



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 153 760**  
(21) Número de solicitud: **009802524**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C07K 14/815**  
**C12N 15/15**

(12)

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación: **25.11.1998**

(71) Solicitante/s: **UNIVERSITAT AUTONOMA  
DE BARCELONA  
08193 Bellaterra, Barcelona, ES  
LUDWIG MAXIMILIANS UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2001**

(72) Inventor/es: **Reverter, David;  
Vendrell, Josep;  
Canals, Francesc;  
Hortsmann, Jeanny;  
Querol, Enrique;  
Fritz, Hans;  
Sommerhoff, Christian P. y  
Avilés, Francesc X.**

(54) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.03.2001**

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

(54) Título: **Inhibidor de metalocarboxipeptidasas como agente fibrinolítico.**

(57) Resumen:

Inhibidor de metalocarboxipeptidasas como agente fibrinolítico.  
La invención trata del gen de un inhibidor de metalocarboxipeptidasas de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, secuencia del mismo y de la proteína por él codificada, de la caracterización de la misma. La invención también se refiere a su aplicación farmacológica como agente fibrinolítico.

ES 2 153 760 A1

## DESCRIPCION

Inhibidor de metalocarboxipeptidasas como agente fibrinolítico.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a inhibidores de metalocarboxipeptidasas como agentes fibrinolíticos. En particular, la presente invención se refiere a la identificación, clonación y determinación de la secuencia del gen y de la proteína por él codificada y a la aplicación de las propiedades fibrinolíticas de uno de ellos procedente de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, el LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor).

**10 1.- Antecedentes de la invención**

Las proteasas y sus inhibidores participan en numerosos procesos biológicos (Fritz, H., Schmidt, I., and Turk, V. (eds.) (1990) Special volume on Proteinase Inhibitors and Biological Control Biol. Chem. HoppeSeyler, Vol. 371; Avilés, F.X. (ed.) (1993) Innovations in Proteases and their Inhibitors, Walter de Gruyter, Berlin.), entre los cuales está el de la coagulación y la fibrinolisis, constituyendo la subfamilia de las metalocarboxipeptidasas un importante grupo dentro de ellas (Hooper NM (ed.) (1996) Zinc Metalloproteases in Health and Disease, Taylor and Francis Ltd., London). Al contrario que en el caso de los inhibidores de endopeptidasas, tan sólo se han identificado unos pocos inhibidores de metalocarboxipeptidasas (Avilés et al. (1993) Eur. J. Biochem. 211, 381-389; Hass & Ryan (1981) Methods Enzymol. 80, 778-791; Homandberg et al. (1989) Arch. Biochem. Biophys. 270, 153-161; Normant et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 12225-12229). Los carboxipeptidasas a través de su región C-terminal que interacciona con el enzima como un substrato. Por el contrario, el inhibidor procedente del cerebro de rata inhibiría a través de una región que presenta similitud de secuencia con el bucle inhibidor de las regiones "pro" de estos enzimas, o sea posicionando el bucle inhibidor sobre el centro activo del enzima (Coll et al. (1991) EMBO J., 10, 1-9; Guasch et al. (1992) J. Mol. Biol., 224, 141-57; García-Saez et al. (1997) EMBO J. 16, 6906-6913).

Se han aislado diversos inhibidores proteicos de proteasas a partir de sanguijuelas (Ascenzi et al. (1995) Molec. Aspects Med. 16, 215-313). Entre los mismos los hay que actúan como anticoagulantes, por ejemplo las hirudinas específicas de trombina y la antistatina específica del factor Xa (Tuszynsky et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 9718-9723). Es un hecho destacable que la sanguijuela parece tener inhibidores contra todas las proteasas de los mastocitos humanos (triptasa, quimasa, catepsina G y metalocarboxipeptidasa A). Los mastocitos al ser activados en los procesos infectivos liberan enzimas que contribuyen a iniciar el sistema de defensa del huésped. Los inhibidores que produce la sanguijuela podrían tener como función el bloqueo del mencionado sistema de defensa del 5 huésped [Huntley et al. (1990) Parasite Immunol. 12, 8595; Douch et al. (1996) Int. J. Parasitol. 26, 91-95; Miller, H.R. (1996) Vet. Immunol. Immunopathol. 54, 331336; Arizono et al. (1996) Clin. Exp. Immunol. 106, 5561].

