



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-32811

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO INMUNIZACION Y ANTIVENENO CONTRA EL VENENO
DE LA ARAYA VIOLINISTA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/00

71. SOLICITANTE - UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
- LABORATORIOS SILAVES DE C.V

DOMICILIO MEXICO, D.F. - MEXICO

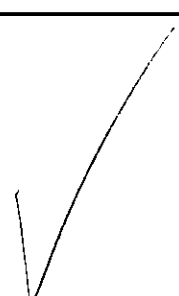
74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D. C., MARZO 30, 2007

31-03-2007

U. C. 1007

(FORMA P-10)



FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

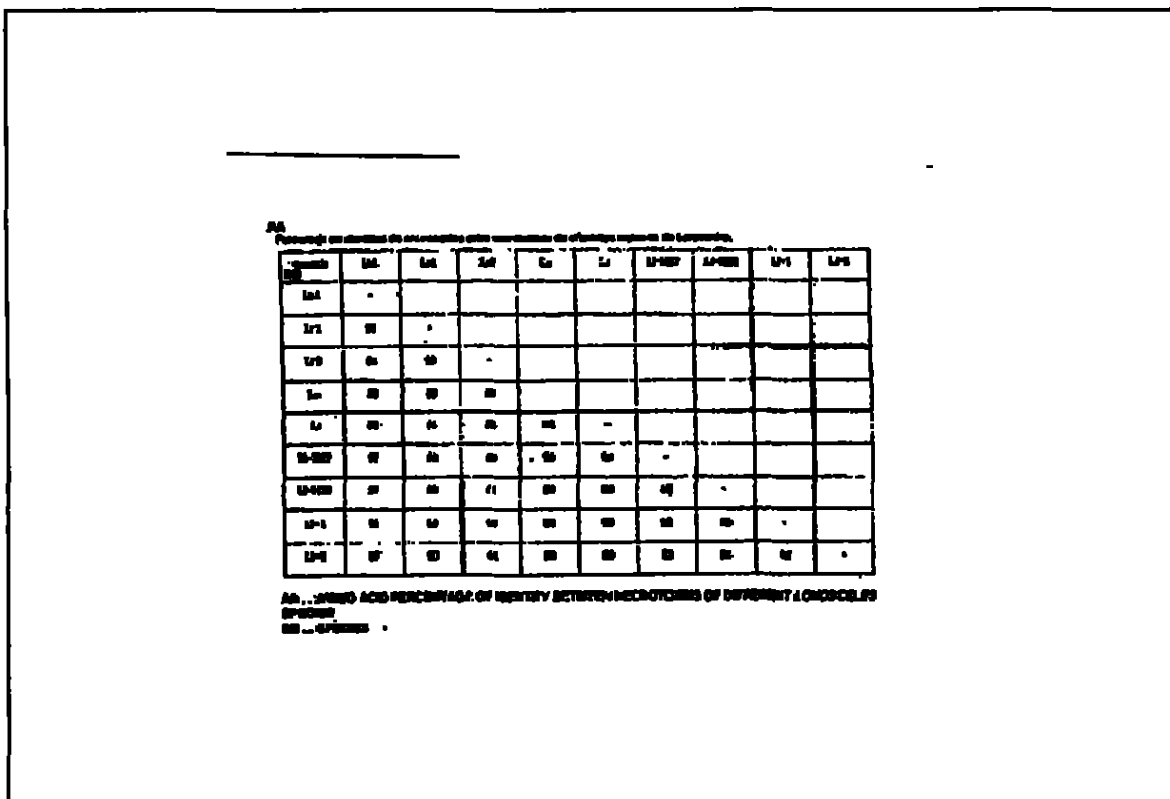
1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2) SOLICITANTE (71)	Nombre: 1. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO y 2. LABORATORIOS SILANES S.A. DE C.V. Dirección: 1. 9° piso de la Torre Rectoría, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, CEP-04510 México D.F. (MX); 2. Amores 1304, Colonia del Valle, Delegación Benito, Juárez, CEP-03100 México, D.F. (MX). Nacionalidad o domicilio: Todos los anteriores, México, D.F. (MX) Lugar de constitución: Todos los anteriores, México, D.F. (MX) Teléfono: Fax: E. Mail:		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual NÚMERO
	3) REPRESENTANTE O APODERADO Nombre: DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: 1. OLVERA RODRIGUEZ, Alejandro; 2. STOCK SILBERMAN, Roberto Pablo; 3. RAMOS CERRILLO, Blanca Margarita; 4. SANCHEZ-LÓPEZ, Rosana; 5. ALAGÓN CANO, Alejandro Dirección: 1. Las fuentes N° 27, Colonia Las Águilas, CEP-62470 Cuernavaca, Morelos (MX); 2. Restomo Nueva Galicia N°. 7 Colonia Jardines de Reforma, 2ª sección, CEP-62260 Cuernavaca, Morelos (MX); 3. Fundidora De Monterrey Nr. 113, Colonia Industrial, CEP-07800 México D.F. (MX); 4. Morciles Nr. 130, Colonia López de Nava, CEP-62300 Cuernavaca, Morelos (MX); 5. Retorno Nueva Galicia N°. 6 Colonia Jardines de Reforma, 2ª Sección, CEP 62260 Cuernavaca, Morelos (MX). Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores México		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/MX2005/0000071 Fecha: Agosto. 29, 2005 Publicación Internacional No. WO2006/025718 A2 Fecha: Marzo 9, 2006			
6) Título (54) INMUNÓGENO Y ANTIVENENO CONTRA EL VENENO DE LA ARaña VIOLINISTA			
7) Clasificación Internacional:			
8) PRIORIDAD	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	MÉXICO	AGOSTO 31, 2004	PA/A/2004/008435
9) Comprobante de pago N°.			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina			

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
 - ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
 - ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
 - ☐ Poderes, si fuera el caso
 - ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
 - ☐ Declaraciones
 - ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
 - ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
 - ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
 - ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
 - ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
 - ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
 - ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
 - ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
 - ☒ Otros:
1. Reporte internacional de búsqueda

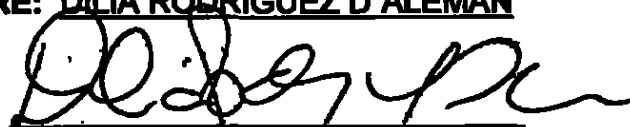
11) FIGURA CARACTERÍSTICA:



12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:



C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

P. 910

M

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 18,717
FECHA : MARZO 5 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad. 07-032811- -00000-0000
Reg. 2007-03-30 17.12.05 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tid. 11: PATENTE/IN
E.e. 378 FASENACIONAL:
4-1411 PRESENTACION Folio 197

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE NODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	63066267	05/03/2007	6,048,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación Internacional
9 de Marzo de 2006 (09.03.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/025718 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/MX2005/000071

(22) Fecha de presentación internacional:
29 de Agosto de 2005 (29.08.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
PA/A/2004/008435
31 de Agosto de 2004 (31.08.2004) MX

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo
US): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO [MX/MX]; 9° Piso de la Torre Rectoría, Ciudad
Universitaria, Delegación Coyoacán, CEP-04510 México
D.F. (MX). LABORATORIOS SILANES S.A. DE C.V.
[MX/MX]; Amores 1304, Colonia del Valle, Delegación
Benito Juárez, CEP-03100 México D.F. (MX).

(72) Inventores: e

(73) Inventores/Solicitantes (para US solamente): OLIVERA
RODRIGUEZ, Alejandro [MX/MX]; Las Fuentes N°27,
Colonia Las Águilas, CEP-62470 Cuernavaca, Morelos
(MX). STOCK SILBERMAN, Roberto Pablo [UY/MX];
Restomo Nueva Galicia N°7 Colonia Jardines de Refo,
rma, 2a sección, CEP-62260 Cuernavaca, Morelos (MX).
RAMOS CERRILLO, Blanca Margarita [MX/MX];
Fundidora De Monterrey N°113, Colonia Industrial,
CEP-07800 México D.F. (MX). SANCHEZ-LÓPEZ,
Rosma [MX/MX]; Morelos N°130, Colonia López de
Nava, CEP-62300 Cuernavaca, Morelos (MX). ALAGÓN
CANO, Alejandro [MX/MX]; Restomo Nueva Galicia N°6
Colonia Jardines de Refo, rma, 2a Sección, CEP-62260
Cuernavaca, Morelos (MX).

(74) Mandatarios: PANIAGUA SOLÍS, Jorge, F; Amores
N°1304 Colonia Del Valle, Delegación Benito Juárez,
CEP-03100 México D.F. (MX).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: IMMUNOGEN AND ANTIVENOM AGAINST VIOLIN SPIDER VENOM

(54) Título: INMUNÓGENO Y ANTIVENENO CONTRA EL VENENO DE LA ARAÑA VIOLINISTA

AA
Porcentaje de identidad de secuencias entre nucleótidos de diferentes especies de *Loxosceles*

Especie	Ld1	Ld2	Ld3	Ld4	Ld5	Ld6	Ld7	Ld8	Ld9
Ld1	-								
Ld2	81	-							
Ld3	86	89	-						
Ld4	88	88	87	-					
Ld5	85	84	85	88	-				
Ld6	87	85	85	89	89	-			
Ld7	87	85	81	85	85	85	-		
Ld8	86	89	89	85	89	88	88	-	
Ld9	87	85	81	85	85	87	84	85	-

AA — AMINO ACID PERCENTAGE OF IDENTITY BETWEEN NUCLEOTIDES OF DIFFERENT *LOXOSCELES*
SPECIES
88 — SPECIES

(57) Abstract: The invention relates to the isolation, characterization and expression of DNA fragments encoding sphingomyelinas D from three species of *Loxosceles* genus spiders, namely *L. borealis*, *L. reclusa* and *L. laeta*, and the toxoids thereof. The invention also relates to the production of active sphingomyelinas D and the toxoids thereof using recombinant means and to the use of same as an immunogen for the production in vertebrates of antibodies that neutralise the corresponding venom and the respective fragments F(ab')₂. The invention further relates to the use of recombinant sphingomyelinas D as part of an antigen matrix which can be used in the immunopurification of antibodies and the fragments thereof or as part of any diagnostic device used to obtain clinical confirmation that the causal agent of poisoning in a patient is a spider of the *Loxosceles* genus. In addition, the invention includes molecular vectors for the expression of the DNA fragments, strains comprising same, which can express *Loxosceles* sphingomyelinas D, and methods for the expression thereof.

[Continúa en la página siguiente]

WO 2006/025718 A2



AG, AL, AM, AN, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

BB, BS, FI, FR, GB, GR, HU, IR, IS, IT, LI, LU, LV, MC, NI, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR, OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicadas:

- *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe*
- *con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición*

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(57) **Resumen:** La presente invención comprende el aislamiento, caracterización y expresión de los fragmentos de DNA codificantes de las esfingomielinasas D de 3 especies de araña del género *Loxosceles*: *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta* y sus toxoides. También comprende la producción por medios recombinantes de las esfingomielinasas D activas y sus toxoides su uso como inmunógeno para la producción en vertebrados de anticuerpos neutralizantes del veneno correspondiente y de los fragmentos F(ab')₂ respectivos. También se incluye el uso de las esfingomielinasas D recombinantes como parte de una matriz antigénica útil en la inmunopurificación de anticuerpos y sus fragmentos o como parte de algún dispositivo diagnóstico para corroborar en clínica que el agente causal del estado de envenenamiento de un paciente sea una araña del género *Loxosceles*. Así mismo, la invención incluye los vectores moleculares para la expresión de los fragmentos de DNA, las cepas que los comprenden, capaces de expresar las SMD de *Loxosceles* y los métodos para su expresión.

