atg aac gga tgc atg cca agg aat aaa att atc gtt Ile Met Gln Leu Met Asn Gly Cys Met Pro Arg Asn Lys Ile Ile Val 275 280 285			864
55	gaa tta cca aaa ttc aag ttg gac ggt caa ttg aga cta aat aaa gtt Glu Leu Pro Lys Phe Lys Leu Asp Gly Gln Leu Arg Leu Asn Lys Val 290 295 300			912
60	ctg gaa gaa ctg ggc att cgt gat gca ttc gat gcc gaa aaa gcg aac Leu Glu Glu Leu Gly Ile Arg Asp Ala Phe Asp Ala Glu Lys Ala Asn 305 310 315 320			960
65	ttc gat ggt atc agc aag aac gat tcg ttg gta gtg agt gat gtc gta Phe Asp Gly Ile Ser Lys Asn Asp Ser Leu Val Val Ser Asp Val Val 325 330 335			1008
70	cac aaa gcc aat gtt gag gtg aac gaa gaa ggc agt gaa gca gca gct His Lys Ala Asn Val Glu Val Asn Glu Glu Gly Ser Glu Ala Ala Ala 340 345 350			1056
75	gct aca ggt cta ttt atg gta ttc cgc tcc agt cgt ccg atg ccg gtg Ala Thr Gly Leu Phe Met Val Phe Arg Ser Ser Arg Pro Met Pro Val			1104

ES 2 374 054 A1

	355	360	365	
5	aca cca ccg ata aga ttc	ata gct gat cat ccg ttc	ata ttt acg atc	1152
	Thr Pro Pro Ile Arg Phe	Ile Ala Asp His Pro Phe	Ile Phe Thr Ile	
	370	375	380	
10	gtc agt cag aat cgc att	ctg ttt att ggt cgt ttc	cac tga	1194
	Val Ser Gln Asn Arg Ile	Leu Phe Ile Gly Arg Phe	His	
	385	390	395	
	<210> 2			
15	<211> 397			
	<212> PRT			
	<213> <i>Anisakis simplex</i>			
20	<400> 2			
	Met Met Thr Ala Leu Pro	Phe Leu Thr Leu Leu Gly	Met Phe Leu Leu	
	1	5	10	15
25	Met Glu Gly Val Ile Val	Val Val Gln Gly Gln Gln	Thr Ile Asp Asp Ala	
	20	25	30	
	Gln Ala Asp Phe Ala Trp	Asn Leu Leu Glu Ala Ser	Gly Pro Gln Thr	
	35	40	45	
30	Gln Phe Ile Val Leu Ser	Pro Phe Ser Ile Ser Ile	Ala Leu Ala Met	
	50	55	60	
35	Val Tyr Ala Gly Ala Glu	Gly Asn Thr Lys Thr Gln	Ile Gly Asn Thr	
	65	70	75	80
	Ile Ala Lys Gly Val Asn	Asn Asp Ser Ala Leu Ile	Asp Tyr Phe Ser	
	85	90	95	
40	Ser Ala Ala Glu Gln Met	Asp Lys Thr Thr Ala Gly	Phe Gln Leu Asn	
	100	105	110	
45	Thr Ala Asn Lys Val Tyr	Ile Gln Asp Lys Phe Glu	Ile Leu Lys Ser	
	115	120	125	
	Phe Glu Asn Ile Ile Lys	Gln Lys Phe Ala Ser Glu	Ile Gln Gln Val	
	130	135	140	
50	Asp Phe Ala Ala Asn Arg	Glu Thr Ala Glu Leu Ile	Asn Ala Trp Val	
	145	150	155	160
55	Glu Lys Lys Thr Asn Ser	Arg Ile Arg Asn Leu Val	Gln Pro Gln Met	
	165	170	175	
	Leu Ser Ala Gln Thr Ala	Met Ala Leu Ile Asn Ala	Ile Tyr Phe Lys	
	180	185	190	
60	Gly Asp Trp Lys Thr Lys	Phe Asn Ala Glu Ser Thr	Thr Lys Lys Met	
	195	200	205	
65	Phe His Ala Phe Glu Asn	Ser Asp Arg Glu Val Asp	Met Met Ala Ile	
	210	215	220	
	Thr Ser Gly Phe Ser Tyr	Ala Glu Thr Glu Asp Val	Gln Val Leu Glu	