40 Se describe a continuación la secuencia del gen, de la proteína en él codificada y algunas características de un nuevo inhibidor de metalocarboxipeptidasas obtenido de sanguijuela, el primero descrito para este organismo, que se ha denominado LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor). También se describe su producción recombinante similitud de secuencia con otros inhibidores de carboxipeptidasas descritos previamente. El LCI participaría en la eliminación de coágulos sanguíneos a través de la inhibición de la carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) de plasma sanguíneo, también denominada TAFI, enzima que ha sido recientemente involucrado en el retardo de la fibrinolisis (Bajzar et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 14477-14484; Sakharov et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 14477-14482).

**50 2.- Compendio de la invención**

Es un objetivo de la presente invención la identificación de un inhibidor de metalocarboxipeptidasas, el LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor), de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*.

55 Es otro objetivo de la presente invención la determinación de la secuencia del gen y de la proteína por él codificada, y la caracterización de la misma como una molécula con alta actividad inhibidora de metalocarboxipeptidasas.

60 Es todavía otro objetivo de la invención la utilización del inhibidor de metalocarboxipeptidasas de acuerdo con secuencia ID N° 2, aislada o en combinación con otros agentes fibrinolíticos a los que complementa o potencia, para la preparación de un medicamento útil como agente fibrinolítico.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende, como agente

activo, una cantidad efectiva de dicho inhibidor de metalocarboxipeptidasas, o de derivados, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Finalmente, es objetivo de la presente invención la caracterización de la actividad fibrinolítica del 5 inhibidor de metalocarboxipeptidasas, el LCI, como principal objetivo terapéutico y aplicado del mismo.

### 3. Descripción detallada de la invención

Los objetivos de la presente invención están relacionados con la identificación, la clonación y determinación 10 de la secuencia del gen y de la proteína por él codificada, y con sus propiedades fibrinolíticas, de un inhibidor de metalocarboxipeptidasas procedente de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, el LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor).

En la forma de realización preferida de la presente invención los objetivos propuestos se han alcanzado 15 mediante un proceso que incluye los objetivos parciales que se describen a continuación.

En primer lugar se ha aislado e identificado una actividad inhibidora de metalocarboxipeptidasas en extractos de la sanguijuela *Hirudo medicinalis* (LCI de Leech Carboxypeptidase Inhibitor). Asimismo se ha establecido un procedimiento de purificación del LCI, nativo y recombinante, y unos procedimientos 20 de caracterización del mismo.

En una forma de realización adicional de la presente invención se ha obtenido una secuencia peptídica 25 del fragmento Nterminal del inhibidor LCI nativo obtenido y purificado a partir del extracto de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*. La información obtenida a partir de esta secuencia ha sido clave para el diseño de diversos oligonucleótidos que han permitido la posterior clonación del gen del LCI.

En otra forma de realización de la presente invención se ha preparado una genoteca de expresión 30 de cDNA que, juntamente con los oligonucleótidos anteriormente mencionados, han permitido diseñar una estrategia de PCR-RACE mediante la que se ha logrado la clonación del gen del LCI. Consecuencia directa de esta forma de realización ha sido la determinación de la secuencia nucleotídica del mencionado gen y de la proteína por él codificada.

En otra forma adicional de realización de la presente invención se han diseñado sistemas de expresión 35 heteróloga de LCI recombinante (rLCI), solo o en forma de proteína de fusión. Asimismo se han diseñado los correspondientes protocolos de separación proteolítica del rLCI de la proteína de fusión y los procedimientos de purificación y caracterización del rLCI.

En otra forma de realización de la presente invención se ha determinado la actividad fibrinolítica del LCI, actividad relacionada con su acción inhibidora de metalocarboxipeptidasas. La utilidad terapéutica 40 del LCI se basa en la mencionada actividad fibrinolítica del mismo.

A continuación se describe un ejemplo que ilustra el modo preferente de desarrollo de la presente invención, el cual no pretende abarcar todas las posibilidades de diseño y aplicación de la presente invención.

#### 4.- Ejemplo del modo preferido de realización de la invención

Los objetivos de la presente invención se han alcanzado con la identificación, la determinación de la secuencia del gen y de la proteína por él codificada, y de sus propiedades fibrinolíticas, de un inhibidor 50 de metalocarboxipeptidasas procedente de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, el LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor).