INMUNÓGENO Y ANTIVENENO CONTRA EL VENENO DE LA ARAÑA VIOLINISTA**DESCRIPCIÓN****5 CAMPO TÉCNICO**

La presente invención se refiere a proteínas recombinantes que comprenden la secuencia de la esfingomielinasa D, componente principal del veneno de la araña violinista (*Loxosceles boneti* y *Loxosceles reclusa* y *Loxosceles laeta* (variedad peruana)), las cuales al ser inoculados en mamíferos generan una respuesta inmune eficaz para neutralizar la acción tóxica del veneno total de los respectivos arácnidos. También se refiere al uso de estas proteínas como inmunógenos para la producción en vertebrados de anticuerpos contra los venenos totales de los respectivos arácnidos. También se refiere a las composiciones de dichos anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno y su uso en tratamientos del envenenamiento con la araña violinista, y a una matriz antigénica capaz de ligar específicamente anticuerpos neutralizantes del veneno del arácnido, útil para la purificación por inmunospecificidad de tales agentes seroterapéuticos y faboterapéuticos. Adicionalmente se refiere a un dispositivo diagnóstico que incorpora dicha matriz para determinar la especie a la que pertenece la araña causante de un envenenamiento, y el método para realizar dicho diagnóstico. En otro alcance de la invención también se incluyen los fragmentos de DNA que codifican para las respectivas proteínas recombinantes, y las construcciones de expresión para dichos fragmentos, así como las células bacterianas transformadas con dichas construcciones y el método para producir las proteínas por vía recombinante.

25 ANTECEDENTES

Las arañas que pertenecen al género *Loxosceles* son conocidas comúnmente como violinistas por poseer una marca en forma de violín con el mástil hacia atrás en la parte antero superior del cefalotórax (Platnick, 2000).

Las arañas que están comprendidas en este género son cosmopolitas, generalmente encontrándose en regiones con clima tropical y templado (Ramos, 2000). En nuestro país se pueden encontrar alrededor de 39 especies de este género (Hoffman, 1976; Gerstch, 1983). En su hábitat natural se les puede encontrar en la corteza de árboles, debajo de piedras y en cuevas. Pueden encontrarse coexistiendo con los humanos: debajo de muebles, en los rincones de las paredes, en hendiduras, surcos de instalaciones pecuarias, madera, ladrillos y desperdicios abandonados. Una de las principales causas por las que

se suscitan accidentes de mordedura por *Loxosceles* es, precisamente, la constante convivencia con el hombre.

El envenenamiento causado por la mordedura de una araña del género *Loxosceles* se llama **LOXOSCELIISMO**. EL efecto de la mordedura de la araña violinista comúnmente da lugar a lesiones necróticas locales o dermonecrosis (*Loxoscellismo necrótico*), mientras que en algunos casos llega a causar efectos sistémicos no necrosantes (*Loxoscellismo sistémico*).

El grado de necrosis local se relaciona con el estadio en el que se encuentre la araña, la dosis del veneno que inyecte en la mordedura y el estado inmunitario del paciente (Moye de Alba, 1997; Maguire, 1998).

La dermonecrosis es precedida por edema, acumulación de células inflamatorias y vasodilatación, lo cual culmina con una vesícula negra llamada comúnmente "ojo de buey". Ocasionalmente el género *Loxosceles* puede, además, producir hemólisis intravascular asociada a esferocitosis, alteración que persiste durante varios días (Maguire, 1998; Rossi, 1998).

En México, en el Seguro Social (información personal, Dra. Ma. Del Carmen Sánchez, Hospital "La Raza", México D.F.) se presentaron 15 casos en los últimos 5 años, 11 en adultos y 4 en menores. En el 53.3% de los casos, además del *loxoscellismo necrótico*, se presentó *loxoscellismo sistémico*, de los cuales el 62% murió en consecuencia.

25 Bioquímica del veneno

Hasta el momento pocos venenos de arañas se han estudiado con detalle. El veneno de *Loxosceles* está compuesto por lo menos de diez a doce componentes (Russell, 1987), entre los que figuran: esterasas, fosfatasa alcalina, hialuronidasa, fosfolipasas, lipasas y proteasas, entre otros. Hasta ahora se ha demostrado que el componente principal y causante de la dermonecrosis es la esfingomielinasa D (SMD). Esta enzima se une a las membranas de células (epiteliales, endoteliales del tejido vascular y eritrocitos) hidrolizando a los esfingolípidos para posteriormente liberar fosfoceramida y colina (Gatt, 1978). La hidrólisis induce la quimiotaxis de neutrófilos ocasionando trombosis vascular y una reacción de tipo Arthus (Moye de Alba, 1997; Maguire, 1998; Sánchez, 1993).

Las hialuronidasas, otras enzimas involucradas en el envenenamiento, son comunes en los venenos de casi todas las arañas (Tan y Ponnudurai, 1992). Han sido detectadas

en un número considerable de especies (Garan, 1984) incluyendo a *Loxosceles* sp., aunque en éstas se ha reportado muy baja actividad enzimática (Wright, 1973). Las hialuronidasas están consideradas como factores de dispersión del veneno, debido a que la hidrólisis de ácido hialurónico facilita la difusión del resto de los componentes tóxicos dentro de los tejidos de la víctima (Cevallos et al., 1992). Las hialuronidasas actúan como factor dispersante y las proteasas se piensa que pudieran estar implicadas directamente en la dermonecrosis a través de la digestión de las proteínas que componen la matriz extracelular (Young, 2001).

Recientes estudios han identificado dos proteasas, Loxolaina A y Loxolaina B presentes en *L. intermedia*. Loxolaina A es una metaloproteasa de 20-28 kDa con actividad fibrinolítica (degrada fibrinógeno) y fibronectinolítica (degrada fibronectina). Esta proteína pudiera estar involucrada en los efectos hemorrágicos observados localmente en el sitio de la mordedura y en algunos casos en las hemorragias a nivel sistémico, mientras que Loxolaina B es una proteasa de 32-35 kDa con actividad gelatinolítica, y aunque su función es aún desconocida, posiblemente participa en la degradación de colágeno dentro de la matriz extracelular, (Feltosa et al., 1998).

En *L. intermedia* se han encontrado tres isoformas (P1, P2 y P3) de la fracción necrotóxica, las cuales fueron altamente parecidas entre sí a nivel bioquímico e inmunológico. Siendo las dos primeras necrotóxicas, P2 con un mayor efecto, mientras que la P3 fue completamente inactiva. El análisis de las secuencias aminoacídicas de los primeros 35 aminoácidos del extremo amino terminal de las isoformas reveló una alta identidad entre las mismas. También se compararon con las secuencias parciales de las toxinas de otras especies de *Loxosceles* anteriormente reportadas, obteniendo un alto grado de similitud (Tambourgi, 1998).

En 1968 Smith y Micks demostraron que la inyección en conejos del veneno de *L. reclusa*, de *L. laeta* o de *L. rufescens*, producía reacciones necróticas similares. En recientes estudios se compararon las secuencias amino terminal de la esfingomielinasa del veneno de *L. reclusa*, *L. deserta*, *L. gaucho*, *L. intermedia* y *L. laeta* determinándose homología entre ellas (Barbaro et al., 1998B).

A la fecha se han reportado las secuencias completas de las esfingomielinasas D de solo 2 de las especies de *Loxosceles*, *L. laeta* (Fernandes Pedrosa et al. 2002) y *L. intermedia* (Kalapothakis et. al., 2002) estas presentan una identidad de apenas el 58%

entre sí. Mientras que solamente se conocen los primeros 34 aa de la esfingomielinasa de *L. reclusa*, la cual resulta tener un 85.7% de identidad con la secuencia equivalente de *L. intermedia* y 80% con la de *L. laeta*, por lo que resulta imposible establecer una probable secuencia para los cerca de 244 aa que aún se desconocen de la enzima. Similarmente sólo se conocen 35 aa de la región amino terminal de la esfingomielinasa D de *L. deserta* y 39 de la de *L. gaucho* (para *L. deserta* sólo se conoce la secuencia derivada del gen).

Se han reportado trabajos de generación de anticuerpos contra especies particulares de *Loxosceles* y pruebas cruzadas de los miernos con venenos de arañas de otras especies del género. Por ejemplo se desarrolló un conjunto de anticuerpos monoclonales contra el componente dermonecrotico (de 35Kda) del veneno de *L. gaucho* que siendo efectivos para reconocer y neutralizar el veneno homólogo, su reconocimiento hacia los venenos de *L. laeta* y *L. intermedia* fue mucho menor y su capacidad neutralizante fue casi nula, en comparación con anticuerpos policlonales generados contra el mismo componente de *L. gaucho* que sí reconocieron y neutralizaron de manera suficiente el veneno de *L. intermedia* y de manera parcial (80%) el de *L. laeta*, sugiriendo la presencia de diferentes epítopes en los componentes dermonecroticos de estas especies, así como diferencias en las composiciones y toxicidades de estos venenos (Guliharne, et. al., 2001). Por otro lado, hay evidencia de una marcada reactividad cruzada entre los venenos de *L. reclusa* y *L. deserta* cuando se emplea el veneno de cualquiera de las 2 especies para generar los anticuerpos (Gomez, et. al. 2001).

En términos generales existen dos líneas para el tratamiento/prevención del envenenamiento por animales ponzoñosos como la araña violinista: la inmunización pasiva (mediante agentes seroterápicos y faboterápicos) y la inmunización activa (a través de vacunas), la primera es una medida terapéutica, mientras que la segunda es más bien una medida preventiva.

En la generación de vacunas han sido utilizado tanto venenos como toxinas aisladas. Sin embargo, la exposición a la mayoría de venenos no resulta en una inmunidad protectora. Más aún, todos los intentos por crear inmunidad protectora contra venenos como vacunas han fracasado (Russell, 1971). En contraste, ha habido éxitos creando este tipo de inmunidad contra toxinas individuales, incluyendo las vacunas contra la difteria (Audibert et. al., 1982), el tétanos (Alouf, 1985), el toxoide de la α -Latrotoxina (Alegón et. al. 1998) y la esfingomielinasa D de *L. laeta* (Araujo, et. al. 2003).

Inmunización Pasiva

El único tratamiento disponible para envenenamientos es la inmunización pasiva, además de tratamientos paliativos de algunos de los síntomas específicos.

- 5 En el caso de la inmunización pasiva, los anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unirán al veneno (antígeno) son exógenos, es decir que son producidos en un primer animal. El suero o antiveneno del primer animal se administra entonces al individuo ya afectado por envenenamiento (huésped) para proveerle una fuente inmediata y activa de anticuerpos específicos y reactivos. Los anticuerpos o sus fragmentos suministrados
10 funcionarán pues, en cierta forma como si fueran anticuerpos endógenos, ligando las toxinas del veneno y neutralizando su toxicidad.

- La generación comercial de anti-venenos se puede realizar, dependiendo de su uso final, en diversos mamíferos tales como ratones, conejos, cabras, vacas y caballos, siendo
15 el caballo el animal de elección de la mayoría de laboratorios, ya que es robusto y tolerante al proceso de inmunización y sobre todo por que produce altos rendimientos (hasta 16 L por sangrado).

- Sin embargo, hay algunas desventajas técnicas en el uso de caballos para la
20 producción de antivenenos entre las cuales se encuentra la necesidad de cantidades grandes de veneno (inmunógeno o antígeno) para realizar la inmunización, forzando al laboratorio a contar con grandes áreas de aracnarios o contratar grandes colectas de especímenes a fin de contar con suficientes cantidades de veneno. Por ejemplo, se estima que la producción, valoración y control de calidad de un lote de antiveneno en caballos
25 requiere del veneno proveniente de cinco mil arañas muy bien estandarizado, lo que limita su factibilidad comercial. Por lo que el contar con inmunógenos recombinantes capaces de despertar una respuesta inmunológica comparable a la que despiertan los venenos aplicados, puede ser una alternativa considerable para la producción de antivenenos, pues se tendrían inmunógenos estables y consistentes y en cantidades suficientes, con costos y
30 riesgos mucho menores que el mantenimiento de los aracnarios o el impacto a los ecosistemas de las colectas masivas.

- Existen particularmente dos reportes del uso de proteínas recombinantes como
inmunógenos para la generación de anticuerpos en mamíferos contra venenos de arañas,
35 que son el toxoide de la α -Latrotoxina (Alagón et. al. 1998) y una proteína de fusión que

comprende la secuencia de la esfingomielinasa D de *Loxosceles intermedia* (Araujo, et. al 2003).