ES 2 374 054 A1

	225	230	235	240
5	Leu Pro Tyr Lys Asp 245	Pro Glu Thr Phe 250	Met Tyr Val Phe 255	Leu Pro Thr 255
	Glu Arg Phe Gly 260	Leu Arg Gln Phe 265	Glu Lys Ser Met 270	Asn Gly Glu Lys 270
10	Ile Met Gln 275	Leu Met Asn 280	Gly Cys Met 285	Pro Arg Asn Lys 285
15	Glu Leu Pro Lys 290	Phe Lys Leu 295	Asp Gly Gln 300	Leu Arg Leu Asn 300
	Leu Glu Glu Leu 305	Gly Ile Arg 310	Asp Ala Phe 315	Ala Glu Lys Ala 320
20	Phe Asp Gly Ile 325	Ser Lys Asn 330	Asp Ser Leu 335	Val Val Ser Asp 335
25	His Lys Ala 340	Asn Val Glu 345	Val Asn Glu 350	Glu Gly Ser Glu 350
	Ala Thr Gly Leu 355	Phe Met Val 360	Phe Arg Ser 365	Ser Arg Pro Met 365
30	Thr Pro Pro 370	Ile Arg Phe 375	Ile Ala Asp 380	His Pro Phe 380
35	Val Ser Gln 385	Asn Arg Ile 390	Leu Phe Ile 395	Gly Arg Phe His 395
	<210> 3			
	<211> 372			
40	<212> PRT			
	<213> <i>Anisakis simplex</i>			
	<220>			
45	<221> mat_peptide			
	<222> (1)..(372)			
	<223> Forma madura de AniSerp			
50	<400> 3			
	Gln Gln Thr Ile 1	Asp Asp Ala Gln 5	Ala Ala Asp Phe 10	Ala Trp Asn Leu 15
55	Glu Ala Ser Gly 20	Pro Gln Thr Gln 25	Phe Ile Val Leu 30	Ser Pro Phe Ser 30
60	Ile Ser Ile Ala 35	Leu Ala Met Val 40	Tyr Ala Gly Ala 45	Glu Gly Asn Thr 45
	Lys Thr Gln Ile 50	Gly Asn Thr Ile 55	Ala Lys Gly Val 60	Asn Asn Asp Ser 60
65	Ala Leu Ile Asp 65	Tyr Phe Ser Ser 70	Ala Ala Glu Gln 75	Met Asp Lys Thr 80

ES 2 374 054 A1

	Thr	Ala	Gly	Phe	Gln	Leu	Asn	Thr	Ala	Asn	Lys	Val	Tyr	Ile	Gln	Asp
					85					90					95	
5	Lys	Phe	Glu	Ile	Leu	Lys	Ser	Phe	Glu	Asn	Ile	Ile	Lys	Gln	Lys	Phe
				100					105					110		
10	Ala	Ser	Glu	Ile	Gln	Gln	Val	Asp	Phe	Ala	Ala	Asn	Arg	Glu	Thr	Ala
			115					120					125			
15	Glu	Leu	Ile	Asn	Ala	Trp	Val	Glu	Lys	Lys	Thr	Asn	Ser	Arg	Ile	Arg
		130					135					140				
20	Asn	Leu	Val	Gln	Pro	Gln	Met	Leu	Ser	Ala	Gln	Thr	Ala	Met	Ala	Leu
		145				150					155					160
25	Ile	Asn	Ala	Ile	Tyr	Phe	Lys	Gly	Asp	Trp	Lys	Thr	Lys	Phe	Asn	Ala
				165					170						175	
30	Glu	Ser	Thr	Thr	Lys	Lys	Met	Phe	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Ser	Asp	Arg
				180					185					190		
35	Glu	Val	Asp	Met	Met	Ala	Ile	Thr	Ser	Gly	Phe	Ser	Tyr	Ala	Glu	Thr
			195					200					205			
40	Glu	Asp	Val	Gln	Val	Leu	Glu	Leu	Pro	Tyr	Lys	Asp	Pro	Glu	Thr	Phe
		210					215					220				
45	Met	Tyr	Val	Phe	Leu	Pro	Thr	Glu	Arg	Phe	Gly	Leu	Arg	Gln	Phe	Glu
		225				230					235					240
50	Lys	Ser	Met	Asn	Gly	Glu	Lys	Ile	Met	Gln	Leu	Met	Asn	Gly	Cys	Met
				245						250					255	
55	Pro	Arg	Asn	Lys	Ile	Ile	Val	Glu	Leu	Pro	Lys	Phe	Lys	Leu	Asp	Gly
			260						265					270		
60	Gln	Leu	Arg	Leu	Asn	Lys	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Gly	Ile	Arg	Asp	Ala
			275					280					285			
65	Phe	Asp	Ala	Glu	Lys	Ala	Asn	Phe	Asp	Gly	Ile	Ser	Lys	Asn	Asp	Ser
		290					295					300				
70	Leu	Val	Val	Ser	Asp	Val	Val	His	Lys	Ala	Asn	Val	Glu	Val	Asn	Glu
	305					310					315					320
75	Glu	Gly	Ser	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Leu	Phe	Met	Val	Phe	Arg
					325					330					335	
80	Ser	Ser	Arg	Pro	Met	Pro	Val	Thr	Pro	Pro	Ile	Arg	Phe	Ile	Ala	Asp
				340					345					350		
85	His	Pro	Phe	Ile	Phe	Thr	Ile	Val	Ser	Gln	Asn	Arg	Ile	Leu	Phe	Ile
			355					360					365			
90	Gly	Arg	Phe	His												
		370														