##### 4.A. Aislamiento, purificación, determinación de la masa y secuenciación del LCI.

Se purificó LCI a partir de extracto de sanguijuela *Hirudo medicinalis* (GEN Therapeutica, Bad Zwischenahn). Se disolvieron 0,5 g de extracto en tampón Tris/acetato 20 mM (pH 8,0). Se centrifugó a 13.000 x g durante 10 min y tras equilibrar el pH se cargó el sobrenadante en una columna de intercambio aniónico preparativa (TSK-DEAE SPW, 2,5 x 15 cm; Toyo-Soda) conectada a un sistema de FPLC (Pharmacia). Se eluyó mediante un gradiente lineal (0% a 100%) de acetato amónico 0,8 M, 55 tamponado con Tris/acetato 20 mM (pH 8,0). El flujo fue de 4 ml/min durante 80 min. Las fracciones se recogieron y se determinaron las actividades inhibidoras de las metalocarboxipeptidasas CPA1, CPA2 y CPB pancreáticas. La actividad inhibidora del LCI sobre dichas metalocarboxipeptidasas, así 60

como sobre la carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática, la más relevante para esta invención, así como y las correspondientes  $K_i$  fueron determinadas de acuerdo con ensayos previamente descritos (Burgos et al. (1989) J. Chromatogr., 481, 233-243; Molina et al. (1992) Gene 116,129-138 y (1994) J. Biol. Chem. 269, 21467-21472). Las  $K_i$  resultantes fueron de ~0,4 nM, a pH 7,5. Las fracciones que presentaban actividad inhibidora (fracciones 64min y 69 min) fueron lyophilizadas y cromatografiadas por HPLC de fase reversa (columna Vydac C4) con un gradiente lineal (20% a 42%) de acetonitrilo en ácido trifluoroacético 0,1%, a un flujo de 1 ml/min durante 60 min. La actividad inhibitoria de metalocarboxipeptidasas eluyó a los tiempos de retención de 38 y 34 min. La pureza del inhibidor se determinó mediante electroforesis de SDS-tricina (Schägger & Von Jagow (1986) Anal. Biochem. 166, 369-376). La masa molecular se determinó mediante espectroscopia de masas MALDI-TOF (BRUKER). Se realizó también la secuenciación de residuos N-terminales e internos mediante degradación automática de Edman. La secuencia de los mencionados 28 residuos corresponde con la del apartado "Listado de secuencias".

#### 15 4.B. Clonación y secuenciación del cDNA del LCI

A partir de la secuencia peptídica N-terminal y de un fragmento interno del LCI se diseñaron oligonucleótidos degenerados que permitieron una amplificación de cDNA por RACE-PCR (Fritz et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 37473753; Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002; Chenchik et al. (1996) BioTechniques 21, 526534). Los oligonucleótidos, sintetizados por MWG-Biotech (Ebersberg, Germany), fueron los siguientes:

N1: 5'-GACGAATCNTYYTNTGYTAYCA-3' con N=A, C,G,T e Y=C,T (secuencia deducida a partir de los aminoácidos 5-12 del LCI)

25 N2: 5'-TGTGCTAYCARCCNGAYCARGT-3' con R=A,G (a partir de los aminoácidos 9-16)

N3: 5'-CCAGACCARGTNTGYTGYTTYAT-3' (a partir de los aminoácidos 13-20)

C1: 5'-CCTGTGSWRTANGGNACCCA-3' con S=G,C y W=A,T: (a partir de los aminoácidos 55-49)

30 YXT: 5'-CGAGGGGGATGGTCGACCGAAGCGACCT18-3'. (modificado según Fritz et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 37473753)

Y: 5'-CGAGGGGGATGGTCGACGG-3', (representa parte de YXT)