En México y Latinoamérica uno de los principales productores de antivenenos contra venenos de serpientes y arácnidos (alacrán y araña viuda negra) es el Instituto Bioclón S.A. de C.V. que produce los anticuerpos en caballos para luego purificarlos e hidrolizarlos de manera tal que sus antivenenos son en realidad fragmentos $F(ab)_2$ de los anticuerpos, es decir, son agentes faboterápicos. Particularmente producen un antiveneno contra el veneno de la araña viuda negra, el Aracmyn®.

10

Debido a la variedad de efectos colaterales comunes y serios de antivenenos no purificados, el médico debe tener mucha precaución para evitar dar cantidades excesivas de productos equinos. Una teoría generalmente aceptada es que la alta incidencia de efectos colaterales con los antivenenos de caballo actuales es debida al exceso de proteína irrelevante en las mismas (irrelevante en el sentido de no tener actividad específica contra el veneno). De acuerdo con esta teoría, la remoción de tal proteína irrelevante podría reducir la carga de proteína exógena aplicada al organismo y, consecuentemente, reducir la incidencia de respuestas inmunes adversas.

15

Algunos investigadores en el estado de la técnica han considerado la posibilidad de la purificación por Inmunoadfinidad. La mayoría de esos estudios sólo han examinado anticuerpos contra una sola toxina, por ejemplo Yang (1977) probó la purificación por inmunoadfinidad de anticuerpos contra una toxina de veneno de serpiente. Este investigador usó la cobratoxina, una proteína neurotóxica aislada del veneno de la cobra de Taiwan (*Naja naja atra*), ligada a sepharose, como matriz antigénica y usando ácido fórmico para eluir los anticuerpos toxina-específicos. Se reportó que los anticuerpos así purificados tuvieron una mayor capacidad para neutralizar la toxina que el suero sin purificar.

20

25

Otros investigadores han seguido esquemas similares de purificación como Kukongviriyapan et. al., (1982) que utilizó la toxina 3 de *Naja naja siamensis* ligada a diversos materiales para formar matrices antigénicas, logrando una separación de anticuerpos específicos de caballo; Ayeb y Delori (1984) quienes también siguieron el esquema de Yang para purificar anticuerpos contra toxinas específicas de alacrán y Lomonte et al. (1985), quien purificó anticuerpos contra la miotoxina de *B. asper* acoplada a Sepharose.

30

35

De este modo, nuevamente el contar con esfingomielinasas recombinantes capaces de ligar, preferentemente unidos a una matriz inerte, de manera específica sólo aquellos anticuerpos o sus fragmentos que tienen una alta especificidad hacia el componente necrotóxico del veneno de la araña violinista, puede ser de gran ayuda para remover toda la proteína irrelevante para el tratamiento del envenenamiento, reduciendo significativamente los riesgos de reacciones inmunes adversas.

No es poco común que tras un incidente con *Loxosceles*, el médico tratante o incluso el paciente afectado o sus padres en caso de menores, asuman erróneamente que se trate del piquete de algún insecto o mordedura de algún otro tipo de araña y que por tanto apliquen un tratamiento insuficiente o erróneo al paciente. Para cuando empiecen a aparecer los síntomas inequívocos del loxocelismo, la necrosis del tejido adyacente a la herida pudiera estar ya muy avanzada y sólo encontrar remedio en el injerto de piel. En este sentido sería conveniente contar con un sistema diagnóstico de fácil lectura, que permita al médico tratante determinar en las primeras horas posteriores al incidente si efectivamente se trata de una mordedura de la violinista e iniciar de manera inmediata un tratamiento efectivo que evite el desarrollo de la necrosis.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Cromatograma de la filtración de exclusión molecular en gel (Sephadex G-75) del extracto de glándulas de *L. boneti*. Los números romanos corresponden a las distintas fracciones obtenidas. La línea roja corresponde a la absorbancia a 280 nm y la azul a 280 nm.

Figura 2. Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía en gel. 1) Marcadores de Peso Molecular. 2) Fracción I (2.24 µg). 3) Fracción II (3.84 µg). 4) Fracción III (1.44 µg). 5) Fracción IV (8 µg), 6) Usado de glándulas de *L. boneti* (28µg).

Figura 3. Resultado de la Cromatografía de Intercambio catiónico de la fracción II de *L. boneti*. Cada pico representa una isoforma. Las flechas señalan otras posibles isoformas que se encuentran en menor cantidad dentro de la fracción II. La columna fue de tipo Mono S. La columna midió 5 cm de largo por 0.5 cm de diámetro. La velocidad de flujo fue de 1ml/min. La sensibilidad fue 0.2 AU. El buffer utilizado fue acetato de amonio 20 mM pH 4.7, utilizando un gradiente de 0-2 M NaCl. La velocidad de graficación fue de 15cm/hr.

17

Figura 4. Se muestra el alineamiento de las secuencias de las 5 proteínas con actividad SMD que están comprendidas por las proteínas recombinantes de la presente invención, con algunas otras reportadas en la literatura.

5	Número de acceso en el Gene Bank:		especie
	*Lb1. AY559844		<i>L. boneti</i>
	*Lr1. AY559846	<i>L. reclus</i>	
10	*Lr2. AY559847		<i>L. reclusa</i>
	*Lj1. _____		<i>L. laeta</i>
	*Lj2. _____		<i>L. laeta</i>
	La. AAP44735		<i>L. arizonica</i>
	Lj. AAQ16123		<i>L. laeta</i>
15	Lj.H17. AAM21154		<i>L. laeta</i>
	Lj.H13. AAM21155		<i>L. laeta</i>

* Esta Patente

Figura 5. Se presentan los porcentajes de identidad de aminoácidos entre las esfingomielinasas D de diversas especies de *Loxosceles*.

	Número de acceso en el Gene Bank:		especie
25	*Lb1. AY559844		<i>L. boneti</i>
	*Lr1. AY559846	<i>L. reclus</i>	
	*Lr2. AY559847		<i>L. reclusa</i>
	*Lj1. _____		<i>L. laeta</i>
	*Lj2. _____		<i>L. laeta</i>
30	La. AAP44735		<i>L. arizonica</i>
	Lj. AAQ16123		<i>L. laeta</i>
	Lj.H17. AAM21154		<i>L. laeta</i>
	Lj.H13. AAM21155		<i>L. laeta</i>

* Esta Patente

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones.

El término "anticuerpo" se usado para referirse a anticuerpos policlonales y sus fragmentos.

El término "fragmento" referido a anticuerpos, comprende una porción del anticuerpos completo, generalmente el fragmento de unión al antígeno, por ejemplo fragmentos Fab,

Fab', F(ab')₂, y Fv.

Los términos "Neutralizar" o "neutralizante" o "anticuerpo neutralizante" se refieren a la capacidad de los anticuerpos de la presente invención de unirse a la esfingomielinasa D de arañas del género *Loxosceles* ya sea aislada o como parte del veneno total de dichas arañas, y cancelar su efecto tóxico y el de dicho veneno.

5

El término "Tratamiento" se refiere a un tratamiento terapéutico. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen a aquellos individuos mordidos por una o más arañas del género *Loxosceles*.

10

El término "Toxoida" se refiere a una versión mutante de las proteínas recombinantes (SMD recombinantes) de la presente invención que carecen de actividad enzimática y dermonecrótica, pero que conservan la propiedad de generar anticuerpos neutralizantes del veneno de la araña *Loxosceles* al ser utilizadas para inmunizar vertebrados, particularmente mamíferos.

15

Por "acarreador farmacéuticamente aceptable" se entiende un excipiente sólido o líquido, diluyente o sustancia la que se puede utilizar con seguridad en la administración sistémica o tópica. Dependiendo de la ruta particular de administración, una variedad de acarreadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en el estado del arte incluye excipientes sólidos o líquidos, diluyentes, hidrotopos, agentes activos de superficie, y sustancias encapsuladoras. La cantidad del acarreador que se emplea en conjunción con los anticuerpos o sus fragmentos $F(ab)_2$ proporciona una cantidad práctica manejable de material por dosis unitaria de la composición.

20

25

Los acarreadores aceptables para la administración sistémica que se pueden incorporar en la composición de la presente invención incluyen azúcar, almidones, celulosa, aceites vegetales, buffers, polioles y ácido alginico. Los acarreadores específicos farmacéuticamente aceptables se describen en los siguientes documentos, todos los cuales se encuentran incorporados por referencia al presente: patente estadounidense 4,401,663 Buckwalter et al. emitida el 30 de agosto de 1983; Solicitud de Patente Europea Núm. 089710, LaHann et al., publicada el 28 de septiembre de 1983; y Solicitud de Patente Europea Núm. 0068592, Buckwalter et al., publicada el 5 de enero de 1983. Los acarreadores preferidos para la administración parenteral incluyen propileno glicol, pirrolidol, oleato etílico, etanol acuoso y combinaciones de lo anterior.

30

35

Los acarreadores representativos incluyen la acacia, agar, alginatos, hidroxalquilcelulosa, hidroxipropil-metil-celulosa, carboximetilcelulosa, carragenina,

celulosa en polvo, goma guar, colesterol, gelatina, goma de agar, goma arábica, goma de karaya, goma de ghatti, goma de algarroba, octoxinol 9, alcohol olílico, pectina, ácido poliacrílico y sus homólogos, polietilenglicol, alcohol polivinílico, poliacrilamida, lauril sulfato de sodio, óxido de polietileno, polivinilpirrolidona, monoestearato de glicol, monoestearato de propilen glicol, goma xantana, tragacanto, ésteres de sorbitan, alcohol estearílico, almidón y sus modificaciones. Los rangos apropiados varían de alrededor del 0.5% a alrededor del 1%.

Como se desprende de los antecedentes, a diferencia del problema de envenenamiento por la araña viuda negra (*Latrodectus mactans*) para la que ya existen algunos tratamientos por antivenenos (fragmentos $F(ab)_2$ de anticuerpos policlonales de caballo), para el loxoscelismo, aún no existe ningún tratamiento comercial. La generación de antivenenos por inmunización con veneno de la araña pudiera ser una alternativa, sin embargo, tiene el inconveniente de que se requeriría de una gran cantidad de arañas (unas 5,000 por lote) para extraerles cantidades suficientes de veneno, además su uso implica que el suero producido por el animal contiene una gran cantidad de anticuerpos contra las muy diversas proteínas del veneno, la gran mayoría de las cuales no tienen o tienen efectos mínimos en el proceso de envenenamiento en mamíferos y, por tanto, los anticuerpos contra las mismas no tienen mayor aporte al tratamiento del envenenamiento y al en cambio contribuyen una gran cantidad de proteína exógena al organismo en tratamiento, pudiendo ocasionar daños laterales severos. En general, algunos enfoques que se han seguido para reducir esa cantidad de proteína, han sido el separar la fracción de inmunoglobulinas del suero, eliminando otras proteínas séricas (como la albúmina) por precipitación con sulfato de amonio o sodio, con la correspondiente disminución de la actividad neutralizante, y la hidrólisis con tripsina o papaína de tal fracción para liberar los fragmentos $F(ab)$ o $F(ab)_2$, que conservan la actividad neutralizante. Sin embargo, la fracción de anticuerpos o sus fragmentos siguen teniendo una alta proporción de proteína irrelevante (por ser fragmentos de anticuerpos contra todos los componentes del veneno total y contra múltiples antígenos indefinidos).

Este problema podría ser resuelto mediante una purificación por inmunospecificidad si se contara con una matriz inmunógena que permitiera separar de manera específica de la fuente de inmunoglobulinas o de los fragmentos producto de su hidrólisis, aquellos anticuerpos o fragmentos específicos, responsables de la neutralización del efecto tóxico del veneno total.

11

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, existe una necesidad de contar con un sistema diagnóstico confiable que de manera rápida y sencilla permita al médico tratante determinar si se trata de una mordedura de *Loxosceles* y poder entonces proceder inmediatamente a aplicar un tratamiento adecuado que evite la necrosis del tejido adyacente a la zona de la mordedura.