ES 2 374 054 A1

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR AP1, para amplificación del extremo 5' del clon 3A22 de *Anisakis simplex*
10
<400> 4
ctaatacgac tcactatagg gc 22
15

<210> 5
<211> 28
20 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Cebador reverso de PCR SR1, para amplificación del extremo 3' del clon 3A22 de *Anisakis simplex*
<400> 5
30 acccgagta gttttatcca tttgttcg 28

<210> 6
<211> 26
35 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Cebador directo de PCR: SER5', para amplificación del gen completo de AniSerp
<400> 6
45 atgatgacag cattaccggt tttaac 26

<210> 7
<211> 30
50 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Cebador inverso de PCR SER3', para la amplificación del gen completo de AniSerp
<400> 7
60 tcagtggaaa cgaccaataa acagaatgcg 30

<210> 8
65 <211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

ES 2 374 054 A1

<220>

<223> Cebador director de PCR 5'-SER-SPS

5 <400> 8

cccgggatgc agcagacaat cgatgat

27

10

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de PCR 3'-SER-SPS

20

<400> 9

gcggccgctc agtggaaacg accaataa

28

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031031

②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.07.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9610638 A1 (PPL THERAPAUTICS (SCOTLAND) LTD.) 11.04.1996, todo el documento.	1-26
A	WO 9100291 A1 (AZKO N.V.) 10.01.1991, todo el documento.	1-26
A	US 5427937 A (MICHAEL CAPPELLO et al.) 27.06.1995, todo el documento.	1-26
A	US 5420252 A (HIROYURI KATO et al.) 30.05.1995, todo el documento.	1-26
A	EP 0238473 A2 (MONSANTO COMPANY) 23.09.1987, todo el documento.	1-26

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
12.01.2012

Examinador
M. M. García Coca

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/15 (2006.01)

C07K14/81 (2006.01)

A61K38/57 (2006.01)

A61P7/02 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.01.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 9610638 A1 (PPL THERAPAUTICS (SCOTLAND) LTD.)	11.04.1996
D02	WO 9100291 A1 (AZKO N.V.)	10.01.1991
D03	US 5427937 A (MICHAEL CAPPELLO et al.)	27.06.1995
D04	US 5420252 A (HIROYURI KATO et al.)	30.05.1995
D05	EP 0238473 A2 (MONSANTO COMPANY)	23.09.1987

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-26, es un polipéptido con estructura de serpina (SEQ ID NO: 2 y 3) con capacidad de inhibir a la trombina humana de forma independiente de heparina, donde dicho polipéptido puede unirse a una segunda proteína, dando una proteína de fusión donde la segunda proteína es la glutatión-S-transferasa. Dicho polipéptido también presenta la capacidad de inhibir las catepsinas G y L (reiv. 1-9). Es también objeto de la invención el ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido (reiv. 10-14), un vector de expresión que comprende el ácido nucleico (reiv. 15), una célula hospedadora transformada con el vector de expresión (reiv. 16 y 17), un método para producir la proteína (reiv. 18) y el uso del polipéptido de la invención para la preparación de un medicamento anticoagulante (reiv. 19-26).

Novedad y Actividad Inventiva (Art. 6.1 y 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga un inhibidor de serina proteasa que no requiere la activación por heparina y que comprende una secuencia que interacciona con el sitio catalítico de la trombina inhibiendo la actividad proteolítica de la misma. Esta enzima puede ser administrada de forma independiente de la heparina.

El documento D02 divulga variantes de la antitrombina humana III, las cuales presentan sustituciones en la región comprendida del aminoácido 384 al 396. Las sustituciones en esta región permiten de forma específica modular la dependencia de heparina de dicha proteína, de forma que se altera el efecto inhibitorio dependiente de heparina de inhibir a los factores IIa (trombina) y Xa. Una de las sustituciones hace que en presencia de heparina, la proteína conserve su capacidad de inhibir a la trombina, pero pierde la capacidad de inhibir al factor Xa.

El documento D03 divulga una proteína anticoagulante obtenida del nematodo *Ancylostoma*, que presenta homología de secuencia con la familia de serpins Kunitz. Esta proteína prolonga en tiempo de vida de la protrombina y la tromboplastina, pero también inhibe a los factores VIIa y Xa dentro de la cascada de coagulación.

El documento D04 divulga una antitrombina III humana mutada mediante métodos de DNA recombinante. Esta proteína tiene modificado el sitio de unión a la heparina, de forma que dicha proteína es activa en ausencia de heparina, y es efectiva como anticoagulante.

El documento D05 divulga péptidos con capacidad de inhibir a las serina proteasas. Estos péptidos presentan una región con estructura de serpina de los cuales, algunos de ellos presentan capacidad de inhibir tanto a la trombina como a la catepsina G. Este documento también divulga un método para la síntesis de dichos péptidos, y su uso como inhibidores de las serina proteasas.

Ninguno de los documentos citados (D01-D05), tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-26. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida por dichas reivindicaciones. Por lo tanto, el objeto de invención según se recoge en las reivindicaciones 1-26, cumple con el requisito de novedad e implica actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.