35 X: 5'-GATGGTCGACCGAAGCGACC-3', (representa parte de YXT)

El RNA total se aisló mediante el método del tiocianato de guanidinio (Chomczynski y Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159) a partir de sanguijuelas congeladas, y el mRNA poly(A)+ se purificó mediante afinidad por oligo (dT) (Pharmacia). La primera hebra del cDNA se realizó utilizando como cebador el oligonucleótido XYZ. En primer lugar se amplificó un fragmento interno del cDNA así como el 3' (3'-RACE). Para la primera fase del PCR se utilizaron los cebadores N1, N2 y N3 en todas las combinaciones con el cebador C1 o los cebadores X y Y. Se utilizó la polimerasa Goldstar polymerase (Eurogentec, Bélgica) mediante 30 ciclos de: a 94°C durante 20 sec, seguido de 1 min a 53°C y finalmente la extensión final a 72°C durante 2 min. Los productos del PCR se separaron por geles de electroforesis en agarosa 1,8%/Tris acetato. Los productos de la amplificación se eluyeron del gel y subclonados en el sistema pGEM-TAT-de (Promega) y utilizados posteriormente para transformar la cepa JM109 de E.coli. El extremo 5' del cDNA se obtuvo mediante el Marathon cDNA amplification kit de Clontech, USA. Para ello se utilizó el cebador adaptador AP1 de Marathon y los cebadores específicos del gen 5'-TAGTCAAGAAGAGAAATGCCCT-3' y 5'-TTAGCCTCGCATCAGTGACACACG-3' (complementarios a los nucleótidos 361-340 y 300-277 del cDNA (ver el apartado Listado de secuencias)). La secuenciación de las diferentes secuencias parciales amplificadas permitió diseñar nuevos cebadores para 5'-RACE. Finalmente se obtuvo la secuencia del cDNA del LCI, consistiendo en un ORF de 243 pb, además de dos regiones no traducidas, una de 21 pb situada en posición 5' respecto al ORF y otra de 182 pb situada en 3' del mismo (ver el apartado Listado de secuencias). La traducción del ORF genera una secuencia de 81 aminoácidos, conteniendo un péptido señal de 15 residuos, lo que implica una secuencia del LCI maduro de 66 aminoácidos (ver el apartado Listado de secuencias). Una búsqueda en los bancos de datos de secuencias mostró que ninguna secuencia similar al LCI había sido descrita previamente.

#### 60 4.C. Expresión heteróloga del LCI

La expresión heteróloga del LCI se realizó mediante los vectores pIN-III-OmpA3 (Ghrayeb et al. (1984) EMBO J. 3, 24372442; Molina et al. (1992) Gene 116,129-138; Molina et al. (1994) J. Biol.

Chem. 269, 21467-21472) y pET-32b (Promega). El vector pIN-III OmpA3 fue digerido con EcoRI, los extremos digeridos con nucleasa Mung bean y digeridos con BamHI. Al vector linearizado resultante se le ligó el producto de lo obtenido (descrito en el apartado anterior) generándose el plásmido pIN-III-OmpA3LCI y se transformó en la cepa MC1061 de E. coli. De forma similar, el vector pET-32b se digirió con EcoRV y BamHI y se le ligó el producto de lo obtenido (descrito en el apartado anterior) generándose el plásmido pET-32b-LCI y se transformó en la cepa ADA494 de E. coli.

Para la obtención del LCI recombinante (a partir de ahora rLCI) como inóculo se utilizaron 5 ml de MC1061/pINIII-OmpA3-LCI que se incubaron durante la noche a 37°C en M9CAS (conteniendo 0,3% de glicerol) y se utilizaron para inocular 5 l del mismo medio. Después de 2 h se añadió IPTG, a una concentración final de 0,5 mM. 24 h tras la inducción se centrifugó el cultivo a 10.000 x g durante 20 min y el sobrenadante se pasó a través de un cartucho SepPak Plus C18 (Waters, Millipore). El material retenido en la columna se eluyó con 40 ml de 2-propanol al 30% y se concentró con un roto-vapor para eliminar el disolvente orgánico. A continuación se purificó el rLCI tal y como se ha descrito en el apartado 4.A. El rLCI se encontraba en el medio de cultivo. La cuantificación se realizó determinando la actividad inhibidora de metalocarboxipeptidasas.

En el caso del plásmido ADA494/pET-32b-LCI, el procedimiento fue el siguiente. Como inóculo se utilizaron 5 ml de ADA494/pET-32b-LCI, que se incubaron durante la noche a 37°C en medio LB y que se utilizaron para inocular 1 l del mismo medio. Cuando la densidad óptica del cultivo alcanzó valores de 0,4-0,6, se añadió IPTG, a una concentración final de 0,4 mM. Tres horas después se purificó el rLCI (intracelular y como proteína de fusión a tioredoxina) utilizando una columna de Ni<sup>2+</sup> (Pharmacia). La proteína de fusión se eluyó mediante imidazol 1 M, NaCl 0,5 M, Tris/HC120 mM, pH 7,9. Posteriormente se separó el rLCI de la proteína de fusión mediante digestión por enteroquinasa (Sigma) y purificó tal y como se ha descrito en el apartado 4.A. La cuantificación se realizó determinando la actividad inhibidora de metalocarboxipeptidasas.