Para resolver estos problemas, los inventores de la presente invención han abordado la estrategia de caracterizar el veneno de *L. boneti*, aislar y purificar su componente demonecrótico y aislar y caracterizar el ADN codificante del mismo, así como el ADN codificante del componente demonecrótico de *L. reclusa* y *L. laeta* (variedad peruana), clonar las secuencias codificantes en vectores de expresión adecuados, expresar las proteínas recombinantes activas y probarlas en cuanto a su capacidad de generar una respuesta inmune eficaz en la neutralización de la propia necrotoxina y del veneno homólogo total, así como en pruebas de reacción cruzada, del veneno de estas especies de *Loxosceles*.

Las proteínas recombinantes activas de *L. boneti* (SMDrLb), *L. reclusa* (SMDrLr) y *L. laeta* (variedad peruana) (SMDrLi) pueden ser utilizadas como inmunógenos para la generación de antivenenos en vertebrados; ligadas a soportes sólidos o semisólidos para generar matrices antigénicas útiles para inmunopurificaciones de antivenenos; y en el diseño y construcción de sistemas diagnósticos para determinar si un paciente padece de loxoscelismo.

Como se detalla en el ejemplo 1, los inventores de la presente invención separaron el veneno total de *L. boneti* en fracciones, encontrando que sólo la fracción II presenta actividad demonecrótica y lograron separar 3 isoformas del componente demonecrótico. Encontraron que sólo las isoformas I y II son activas, siendo la primera la de mayor actividad, y obtuvieron la secuencia aminoacídica del amino terminal de las tres isoformas, mismas que se usaron para diseñar los oligos específicos para obtener las clonas del componente necrotóxico a partir del RNAm extraído de glándulas venenosas de las arañas (ver ejemplo 3) siendo seleccionada la clona 30-8 para su expresión. Para ello la clona 30-8 fue subclonada en el plásmido pTrcHIS-TOPO, obteniéndose el plásmido pTrcHIS-TOPO 30-8 (ver detalles en el ejemplo 4) y expresada en *E. coli* XL1 Blue lográndose su expresión en forma de cuerpos de inclusión, que fueron solubilizados y refoldados. La proteína recombinante solubilizada y refoldada careció de actividad esfingomielinasa D (SMD) y demonecrótica y los anticuerpos generados en conejos contra la misma, aunque

capaces de reconocer la proteína mediante Western Blot, fueron incapaces de neutralizar el veneno completo de la araña *L. boneti*.

Tras un análisis, se consideraron los siguientes factores para tratar de expresar la proteína recombinante en forma soluble y activa: I) La secuencia del fragmento utilizado carecía de los primeros 4 codones por lo que la secuencia aminoacídica de la proteína recombinante carecía de los primeros 4 aminoácidos del extremo amino terminal; II) el vector pTrcHis-TOPO tiene justo antes del sitio de corte de BamH I la secuencia de 36 aa, incluyendo la metionina inicial y una cola de 6 histidinas útiles para la recuperación de la proteína, que más los 2 codones ocupados por el sitio de BamH I, le agregan un total de 38 aminoácidos a la proteína recombinante, los cuales pudieran ser responsables del mal plegamiento de la misma; y III) es sabido (véase el pET System Manual) que algunas cepas de *E. coli* pueden favorecer el plegamiento adecuado de algunas proteínas recombinantes que expresan. Adicionalmente, se había reportado la expresión exitosa de la proteína recombinante que comprende la secuencia aminoacídica de una de las isoformas de la esfingomielinasa D de *L. laeta* en *E. coli* BL21 (Fernandes Pedroza, et. al. 2002).

Por ello se decidió completar la secuencia codificante (los 4 aminoácidos faltantes) como se muestra en el ejemplo 5; cambiar al vector de expresión pQE-30 que sólo agrega 12 aminoácidos a la proteína recombinante en su extremo amino terminal; y expresarlo en la cepa BL21 de *E. coli* (ver ejemplo 6). Nuevamente se obtuvo una expresión, aunque cuantiosa, en forma de cuerpos de inclusión con una actividad enzimática despreciable.

Es sabido que si la expresión es demasiado cuantiosa, toda la proteína se acumula en forma de cuerpos de inclusión, por lo que puede ser recomendable tratar de reducir la expresión de la proteína. Para lo cual se realizó una expresión controlada de la proteína, como se detalla en el ejemplo 7, lográndose esta vez expresar la proteína tanto en forma de cuerpos de inclusión como soluble, que una vez purificada demostró tener la misma actividad específica que la isoforma I nativa, y con una LD50 de 2.55 µg por ratón.

La esfingomielinasa D recombinante soluble de *L. boneti* (SMDrLb) así producida fue utilizada para inmunizar conejos (ver ejemplo 8) obteniéndose títulos de hasta 29,300. Los anticuerpos resultantes fueron neutralizantes tanto de la proteína recombinante activa (DE50 = 154.8 µl/ratón para 7.8 µg del antígeno), como del propio veneno nativo de la araña *L. boneti* (DE50=149.6 µl/ratón con 3 DL50 del veneno nativo).

Con base en la experiencia seguida para la obtención de la esfingomielinasa D (el componente dermonecrótico) de *L. boneti*, se procedió a obtener las esfingomielinases D de *L. reclusa* y *L. laeta* (variedad peruana). En el primer caso se conoce de la literatura la secuencia aminoacídica de los primeros 34 aminoácidos del amino terminal de la esfingomielinasa D de *L. reclusa* (Barbaro, K.C. et. al., 1996) y al coincidir exactamente los primeros 5 aminoácidos con los correspondientes de *L. boneti*, se decidió utilizar los mismos oligos para obtener el cDNA del componente dermonecrótico a partir del RNAm extraído de glándulas de la araña (ver ejemplo 9). En este caso se obtuvieron los cDNA de dos isoformas activas de la SMD de *L. reclusa*, SMDrLr1 y la SMDrLr2 (con un 90% de identidad entre sí) con actividad de 27.2 U/mg para la SMDrLr1 y 11.47 U/mg para la SMDrLr2. Similarmente a lo realizado para *L. boneti*, los inventores subclonaron las clonas en el plásmido pQE-30 y se expresaron en forma controlada en la cepa de *E. coli* BL21 (ver ejemplo 10). Para ejemplificar su uso como inmunógenos para la generación de anticuerpos neutralizantes del veneno de la araña *L. reclusa*, una de las esfingomielinases D recombinantes solubles y activas de *L. reclusa* así producida, la SMDrLr1 fue utilizada para inmunizar conejos (ver ejemplo 11) obteniéndose títulos de hasta 33,000. Los anticuerpos resultantes fueron neutralizantes tanto de la proteína recombinante activa (DE50 = 165 µl/ratón con 12 µg de proteína recombinante), como del propio veneno nativo de la araña *L. reclusa* (DE50=175 µl/ratón con 12 µg de veneno).

20

En el segundo caso, se conoce de la literatura la secuencia aminoacídica completa de algunas de las isoformas activas de la esfingomielinasa D de *L. laeta* (variedad Brasileña) (Fernandes Pedrosa et. al., 2002). Con base en ellas, se diseñaron los oligos LI5'Bam HI y LI3'Sal I para obtener el cDNA del componente dermonecrótico a partir del RNAm extraído de glándulas de la araña (ver ejemplo 12). En este caso los inventores lograron aislar los cDNA de 2 isoformas distintas entre sí y activas, la primera de ellas la SMDrLl1 con una actividad de 58.43 U/mg y la segunda SMDrLl2 con una actividad de 252 U/mg. Similarmente a lo realizado para *L. boneti* y *L. reclusa*, los inventores subclonaron las clonas en el plásmido pQE-30 y se expresaron en forma controlada en la cepa de *E. coli* BL21 (ver ejemplo 13). Al ser secuenciados los fragmentos de ADN codificantes una de las proteínas codificadas, la SMDrLl1 resultó tener una secuencia primaria ligeramente distinta (99% de identidad) a la reportada por Fernandes Pedrosa, et. al. para la isoforma H17 (que es la isoforma que reporta como activa), mientras que la SMDrLl2, que en la presente invención resulta tener cerca de 3 veces la actividad de la SMDrLl1, presentó una secuencia 94% idéntica a la isoforma H13 que es reportada por Fernandes Pedrosa, et. al. como inactiva. Para ejemplificar su uso como inmunógenos para la generación de

35

14

anticuerpos neutralizantes del veneno de la araña *L. reclusa*, una de las esfingomielinasas D recombinantes solubles y activas de *L. laeta* (variedad peruana) así producidas, la SMDrL1 fue utilizada para inmunizar conejos (ver ejemplo 14) obteniéndose anticuerpos neutralizantes tanto de la proteína recombinante activa (DE50 = 200µl por ratón para 12µg de proteína) como del propio veneno nativo de la araña *L. laeta* (variedad peruana) (DE50= 225µl por ratón para 12µg de veneno).

Las proteínas recombinantes de la presente invención SMDrLb, SMDrLr1, SMDrLr2, SMDrL1 y SMDrL2 fueron expresadas utilizando el plásmido pQE30, que adiciona a la región amino (versiones amino) de la proteína una secuencia de 12 aminoácidos MRGSHHHHHHGS (SEQ. ID. NO: 25) que incluyen una cola de 6 Histidinas. Sin embargo, pueden ser expresadas en otros sistemas de expresión que introduzcan ya sea al extremo amino o al carboxilo de las proteínas otras secuencias de aminoácidos. Un ejemplo es el plásmido pQE60 (INVITROGEN) que incluye en la región amino solo los aminoácidos Metionina, Glicina y Serina, mientras que en el extremo carboxilo incluye una secuencia de 8 aminoácidos RSHHHHHH (SEQ. ID. NO: 26). En el ejemplo 16 se subclonaron las clones Lb1, Lr1, Lr2 y L2 en el plásmido pQE60 y se expresaron de manera controlada para obtener las versiones carboxilo de las proteínas (con la cola de Histidinas en dicho extremo). Las proteínas recombinantes obtenidas que al igual que las versiones amino respectiva comprenden las secuencias SEQ.ID.NO:11, SEQ.ID.NO:13, SEQ.ID.NO:15 y SEQ.ID.NO:21, resultaron activas.

Un primer alcance de la presente invención se refiere, pues, a las proteínas recombinantes SMDrLb, SMDrLr1, SMDrLr2, SMDrL1 y SMDrL2, sin importar si se trata de sus versiones amino (con la cola de Histidinas en el extremo amino) o versiones carboxilo (con la cola de Histidinas en dicho extremo) que comprenden las secuencias de las esfingomielinasas D nativas de las arañas *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta* respectivamente SEQ. ID. No: 11, SEQ. ID. No: 13, SEQ. ID. No: 15, SEQ. ID. No: 19 y SEQ.ID.No:21 o variantes o mutantes de dichas secuencias, y que presentan actividad de esfingomielinasa D.

Un segundo alcance de la presente invención se refiere a los fragmentos de DNA que comprenden las secuencias codificantes de las proteínas recombinantes SMDrLb, SMDrLr1, SMDrLr2, SMDrL1 y SMDrL2, con secuencia SEQ. ID. No: 10, SEQ. ID. No: 12, SEQ. ID. No: 14, SEQ. ID. No: 18 y SEQ.ID.No: 20, respectivamente, cuya obtención se detalla en los ejemplos 6, 9 y 12

Es conocido que el código genético es degenerado, es decir, que para un mismo aminoácido suele haber más de un codón codificante, comúnmente, la diferencia entre esos codones es la tercera de las bases. Es obvio para un experto en el estado de la técnica, que es posible llevar a cabo sustituciones de algunas bases en cualquiera de las secuencias nucleotídicas codificantes de las proteínas recombinantes de la presente invención (SMDrLb, SMDrLr1, SMDrLr2, SMDrLi1 y SMDrLi2), que codifiquen exactamente las mismas secuencias aminoacídicas que las presentadas en las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 21, generándose "mutaciones silenciosas" de las mismas. Esto puede ser particularmente útil cuando se desea expresar las proteínas recombinantes de la presente invención en hospederos recombinantes distintos, pues es sabido que diferentes tipos de hospederos tienen una "preferencia" de uso hacia ciertos codones para determinados aminoácidos. Tales "mutaciones silenciosas" caen dentro del alcance de la presente invención, pues el producto de su expresión es nuevamente las mismas proteínas recombinantes SMDrLb, SMDrLr1, SMDrLr2, SMDrLi1 y SMDrLi2 de la presente invención.

Por otro lado, también es obvio para un experto en el estado de la técnica que es posible sustituir algunos aminoácidos fuera del sitio activo de la proteína por otros de características semejantes de las secuencias aminoacídicas, por ejemplo, un aminoácido polar por otro polar, uno aromático por otro aromático, uno cargado por otro, etc. No se espera que tales mutaciones produzcan cambios sustantivos en la actividad de las proteínas recombinantes, por ello aquellas mutaciones puntuales o sitio-específicas a los fragmentos de DNA codificantes de las proteínas recombinantes de la presente invención, que produzcan proteínas funcionalmente equivalentes (es decir que tengan actividad de esfingomielinasa D y causen demonecrosis a un mamífero inoculado con ellas) quedan comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

En un alcance adicional, la presente invención se refiere a mutantes de las proteínas recombinantes de la presente invención y sus DNA codificantes, que constituyen toxoides de las mismas, es decir que carecen de actividad enzimática como esfingomielinasa D y del efecto demonecrótico, pero retienen la propiedad de ser expresadas en forma soluble con los métodos antes descritos y de generar por inmunización de vertebrados, particularmente mamíferos, anticuerpos neutralizantes del veneno de la araña *Loxosceles*.

Particularmente con base en la descripción del centro activo de una de las isoformas de la esfingomielinasa D de *L. laeta* (Murakami et. al. 2005) donde se evidencia que la unión al

- sustrato y el estado de transición de la enzima son estabilizados por el ión Mg^{2+} el cual forma un enlace de coordinación con los aminoácidos Glu32, Asp34 y Asp91 y moléculas del solvente. En el mecanismo catalítico ácido-base propuesto por los autores, los aminoácidos His12 y His47 juegan un papel clave (todos los aminoácidos contados a partir del extremo amino terminal de la proteína madura). Por ello esos 5 aminoácidos resultan ser blancos especialmente atractivos para llevar a cabo un mutagénesis dirigida buscando obtener mutantes que resulten toxoides de las esfingomielinasas D de arañas *Loxosceles*. En *L. boneti* y *L. reclusa*, el equivalente de estos aminoácidos son Glu31, Asp33 y Asp91 y las His 11 y His47. Particularmente se consideró que realizar las mutaciones sobre el Glu32 (o Glu31 para *L. boneti* o *L. reclusa*) sería altamente atractivo para llevar a cabo la sustitución de un aminoácido, que rompa el enlace de coordinación con el ión Mg^{2+} y sobre la His12 (o His11 para *L. boneti* o *L. reclusa*) sería altamente atractivo para realizar la sustitución de un aminoácido, que sin interferir con la dimerización de la esfingomielinasa D, la haga perder su actividad enzimática.
- Para probar esto, a modo ilustrativo, más no limitativo, como se muestra en el ejemplo 18, se construyó un toxoide de la proteína recombinante SMDrLb, con la sustitución de la Histidina 11 por Lysina generando la SEQ.ID.No: 27 que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ.ID.No:28. simultáneamente se construyó un toxoide de la misma proteína recombinante SMDrLb con el Glu31 sustituido por Lysina generando la SEQ.ID.No: 29 que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ.ID.No:30. Dichas mutaciones ocasionan que las proteínas expresadas (SMDrLb(H11K) y SMDrLb(E31K), respectivamente) por los métodos antes descritos carezcan de actividad enzimática como esfingomielinasa D y del efecto dermonecrótico, pero retengan la propiedad de ser expresadas en forma soluble con los métodos antes descritos y de generar por inmunización de vertebrados, particularmente mamíferos, anticuerpos neutralizantes del veneno de la araña *Loxosceles* (al menos *L. boneti*).

- Otro alcance de la presente invención se refiere al vector de expresión en el que se clonan los fragmentos de DNA que comprenden cualquiera de las secuencias SEQ. ID. NO: 10, SEQ. ID. NO: 12, SEQ. ID. NO: 14, SEQ. ID. NO: 18, SEQ. ID. NO: 20, SEQ. ID. NO: 27 y SEQ. ID. NO 29. Existe una gran diversidad de vectores de expresión por lo que en su elección se deben considerar que el No. de aminoácidos agregados a la proteínas recombinantes no sea tan grande que reduzcan drásticamente la solubilidad y/o la actividad del producto de expresión. Algunos ejemplos de vectores de expresión son los pQ30 y pQ80 de QIAGEN. Obviamente otro elemento a considerar en la elección, es la cepa bacteriana a utilizar.

Otro alcance de la presente invención se refiere a la cepa bacteriana recombinante a utilizar en la expresión de las proteínas recombinantes de la presente invención. *Escherichia coli*, es la especie bacteriana mejor conocida y es ampliamente utilizada en la expresión de proteínas recombinantes, por lo que la cepa bacteriana recombinante de la presente invención, preferentemente es de esta especie. Como ya se ha mencionado, algunas cepas favorecen el plegamiento de las proteínas recombinantes que expresan. Un ejemplo de este tipo de cepas es la *Escherichia coli* BL21. De este modo la cepa bacteriana recombinante de la presente invención preferentemente es *E. coli* BL21.

10

Otro alcance de la presente invención se refiere a los métodos recombinantes para producir las proteínas SMDrLb, SMDrLr1, SMDrLr2, SMDrLi1, SMDrLi2, o sus toxoides mediante el uso de los fragmentos de DNA con secuencia SEQ. ID. No: 10, SEQ. ID. No: 12, SEQ. ID. No: 14, SEQ. ID. No: 18, SEQ. ID. No: 20, SEQ. ID. No: 27 y SEQ. ID. No: 29 respectivamente. Esto se ilustra en los ejemplos 7, 10 y 13. De este modo un método general para la producción de las proteínas recombinantes de la presente invención comprende los pasos de:

15

a) incubar en un medio adecuado y en condiciones adecuadas de cultivo, una cepa bacteriana recombinante transformada con un vector de expresión que comprende un fragmento de DNA seleccionado del grupo que consiste de los fragmentos de DNA con secuencia SEQ. ID. NO: 10, SEQ. ID. NO: 12, SEQ. ID. NO: 14, SEQ. ID. NO: 18, SEQ. ID. NO: 20, SEQ. ID. NO: 27 y SEQ. ID. NO: 29.

20

b) opcionalmente, separar del medio la masa celular y

c) romper las células para liberar la proteína y

25

d) opcionalmente separar y purificar la proteína recombinante.

La selección del sistema de expresión vector-huésped puede ser variada, en la presente invención a modo ilustrativo más no limitativo, se eligió la cepa BL21 de *E. coli* para ser utilizada en los métodos de producción de las proteínas recombinantes de la presente invención y se realizó una expresión controlada de las mismas, mediante una inducción con IPTG 0.1 mM, por lo que preferentemente, en el método para la producción de las proteínas recombinantes de la presente invención, al alcanzarse una masa celular adecuada, se induce la expresión con una concentración de IPTG de 0.1mM, a una temperatura entre 20 y 25°C y por un período de al menos 12 a 20 hr.

30

Otro alcance de la presente invención se refiere a el uso de las proteínas recombinantes SMDrLb, SMDrLr1, SMDrLr2, SMDrLi1, SMDrLi2, SMDrLb(H11K) y

35

SMDrLb(E31K) como inmunógenos para la generación en vertebrados, de anticuerpos neutralizantes del veneno total de arañas del género *Loxosceles* con vistas a la producción industrial de antivenenos contra los venenos de tales arañas. Esto se ilustra claramente en los ejemplos 8, 11 y 14 en conejos y en el ejemplo 17 en caballos, aunque se ya también conocida la producción de anticuerpos en aves como la gallina. Para ello se utiliza un composición inmunogénica que comprende al menos una de las proteínas recombinantes de la presente invención. Típicamente una composición inmunogénica de este tipo puede adicionalmente comprender algún sistema amortiguador de pH y algún adyuvante como el adyuvante completo o incompleto de Freund. Un método para producir anticuerpos neutralizantes del veneno de arañas del género *Loxosceles*, conforme a la presente invención, comprende el inyectar en un vertebrado, una cantidad efectiva suficiente para generar anticuerpos, de una composición inmunogénica, como la arriba descrita que comprende al menos una de las proteínas recombinantes de la presente invención. El vertebrado, preferentemente es un mamífero, pudiendo ser entre otros un conejo, una oveja, una cabra o preferentemente un caballo, como lo ilustra el ejemplo 17. Preferentemente, dicho método incluye recuperar del animal los anticuerpos, típicamente del suero o plasma sanguíneo. Preferentemente dichos anticuerpos son neutralizantes del efecto tóxico *in vivo* del veneno total de la araña *Loxosceles*, preferentemente de especies seleccionadas del grupo que consiste de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*.

20

Un alcance adicional de la presente invención se refiere a las composiciones que comprenden los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno, neutralizantes del efecto *in vivo* del veneno de la araña *Loxosceles*, producidos por el método arriba descrito. Dichas composiciones comprenden anticuerpos generados contra al menos una de las proteínas recombinantes de la presente invención. Preferentemente, la araña es de una especie seleccionada del grupo que consiste de *L. boneti*, *L. reclusa* o *L. laeta*.

25

Dado que los anticuerpos generados contra las proteínas recombinantes de la presente invención, ya sea en forma aislada o como una mezcla de inmunógenos, han demostrado ser neutralizantes del veneno de la araña *Loxosceles*, pueden ser utilizados como parte de una composición farmacéutica para tratar pacientes que han sido mordidos por la araña *Loxosceles*, particularmente las especies *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*. Opcionalmente la composición farmacéutica puede incluir acarreadores farmacéuticamente aceptables como los antes descritos.

30

De acuerdo a ello, otro alcance de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos neutralizantes (o sus fragmentos)

35

24 27
producidos mediante los métodos arriba descritos, usando como inmunógenos una o más de las proteínas recombinantes de la presente invención, donde dicha composición neutraliza el efecto tóxico del veneno de la araña *Loxosceles* y es útil para tratar individuos mordidos por dicha araña *Loxosceles*.

5

En otro alcance, la presente invención se refiere a un método para tratar individuos que necesiten dicho tratamiento, particularmente individuos que hayan sido mordidos por la araña *Loxosceles*, particularmente *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*, donde dicho método comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente efectiva de la

10

composición farmacéutica antes descrita. La composición farmacéutica puede ser administrada local o sistémicamente por vías tales como la intravenosa, la subcutánea, intramuscular, vaginal, intraperitoneal, nasal, oral para proteger a los individuos contra el efecto tóxico del veneno de la araña *Loxosceles*.

15

Las proteínas recombinantes de la presente invención (SMDrLb, SMDrLr1, SMDrLr2, SMDrLl1, SMDrLl2, SMDrLb(H11K) y SMDrLb(E31K)), pueden también ser utilizadas para generar una matriz antigénica al ser ligados ya sea covalentemente o por interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas, a algún sustrato como la poliacrilamida, el polivinilo, la agarosa aldehído activada (patentes estadounidenses No. 5,904,922 y 5,443,976), la sepharosa, la carboximetil celulosa o algún otro, de tal forma que esa matriz sea capaz de ligar específicamente ya sea anticuerpos (generados contra veneno total de las arañas *Loxosceles* o contra los mismo venenos enriquecidos con algunas de las proteínas recombinantes de la presente invención, o contra mezclas de tales proteínas recombinantes de la presente invención) o los fragmentos F(ab) o F(ab')₂ obtenidos de la

20

hidrólisis de tales anticuerpos, siendo útil en la purificación por inmun afinidad de dichos anticuerpos o fragmentos F(ab) o F(ab')₂, por lo que el uso de las proteínas recombinantes de la presente invención en la matriz antigénica y dicha matriz antigénica quedan incluidos en el alcance de la presente invención. Esta inmunopurificación de los anticuerpos o sus

25

fragmentos durante el proceso de manufactura de antivenenos, ayudará a disminuir la proporción de proteína exógena irrelevante que se administra a un paciente mordido por una araña *Loxosceles*. Así pues, otro alcance de la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos una de las proteínas recombinantes de la presente invención, ligadas a un sustrato, caracterizada por que dicha composición es capaz de ligar específicamente anticuerpos generados contra el veneno de arañas del género *Loxosceles*

30

o contra dicho veneno enriquecido con al menos una de las proteína recombinante de la presente invención.