En ambos casos se optimizó la expresión. En el caso del sistema pINIII-OmpA3 el rendimiento más elevado se encontró utilizando glicerol 0,3% y IPTG 0,5 mM, de acuerdo con resultados previos en sistemas semejantes (Molina et al. (1992) Gene 116,129-138). El rendimiento, cultivado en frasco, fue de 3,4 mg/l de sobrenadante, con una recuperación del 60%. El rLCI se purificó según lo descrito en el apartado 4.A., y como control del procesamiento correcto por parte de la célula huésped se realizó una secuenciación del extremo N-terminal y una determinación de la masa molecular mediante espectroskopía de masas MALDI-TOF. En el caso del sistema pET-32b se obtuvieron 20-40 mg/l de la fusión tioredoxina-rLCI. Tras la digestión mediante enteroquinasa se obtenían 7 mg/l con una recuperación del 50%.

#### 4.D. *Ensayo de actividad fibrinolítica del LCI*

El LCI promueve la degradación de los coágulos de fibrina por inhibición de la carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática o TAFI (la constante de inhibición es ~ 0,4nM). Ello es congruente con el hecho demostrado de que este último enzima inhibe la fibrinólisis al destruir los sitios de fijación del plasminógeno a la fibrina (Sakharov et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 14477-14482). El ensayo se realizó con los componentes purificados de la fibrinólisis. La coagulación inicial (promovida por trombina) y la subsiguiente fibrinólisis (inducida por el activador del plasminógeno) se monitorizó a lo largo del tiempo por el aumento o disminución de la turbidez en un ensayo espectrofotométrico a 405 nm (Bajzar et al. (1996) J. Biol. Chem. 271,16603-16608). Diferentes concentraciones de carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática, previamente activada a partir de su zimógeno por un mezcla de trombina (20 nM)-trombomodulina (50 nM), se ensayaron frente a concentraciones crecientes de LCI en un tampón HEPES 0,02 M,NaCl 0,15 M, CaC12 5 mM,Tween80 0,01 %, pH 7,4. El medio de fibrinólisis consistía en fibrinógeno (3,36 mM), Glu plasminógeno (0,89 mM), α2-antiplasmina (0,56 mM) y antitrombina III (1,11 nM). Esta mezcla se mezcló con las diferentes concentraciones preparadas previamente de mezclas de carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática-LCI y se ensayó en pocillos de una microplaca que contenía trombina (6,0 nM) y activador de plasminógeno (441pM). Se siguió la turbidez, a 405 nm, de las muestras de cada pocillo de la placa con medidas cada 2,5 min, a 37°C, y se midió el tiempo medio de lisis del coágulo. En las muestras que no contenían LCI el tiempo necesario para la lisis del coágulo era mucho mayor (no llegando nunca a más de un 5% de lisis en 30 horas). En cambio, en presencia de LCI, la carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática resultó inhibida y por lo tanto la turbidez del medio desaparece más rápidamente. La destrucción del coágulo resultó mucho más rápida (la lisis ya era del 75% en 1,5 horas, alcanzándose el 100% en menos de 3 horas).

ES 2 153 760 A1

#### 4.E Lista de secuencias

5 <110> Universitat Autonoma de Barcelona  
 Ludwig Maximilians Universität München  
 <120> Inhibidor de metalcarboxipeptidasas como agente fibrinolítico  
 <130> A143024  
 <140> 9802524  
 <141> 1998-11-25  
 10 <160> 2  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 <211> 465  
 15 <212> ADN  
 <213> Hirudo medicinalis  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (22)..(264)  
 20 <220>  
 <223> Producto=LCI  
 <400> 1

25  
 gacttggtaa ctcattcgat c atg ttt ctg ctc gtt ttc ctg tgc tgc ctc 51  
 Met Phe Leu Leu Val Phe Leu Cys Cys Leu  
 30 1 5 10  
 cac ctg gtg att tcg tcg cat aca cca gat gag agt ttc ttg tgc tac 99  
 His Leu Val Ile Ser Ser His Thr Pro Asp Glu Ser Phe Leu Cys Tyr  
 35 15 20 25  
 caa cca gac cag gtg tgc tgt ttc att tgc aga gga gcg gca cct ttg 147  
 Gln Pro Asp Gln Val Cys Cys Phe Ile Cys Arg Gly Ala Ala Pro Leu  
 40 30 35 40  
 cct tca gaa ggg gaa tgc aat cca cat cct aca gca ccc tgg tgc cgg 195  
 Pro Ser Glu Gly Glu Cys Asn Pro His Pro Thr Ala Pro Trp Cys Arg  
 45 45 50 55  
 gaa ggg gct gta gag tgg gtt ccc tac tct act ggt caa tgt cgc aca 243  
 Glu Gly Ala Val Glu Trp Val Pro Tyr Ser Thr Gly Gln Cys Arg Thr  
 50 60 65 70  
 acc tgc atc cca tat gtc gag tagatgaccc atcgatgtgc actgatgoga 294  
 Thr Cys Ile Pro Tyr Val Glu  
 55 75 80  
 ggcttaactct cattattttc ctgaacgcat ccttgttcaa atttaaggc atttctttc 354  
 ttgactaatt attttgctga gttaaaataa taaaataata ttgaagcatt atttaataat 414  
 60 qttctcggtt qaataaaataa tqatcqaaag ataaaaaaaaa aagaaaaaaaaa a 465