35

25
27

Otro alcance más de la presente invención se refiere al uso de las proteínas recombinantes de la presente invención (SMDrLb, SMDrLr1, SMDrLr2, SMDrLi1, SMDrLi2, SMDrLb(H11K) y SMDrLb(E31K)) en diagnóstico. Es posible mediante el uso de cualquiera de las proteínas recombinantes de la presente invención generar anticuerpos monoclonales específicos contra algún epítopo presente solamente en dicha proteína recombinante o la correspondiente toxina nativa del veneno de la especie homóloga de araña *Loxosceles*, pero ausente en la toxina del veneno de las otras especies de *Loxosceles*. Estas proteínas recombinantes pueden ser usadas como parte de una matriz antigénica en la que estén ligadas covalentemente o por interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas a un sustrato, y dicha matriz puede ser utilizada como parte de un dispositivo diagnóstico. Dicho dispositivo podrá ser utilizado para detectar la presencia en una muestra (de un individuo presuntamente mordido por una araña *Loxosceles*), de anticuerpos generados (por el organismo del individuo) específicamente contra la toxina nativa homóloga del veneno de una araña *Loxosceles* específica, determinando si la araña que mordió al individuo pertenecía a esa especie de *Loxosceles*. Esto se puede realizar con cada una de las proteínas recombinantes de la presente invención, con lo que se lograría determinar a cuál de las especies homólogas (*L. boneti*, *L. reclusa* o *L. laeta* variedad peruana) pertenece la araña causante de la mordida, dando al médico tratante una herramienta para dirigir el tratamiento en forma específica. Un método para diagnosticar si el animal que picó un individuo pertenece a una especie particular de la araña *Loxosceles* comprenderá el poner en contacto el dispositivo arriba mencionado con una muestra del individuo picado por el alacrán. Si están presentes, los anticuerpos generados particularmente contra la toxina natural del veneno de la araña que mordió al individuo reconocerán y se ligarán a alguna de las proteínas recombinantes del dispositivo. Un sistema de detección opcional puede ser utilizado para revelar la presencia de los anticuerpos de la muestra ligados a la proteína recombinante del dispositivo. Este sistema de detección puede estar basado en métodos inmuno-enzimáticos, de inmuno-fluorescencia o inmuno-cromatografía.

30 MATERIAL Y METODOLOGÍA

1. ARAÑAS

Los ejemplares de *L. boneti* fueron colectados por gente capacitada para el reconocimiento del género *Loxosceles*, en las Comunidades de La Capilla y Corral de Toros, Municipio de Iguala, que se encuentran en la parte centro del Estado de Guerrero, según la distribución determinada por Hoffman, 1978 y Gerstch, 1983. Para confirmar esto se mandaron 10 hembras y 10 machos al Museo de Historia Natural de New York con el

26

21

Dr. Norman Platnick, que los identificó como tales. Los ejemplares de *L. reclusa* fueron colectados en Stillwater, Oklahoma por los inventores de la presente invención, mientras que los ejemplares de *L. laeta* (variedad peruana) fueron colectados en la ciudad de Lima, Perú.

5

2. OBTENCIÓN DEL VENENO

Las glándulas de las arañas fueron extraídas mecánicamente, jalando los quelíceros para desprenderlas. Estas se colocaron en buffer acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y se maceraron con un homogenizador de teflón (50 aparatos venenosos por ml); se centrifugaron dos minutos a 14,000 rpm con el fin de quitar residuos sólidos y restos celulares no deseados; se almacenaron a -70°C hasta su uso.

También se obtuvieron cantidades limitadas de veneno puro (diferente al extracto de glándulas descrito). Para ello se aprovechó el hecho de que algunas arañas expulsan, como resultado de la manipulación, pequeñas cantidades de veneno, las cuales fueron colectadas con tubos microcapilares.

3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

a) Cromatografía de exclusión molecular en gel

Se empleó una columna de 170 cm de largo por 1.4 cm de diámetro. La resina seleccionada para empacar la columna fue Sephadex G-75 (SIGMA CHEMICAL CO.) debido a que su límite de exclusión es de 70 kDa. El buffer de corrida fue acetato de amonio 20 mM, pH 4.7. La velocidad de flujo en el experimento fue de $48\text{ ml h}^{-1}\text{ cm}^{-2}$.

Se aplicaron 72.56 mg de veneno (3.5 ml), medidos por absorbancia a 280 nm. Se colectaron muestras cada seis minutos de un volumen de 4.5 ml aproximadamente, leyéndose en el espectrofotómetro (Beckman DU650I) bajo dos longitudes de onda: 260 nm y 280 nm.

b) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

30

La separación de las proteínas de los venenos se realizó en geles de poliacrilamida al 12.5%, en condiciones reductoras, a corriente constante. El equipo utilizado para este método fue el Mini Protean III (BIO-RAD). Para cada muestra sometida a electroforesis se utilizaron distintas concentraciones.

Para las condiciones reductoras se utilizó 2-mercaptoetanol a una concentración final de 2.5 %. Los marcadores de peso molecular preteñidos (BioLabs, Inc.) se usaron como

estándares de peso molecular. Todas las muestras se desnaturalizaron previamente en baño María durante cinco minutos, incluyendo al marcador de peso molecular. Estas se corrieron a una corriente constante de 15 mA, hasta que el colorante penetró en el gel separador; posteriormente se incrementó a 25 mA. Una vez terminada la corrida del gel se procedió a llevar a cabo la tinción con azul Brillante de Coomassie durante una hora y se destiló con una solución de ácido acético 10% y metanol 25% durante toda la noche con agitación constante.

c) Cromatografía de Intercambio Iónico (FPLC)

La columna que se utilizó fue del tipo Mono S HR 5/5 (Pharmacia LKB Biotech) que es un intercambiador catiónico fuerte, basado en resinas hidrofílicas. El flujo utilizado para las corridas fue de 1 ml/min. Los buffers utilizados fueron los siguientes.

Buffer Inicial: Buffer A-Acetato de amonio 20 mM pH 4.7.

Buffer límite: Buffer B-Acetato de amonio 20 mM pH 4.7 + 2 M cloruro de sodio.

Ambos buffers (filtrados con membrana de 0.22 micras) se corrieron para calibrar la columna según las especificaciones del distribuidor.

Una vez que la columna estaba equilibrada se procedió a inyectar la muestra. Ésta previamente fue centrifugada durante dos minutos a 14,000 rpm, con el fin de clarificar (quitar residuos y/o precipitados).

La sensibilidad del detector fue de 0.2 AU, la velocidad de flujo fue de 1 ml/min y el gradiente fue de 0 a 2 M cloruro de sodio.

4. ACTIVIDAD DE ESFINGOMIELINASA D.

La medición de esta actividad enzimática se llevó a cabo con el Amplex Red Sphingomielinase Assay Kit (Molecular Probes) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante, empleando diluciones seriadas (1:1) a partir de 1 µg/ml.

5. MEDICIÓN DE TÍTULOS POR ELISA DE LOS SUEROS Y DETERMINACIÓN DE REACCIONES CRUZADAS *IN VITRO*

La titulación de los anticuerpos a partir de sueros se llevó a cabo por Inmunoensayos enzimáticos (ELISA de sus siglas inglés Enzyme Linked Immuno Assay). Este ensayo también fue utilizado para observar posibles reacciones cruzadas.

La prueba de ELISA consistió en:

- 5 1. Sensibilizar placas de 96 pozos para ELISA (Maxi sorp, NUNC™ Brand products) con una solución de antígeno a una concentración de 5 µg/ml, reconstituida en 100 mM carbonato/bicarbonato pH 9.5.

Por cada pozo se colocaron 100 µl hasta la columna 11, ya que el carril 12 fungió como control negativo. La placa se incubó toda la noche a 4 °C.

- 10 2. Una vez concluida la incubación, se lavó tres veces con 200 µl de solución de lavado. Se tuvo que repetir este proceso cada vez que se pasaba al siguiente paso a lo largo de toda la técnica.

3. Posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos de pegado para proteínas con 200 µl de solución de bloqueo, durante 2 horas a 37 °C.

- 15 4. Repetición del paso 2.

5. Se hicieron diluciones seriadas de los sueros con una dilución inicial de 1:30 en buffer de reacción para ELISA (señalada en el apéndice correspondiente). En cada pozo se adicionaron 100 µl de la solución de reacción para ELISA y se mezclaron 60 µl/pozo de la dilución del suero anti-toxocara en la columna 1, para proceder a las diluciones seriadas
20 3x hasta la columna 10 dejando la 11 y 12 como controles. Se incubó por una hora a temperatura ambiente.

6. Se repite el paso 2.

- 25 7. Después se incubó el segundo anticuerpo anticonejo conjugado a la enzima peroxidasa diluido 1:1000 en solución de reacción para ELISA, poniendo 100 µl/pozo. El tiempo de incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente.

8. La reacción se reveló con 100 µl/pozo de sustrato ABTS (Boehringer), incubándose por 5 minutos a temperatura ambiente. Después de cinco minutos la reacción se detuvo con 25 µl de ácido fluorhídrico (Aldrich) y se procedió a leer la placa en un lector de ELISA (modelo BIO-RAD 550) a 405 nm.

- 30 Para determinar los títulos de las lecturas obtenidas, las curvas sigmoides fueron generadas con el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). El punto de inflexión se calculó ajustando los datos experimentales para cada veneno y cada antiveneno por regresión no-lineal de las curvas sigmoides.

- 35 6. PRUEBAS DE WESTERN-BLOT.

Esta es una técnica que se utiliza para identificar de una mezcla de proteínas o fragmentos de éstas, cuáles reaccionan con un determinado anticuerpo o antisuero. Los Western-Blot se hicieron según el protocolo de Mathews y Holde (1998).

5 Se prepararon geles de poliacrilamida al 12.5% que se corrieron de manera acostumbrada para separar los componentes proteicos de los venenos de *L. boneti* y *L. reclusa*. La cantidad de veneno utilizada para cada ensayo fue de 30 µg por carril. Una vez terminada la corrida de los geles se realizó la transferencia durante una hora a corriente constante (400 mA) a una membrana de nitrocelulosa (soporte sólido). Para esto se utilizó
10 una cámara de transferencia bajo condición semihúmeda (OWL). Una vez terminada la transferencia la membrana se bloqueó durante toda la noche con agitación constante a temperatura ambiente en una solución al 5 % de leche descremada/TBST, para impedir el pegado inespecífico de los anticuerpos. Pasado este tiempo se procedió a lavar las membranas tres veces con TBST 1X (diez minutos cada lavado). Posteriormente se incubó
15 con el primer anticuerpo en 0.1% de leche descremada en polvo (Carnation o Svelty/TBST) con agitación constante a temperatura ambiente por una hora (se diluyó de acuerdo al título del anticuerpo). Las diluciones utilizadas en este ensayo fueron 1:1000, 1:2500 y 1:5000.

Concluida la incubación se continuó con tres lavados de diez minutos con TBST 1X cada uno. Se procedió a incubar una hora a temperatura ambiente y con agitación
20 constante con el segundo anticuerpo en 0.1% de leche descremada/TBST. Como segundo anticuerpo se utilizó anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (ZYMED).

Pasada la hora de incubación, se lavó tres veces por diez minutos con TBST, se eliminó el TBST del último lavado y se agregó el buffer de reacción NTB-BCIP el cual se
25 dejó reaccionar durante cinco minutos, parándose la reacción con 5mM EDTA.

7. DETERMINACIÓN DE LAS DL50

Para determinar la DL50 de la SMDrLb y la SMDrLr los venenos nativos de *L. reclusa* y *L. boneti*, se usaron grupos de 5 ratones Balb/c de 18-20 g, aplicándoseles
30 intraperitonealmente cantidades variables de toxina, desde 0.8 hasta 17.57 µg de toxina por animal, encontrándose una DL50 de 2.55 µg de SMDrLb y de 8µg de SMDrLr por ratón. La SMDrLb empleada tenía una concentración de 331 µg/ml (por técnica BCA) y una actividad de esfingomielinasa D de 104.77 U/ml, la SMDrLr tenía una concentración de 53.8µg/ml y una actividad de esfingomielinasa D de 103.38 U/ml. Los cálculos fueron
35 realizados por el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). Los venenos empleados presentaron una concentración de 3,300µg/ml de

proteína (BCA) y una actividad esfingomielinasa D de 7.5U/mg, para el de *L. boneti*, y 5,800µg/ml (BCA) y 9.05U/mg para el veneno de *L. reclusa*.

8. DERMONECROSIS EN CONEJOS

5 La actividad dermonecrótica fue evaluada en conejos y fue determinada como la describió Furlanetto *et al.* (1982a, b).

Se utilizaron distintas concentraciones del veneno que se diluyeron en 0.2 ml de buffer PBS pH 7.4 o en 0.2 ml de acetato de amonio 20 mM pH 4.7. Éstas se inyectaron intradérmicamente en el lomo de dos conejos

10

A fin de ilustrar mejor la presente invención y su modo de uso, se proporcionan los siguiente ejemplos específicos para ayudar al lector a comprender mejor los diversos aspectos de la práctica de la presente invención. Dado que estos ejemplos específicos son simplemente ilustrativos, en ningún caso deberá considerarse las siguientes descripciones como limitantes al alcance de la presente invención:

15

EJEMPLO 1. Caracterización bioquímica del veneno de *Loxosceles boneti*.

Para caracterizar el veneno de la araña *Loxosceles boneti*, que se distribuye en México, particularmente en los estados de Guerrero, Puebla y Morelos, se obtuvo extracto de glándulas de la araña. El extracto fue liofilizado y reconstituido en acetato de amonio 20 mM pH 4.7, observándose la formación de un precipitado. Un análisis en SDS-PAGE (condiciones reductoras) mostró que la proteína de interés se conservó principalmente en el sobrenadante, con el que se continuó trabajando. Este se separó por cromatografía de exclusión molecular en gel, observándose 4 picos principales (Figura 1).

20

Correspondientemente, las muestras se separaron en 4 fracciones, conteniendo la fracción II la proteína de aproximadamente 32KDa que presumiblemente sería la esfingomielinasa (Figura 2). Esta fracción II se caracterizó por Cromatografía de Intercambio Iónico por FPLC para buscar posibles isoformas como en los casos reportados de *L. reclusa* y *L. intermedia*, obteniéndose tres picos mayoritarios correspondientes a las isoformas I, II y III (Figura 3).

25

De éstas sólo las isoformas I y II resultaron tener actividad dermonecrótica probada en piel de conejos, como lo describió Furlanetto *et al.* (1982a, b). La actividad de esfingomielinasa de la fracción II (que comprende las 3 isoformas) fue de 25 U/mg. Cada una de las 3 isoformas separadas, se secó por centrifugación en SAVANT y luego se secuenció en un equipo automatizado Beckman LF3000, utilizando la química de Edman (Walsh *et al.* 1981). De la isoforma I se lograron secuenciar los primeros 35 aminoácidos (SEQ. ID. NO:1), de la isoforma II, los primeros 33 (SEQ. ID. NO:2) y de la isoforma III, los

30

35

primeros 22 (SEQ. ID. NO:3). La actividad enzimática para la isoforma I resultó ser de 30.5 U/mg para la isoforma II de 9.5 U/mg y para la isoforma III fue de 0 U/mg.

EJEMPLO 2. Generación de anticuerpos policlonales en mamífero contra el veneno de *L. boneti* y reacción cruzada con el veneno de *L. reclusa*.

Para generar anticuerpos anti veneno de *L. boneti*, se inocularon 2 conejos mediante un esquema de 13 inmunizaciones. En las 9 primeras se administró extracto de glándulas de *L. boneti*, en cantidades crecientes desde los 20 hasta los 250µg, mientras que en las inoculaciones restantes se administraron 60, 80 y 100 µg la fracción II (mezcla de las 3 isoformas), obtenida de la cromatografía de exclusión molecular en gel. Las inmunizaciones se llevaron a cabo cada 10 días. En todos los casos se inyectó un volumen de 1ml (en PBS) intradérmico con adyuvante incompleto de Freund, salvo la primera que fue con adyuvante completo de Freund.

Los sueros obtenidos fueron titulados, obteniéndose títulos de hasta 30,000. En reacciones cruzadas con veneno de *L. reclusa*, los títulos fueron de hasta 23,000. En la Figura 4 se muestra un Western Blot del veneno de *L. reclusa* y *L. boneti* (separados por SDS-PAGE) revelados con el suero anti *L. boneti*, donde se muestra claramente la afinidad hacia el componente de 32.5 KDa de ambos venenos.

EJEMPLO 3. Aislamiento de las clonas parciales de las necrotoxinas de *L. boneti*.

Para el aislamiento de las clonas de las necrotoxinas, se aisló el RNAm de las glándulas venenosas de arañas de cada especie por el método de TRIZOL (Gibco) siguiendo el protocolo del fabricante. Para la síntesis de primera cadena se utilizó el kit 3' RACE (Gibco). 2µl del RNAm total (aproximadamente 500ng) extraído de glándulas, 4µl de agua y 1µl (10 pmoles) del oligonucleótido Adapter Primer (AP), que comprende una cola de poli T₆ (SEQ.ID. NO:4), fueron incubados para desnaturalizar, a 7°C por 10 min e inmediatamente enfriados en hielo. Se añadió 2µl de Buffer PCR 10X, 1 µl de dNTPs (10mM), 2µl de MgCl₂ (25mM) y 2 µl DTT (0.1M), preincubándose por 2 a 4 min a 42°C. Se agregó inmediatamente 1µl de Reverse Transcriptase Superscript (Invitrogen), se mezcló e incubó por 50 min a 42°C. Se inactivó la enzima incubando 15 min a 70°C e inmediatamente se enfrió la mezcla en hielo por un min. Se añadió 1µl de RNasa H y se incubó por 20 min a 37°C y se almacenó a -80°C.

Para la reacción de polimerasa en cadena (PCR), se tomó una muestra de la reacción de primera cadena (2µl) y se adicionaron a buffer PCR 10X Mg²⁺ (100mM TRIS-HCl pH8.3,

T
32

27

500 mM KCl 15mM MgCl₂), 200µM dNTPs, 20 pmoles del oligonucleótido directo (en el sentido 5'-3'), 20 pmoles del oligonucleótido reverse (en el sentido 3'-5') AUAP (Gibco) (SEQ.ID. No: 6) y dos unidades de Taq DNA Polymerasa (ROCHE) en un volumen final de 50 µl. La reacción se llevó a cabo usando un termociclador Perkin Elmer 9600 con el siguiente protocolo: Incubación de la mezcla durante 3 min a 94°C, seguidos 25 ciclos de tres pasos de incubación: 1 min a 94°C, 90 seg a 48°C y 2 min a 72°C. La Taq DNA polymerasa pega en los extremos 3' una A útil para hibridar con la T de los extremos 5' del vector de clonación linealizado pCR 2.1-TOPO (3.9Kb).

10 Para el caso de *L. boneti*, se diseñaron 2 oligonucleótidos con base en la secuencia aminoacídica común determinada común a las isoformas I y II, el oligo Lb1 (SEQ. ID. NO:6) correspondiente a la secuencia de los aminoácidos 5 a 10 del amino terminal de las isoformas I y II y el oligo Lb-nested (SEQ.ID.NO:7) que comprende la última base del aa 7 y las del 8 a 12 y las dos primeras bases del aa 13. El primero se empleó para la reacción
15 PCR mientras que el segundo se empleó para un PCR confirmatorio. En ambos caso se utilizó el oligo comercial AUAP (GIBCO) (SEQ ID NO:5) que reconoce específicamente la secuencia del oligo AP de la misma compañía.

Los productos de PCR fueron purificados en un kit para extracción en gel (ROCHE) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente fueron hibridados (y ligados) con el vector de clonación pCR 2.1-TOPO (3.9Kb) (Invitrogen) linealizado por la TOPO isomerasa, que presenta una T saliente en ambas cadenas, obteniéndose el plásmido con el inserto (producto del PCR 30). Estas construcciones fueron utilizadas para transformar células de *E. coli* cepa XL1blue. La selección de clones que comprendían algún inserto, se realizó plaqueando las células transformantes en cajas Petri con LB/agar con ampicilina en presencia de X-Gal, eligiéndose las colonias blancas para la amplificación de plásmidos. Se obtuvieron 13 colonias positivas.

De las 13 colonias positivas, solo 7 contenían un inserto del tamaño adecuado. Los
30 DNA plasmídicos fueron secuenciados en ambas cadenas usando nucleótidos fluorescentes en un aparato de Perkin Elmer Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) como lo describe el fabricante. De las 7 clones positivas se eligió una por tener la secuencia más claramente identificada de manera inequívoca, la clona 30-8, con un tamaño aproximado de 900pb.

35

EJEMPLO 4. Expresión de la clona parcial de *L. boneti*.

A fin de poder expresar la proteína recombinante obtenida en el ejemplo anterior, el cDNA se subclonó en el vector de expresión pTrcHis-TOPO (INVITROGEN). Con el fin de meter en fase el gen en el plásmido, se diseñaron 2 oligonucleótidos, el directo, Lb5' Incompleto (SEQ. ID. NO: 22), partiendo de las secuencias codificantes de los aminoácidos 5 a 9 del amino terminal de las isoformas I y II (los primeros 5 del inserto clonado en el paso anterior) más el sitio de reconocimiento para la enzima BamHI y 3 bases más para que la enzima se pegue y el oligo reverse, Lb3'Sal I (SEQ. ID. NO:9), partiendo de la secuencia codificante de los aa 275 a 279 (los últimos 5 del extremo carboxilo de la esfingomielinasa D de *L. boneti*), más el codón de término, más el sitio de reconocimiento de la enzima Sal I y 4 bases más para el pegado de la enzima. Con el plásmido de la clona 30-8 como template y usando como primers los oligos directo y reverse diseñados, se llevó a cabo una reacción PCR obteniéndose un fragmento de DNA que comprende la secuencia codificante de la proteína recombinante con los aminoácidos 5 a 279 de la esfingomielinasa de *L. boneti*, con un sitio de corte de BamH I en el extremo 5' y uno de Sal I en el 3'.

Tanto el vector de expresión pTrcHis-TOPO, como el producto de PCR arriba mencionado fueron digeridos con las enzimas BamH I y Sal I y ligados para obtener el plásmido pTrcHis-TOPO 30-8, siendo transformado en células electrocompetentes de *E. coli* XL1blue. Se obtuvieron 3 colonias positivas que efectivamente portaban el plásmido pTrcHis-TOPO 30-8, con el inserto del tamaño adecuado (según se observó en un gel, tras liberar el inserto digiriendo el plásmido con BamH I y Sal I), confirmando por secuenciación.