ES 2 153 760 A1

<210> 2  
<211> 81  
<212> PRT  
5 <213> Hidruro medicinalis  
<223> Producto=LCI

<400> 2

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

30

35

40

45

50

55

60

## REIVINDICACIONES

1. Secuencia nucleotídica recombinante que codifica para una secuencia de proteína que corresponde a un inhibidor de metalocarboxipeptidasas de *Hirudo medicinalis*.
- 5 2. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que comprende la secuencia identificada como SEQ ID N° 1 del listado de secuencias.
- 10 3. Secuencia polipeptídica codificada en la secuencia nucleotídica según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizada** por el hecho de que comprende la secuencia identificada como SEQ ID N° 2 del listado de secuencias.
- 15 4. Secuencia polipeptídica de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicha secuencia es sustancialmente homóloga a la secuencia identificada como SEQ N°2.
- 5 5. Secuencia nucleotídica que comprende una secuencia codificante de un polipéptido sustancialmente homólogo a la secuencia ID N° 2, según la reivindicación 3.
- 20 6. Vector de expresión procariota o eucariota **caracterizado** por el hecho de que incluye la secuencia nucleotídica recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 5, y por el hecho de que es capaz de expresar el inhibidor de metalocarboxipeptidasas biológicamente activo.
- 25 7. Célula de *Escherichia coli* transformada **caracterizada** por el hecho de que comprende un vector de expresión según la reivindicación 6 y por el hecho de que es capaz de producir el inhibidor de metalocarboxipeptidasas biológicamente activo.
8. Procedimiento para preparar el inhibidor de metalocarboxipeptidasas recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, **caracterizado** por el hecho de que comprende
  - 30 (i) el cultivo del transformante que contiene un vector de expresión capaz de expresar un inhibidor de metalocarboxipeptidasas biológicamente activo; y
  - (ii) la obtención y purificación del mismo.
- 35 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 **caracterizado** por el hecho de que el proceso recombinante se lleva a cabo en un huésped procariota o eucariota.
10. Inhibidor de metalocarboxipeptidasas de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 4, como agente fibrinolítico.
- 40 11. Utilización del inhibidor de metalocarboxipeptidasas de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 4, para la preparación de un medicamento útil como agente fibrinolítico.
- 45 12. Utilización del inhibidor de metalocarboxipeptidasas según la reivindicación 11, en combinación con otros agentes fibrinolíticos a los que complementa o potencia para la preparación de un medicamento útil como agente fibrinolítico.
- 50 13. Composición farmacéutica que comprende, como agente activo, una cantidad efectiva del inhibidor de metalocarboxipeptidasas, o de derivados, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

⑪ ES 2 153 760

⑯ N.º solicitud: 009802524

⑰ Fecha de presentación de la solicitud: 25.11.1998

⑲ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.<sup>7</sup>: C07K 14/815, C12N 15/15

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	POHLIG, G. et al. "Purification, characterization and biological evaluation of recombinant leech-derived tryptase inhibitor (rLDTI) expressed at high level in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", EUR. J. BIOCHEM., 1996, Vol. 241, páginas 619-626. Todo el documento.	1-13
A	BASKOVA, I.P. et al. "Inhibition of plasma Kallikrein, Kininase and Kinin-like activities from the medical leeches", THROMBOSIS RESEARCH, 1992, Vol. 67, páginas 721-730. Todo el documento.	1-13
A	US 5587360 A (SAWYER) 24.12.1996, todo el documento.	1-13
A	WO 9501375 A (MERCK PATENT GMBH) 12.01.1995, todo el documento.	1-13
A	US 5783421 A (ZEELEN et al.) 21.07.1998, todo el documento.	1-13

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

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

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

A: refleja el estado de la técnica

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 19.01.2001	Examinador J.L. Vizán Arroyo	Página 1/1
--	---------------------------------	---------------