Para expresar la proteína recombinante, cada una de las 3 colonias obtenidas, fueron cultivadas en 3ml de medio LB en presencia de ampicilina 100µg/ml a 37°C durante toda la noche con agitación, luego fueron transferidas a un matraz de 500ml de LB con ampicilina. Una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.6 OD₆₀₀ se indujo la expresión con 1mM IPTG durante 3 hrs a 37°C con agitación. Las células cosechadas por centrifugación (8,000 rpm, 15 min) y resuspendidas en 5 ml de buffer A (NaH₂PO₄ 100mM, TRIS-HCl 10mM pH8 y Cloruro de Guanidinio 8M) y posteriormente sonicadas, por 6 ciclos de 30 seg c/u con intervalos de 1 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó por 25 min a 10,000 rpm. El sobrenadante fue pasado por una columna de Níquel (NI-NTA agarose) (QIAGEN) para purificar la proteína. Una vez terminada la purificación se dializó contra PBS para eliminar el cloruro de guanidinio, pero la proteína precipitó. La proteína precipitada se

cuantificó por BCA (PIERCE) pero al ser probada como inmunógeno en conejos no se obtuvieron buenos resultados. Con base en ello se decidió plegar *in vitro* la proteína.

Para plegar la proteína *in vitro* se solubilizó colocándola en presencia de 5M de cloruro de guanidinio más 30M de DTT por 2 hr a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, la proteína fue dializada contra una solución con 2M de cloruro de guanidinio, 4mM de glutatión reducido (GSH), 2mM de glutatión oxidado (GSSG) en PBS 1X pH7.4, durante 1hr. Estas dialisis se repitieron con concentraciones decreciente de cloruro de guanidinio, manteniendo las de GSH y GSSG constantes, excepto en el último paso de dialisis en fueron eliminados de la solución, quedando la proteína en PBS 1X pH 7.4, recuperándose un 80% de la proteína en forma soluble. La proteína solubilizada resultó carecer de actividad esfingomielinasa y dermonecrótica, y los anticuerpos generados en conejos con esta proteína recombinante fueron capaces de reconocer la propia proteína recombinante y al componente dermonecrótico del veneno completo detectados por Western Blot, pero fueron incapaces de neutralizar la toxicidad dicho veneno.

EJEMPLO 5. Alisamiento de la clona completa de la esfingomielinasa D completa de *L. boneti*

A fin de contar con una secuencia codificante de la esfingomielinasa D completa de *L. boneti* (es decir desde el primer aminoácido de la región amino terminal hasta el último en la región carboxilo terminal), se diseñó el oligonucleótido Lb5'BAM HI (SEQ ID NO: 8) que incluye además de la secuencia necesaria para el sitio Bam HI, los codones codificantes de los primeros 4 aa del amino terminal de la esfingomielinasa D de *L. boneti*, más los siguientes 5 aminoácidos ya presente en el producto original del PCR obtenido de la clona 30-8. Se realizó una reacción PCR utilizando el plásmido pTrcHIS-TOPO 30-8 como molde y el oligo Lb5'BamHI como primer directo y el mismo oligo Lb3'Sal I (SEQ ID NO: 9), como primer reverso, obteniéndose un fragmento de DNA que comprende la secuencia codificante completa de la esfingomielinasa de *L. boneti*, flanqueada por los sitios de corte de BamH I y Sal I. Este fragmento fue clonado en el plásmido TOPO 2.1 (3.9Kb) transformándose células competentes de *E. coli* XL1 blue; se obtuvieron 4 colonias positivas de las que se comprobó la secuencia nucleotídica del inserto por secuenciación. Se produjo una mayor cantidad del plásmido y el inserto, que comprende el gen completo (SEQ. ID. No: 10) codificante de la proteína recombinante activa SMDrLb (SEQ. ID. No: 11), fue liberado por digestión con las enzimas Bam HI y Sal I. El inserto fue purificado mediante un kit de purificación (ROCHE) y ligado al vector pQE30, previamente digerido con la mismas enzimas de restricción, obteniéndose el vector PQE30Lb-8c3.1.

35

EJEMPLO 6. Expresión de la clona completa SMDrLb.

El producto de la ligación con el plásmido PQE30Lb-8c3.1 se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* BJL21, que al ser plaquedas dieron lugar a 3 clones positivos, confirmando la presencia del fragmento de DNA que comprende la secuencia codificante completa de la esfingomielinasa D de *L. boneti*, según se pudo corroborar por análisis de restricción con las enzimas Bam HI y Sal I.

La clona que se utilizó para la expresión fue denominada PQE30Lb-8c3.1. Para ello se cultivó a 37°C en LB más Ampicilina hasta una OD de 0.8, posteriormente fue inducido con 1mM de IPTG por 3 hr. Nuevamente la proteína se expresó cuantiosamente pero en cuerpos de inclusión, cuya actividad esfingomielinasa D, fue despreciable.

EJEMPLO 7. Expresión controlada de la clona completa de esfingomielinasa D de *L. boneti*.

A fin de controlar el nivel de expresión de la proteína recombinante SMDrLb, la clona PQE30Lb-8c3.1 se incubó en 50ml de LB con Ampicilina a 37°C toda la noche, las células fueron transferidas a un matraz con 1l del mismo medio. Al alcanzar un OD₆₀₀ de 0.8 se indujo el cultivo con IPTG (0.1 mM) y se incubó 16 hr a una menor temperatura (20-22°C) con agitación. Las células fueron recuperadas por centrifugación (10 min a 8,000 rpm). El paquete celular fue resuspendido en 20 ml de PBS, sonificado en 6 ciclos de 30 seg con intervalos de 1 min en hielo y centrifugado nuevamente 25 min a 10,000 rpm. Tanto en el sobrenadante como en el pellet se encontró una proteína del peso molecular esperado (32 Kda).

La proteína recombinante soluble se purificó haciendo pasar el sobrenadante por una columna de NTA (Niquel Trinitroacético, Qiagen), donde la proteína recombinante se queda pegada por la alta afinidad de la cola de 6 histidinas hacia el metal. Posteriormente fue lavada con 15 volúmenes de PBS y con 10 volúmenes de PBS más Imidazol 25mM, para finalmente eluir la proteína recombinante con PBS más 250 mM de Imidazol. La elución fue colectada y dializada contra PBS para eliminar el Imidazol presente. Se midió la actividad esfingomielinasa y resultó ser de 31.5 U/mg, es decir, prácticamente la misma que la encontrada para la isoforma I nativa.

EJEMPLO 8. Producción de anticuerpos neutralizantes a partir de la proteína recombinante activa SMDrLb.

36

Con la proteína recombinante soluble activa SMDrLb producida conforme al ejemplo 7, se inocularon 2 conejos neozelandeses de 3.5 Kg, con un esquema de 8 inoculaciones, separadas 10 días entre sí, con cantidades incrementales de la proteína recombinante, desde 30 hasta 100 µg/conejo de proteína recombinante soluble (activa) en PBS. Las 5 inoculaciones fueron intradérmicas en un volumen final de 1ml, con 0.5 ml de adyuvante de Freund, completo para la primera inoculación e incompleto para las subsecuentes.

A los 10 días de la octava inoculación, se midió el título de anticuerpos y fue de 22,800 para un conejo y 29,300 para el otro. Los conejos se sangraron a blanco y se separó el 10 suero de ambos conejos y se mezcló (50/50% en volumen).

Para determinar la dosis efectiva media (ED50) de la mezcla de sueros, se realizaron 3 retos con distintas cantidades de la propia proteína recombinante SMDrLb, 7.8, 15.45 y 18.1 µg/ratón. Para ello, se usaron grupos de 4 ratones Balb-C de 18-20 g, inyectándoseles 15 una mezcla preincubada (30 min a 37°C) de la proteína SMDrLb con cantidades crecientes (de 100-200 µl) de la mezcla del suero de los 2 conejos inmunizados, en SS (NaCl 0.15 M), obteniéndose las siguientes DE50:

Cantidad de SMDrLb	DE50
7.8µg	154.8µl
15.5µg	258.7µl
18.1µg	278.5µl

20 Los cálculos fueron realizados con el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc, San Diego, CA) .

Mientras que en un ensayo similar se aplicaron 92 µg del veneno nativo de *L. boreli* preincubado con cantidades crecientes del suero homólogo (anti SMDrLb) obteniéndose 25 una DE50 de 149.8µl por ratón, para los 92µg que equivalen a 3DL50.

EJEMPLO 9. Aislamiento de las clonas completas de la esfingomielinasa D de *L. reclusa*

Para el aislamiento de las clonas de las necrotoxinas, se aisló el RNA total de las glándulas venenosas de las arañas por el método de TRIZOL reagent (Gibco) siguiendo el 30 protocolo del fabricante. Para la síntesis de primera cadena se utilizó el kit 3' RACE (Gibco). 2µl del RNA total (aproxmadamente 500ng) extraído de glándulas, 4µl de agua y

- 1µl (10 pmole) del oligonucleótido Adapter Primer (AP), que comprende una cola de poli-Ta (SEQ.ID. NO:4), fueron incubados para desnaturalizar, a 70°C por 10 min e inmediatamente enfriados en hielo. Se añadió 2µl de Buffer PCR 10X, 1 µl de dNTPs (10mM), 2µl de MgCl₂ (25mM) y 2 µl DTT (0.1M), preincubándose por 2 a 4 min a 42°C. Se agregó inmediatamente 1µl de Reverse Transcriptase (Invitrogen), se mezcló e incubó por 50 min a 42°C. Se inactivó la enzima incubando 15 min a 70°C e inmediatamente se enfrió la mezcla en hielo por un min. Se añadió 1µl de RNasa H y se incubó por 20 min a 37°C y se almacenó a -80°C.
- 10 Para la reacción de polimerasa en cadena (PCR), se tomó una muestra de la reacción de primera cadena (2 µl) y se adicionaron a buffer PCR 10X Mg²⁺ (100mM TRIS-HCL pH 8.3, 500 mM KCl 15 mM MgCl₂.), 200 µM dNTPs, 20 µmoles del oligonucleótido directo (en el sentido 5'-3'), que en este caso se utilizó el mismo oligonucleótido LB5'Bam H1 (SEQ. ID. NO: 8) que incluye además de la secuencia necesaria para el sitio BamH1, los codones
- 15 codificantes de los primeros 9 aa del amino terminal de la esfingomielinasa D de *L. reclusa*. 20 µmoles del oligonucleótido reverso (en el sentido 3'-5') el oligo reverso Lb3'Sal I (SEQ ID NO: 9) y dos unidades de Taq DNA Polymerasa (New England Biolabs, Beverly MA, USA) en un volumen final de 50 µl. La reacción se llevó a cabo usando un termo ciclador Perking Elmer 9600 con el siguiente protocolo: Incubación de la mezcla durante 3 min a
- 20 94°C, seguidos 25 ciclos de tres pasos de incubación: 1 min a 94°C, 90 seg a 48°C y 2 min a 72°C. Al final un paso de 10 min a 72°C. La Taq DNA polymerasa pega en los extremos 3' una A útil para hibridar con la T de los extremos 5' del vector de clonación pCR 2.1-TOPO (3.9Kb).
- 25 Los productos de PCR fueron purificados en un kit para extracción (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente fueron hibridados (ligados) con el vector de clonación pCR 2.1-TOPO (3.9Kb) (Invitrogen) linealizado por la TOPO isomerasa, que presenta una T saliente en ambas cadenas, obteniéndose los plásmidos pCR 2.1-TOPO Lr1 y pCR 2.1-TOPO Lr2 que comprenden los insertos productos del PCR, Lr1 y Lr2,
- 30 respectivamente. Estas construcciones fueron utilizadas para transformar células de *E. coli* cepa XL1blue. La selección de clones que comprendían algún inserto, se realizó plaqueando las células transformantes en cajas Petri con LB/agar con ampicilina en presencia de X-Gal, eligiéndose las colonias blancas para la amplificación de plásmidos. Se obtuvieron 5 colonias positivas.

De las 6 colonias positivas, solo 2 (la Lr1 y la Lr2) contenían un inserto del tamaño adecuado. Los DNA plasmídicos fueron secuenciados en ambas cadenas usando nucleótidos fluorescentes en un aparato de Perkin Elmer Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) como lo describe el fabricante. Las 2 clonas positivas se eligieron por tener la secuencia más claramente identificada como esfingomielinasa D y con variaciones entre el (90% de identidad). Ambas clonas, con un tamaño aproximado de 900pb, comprendían respectivamente las secuencias codificantes completas de dos isoformas de la esfingomielinasa D de *L. reclusa* (SEQ. ID. No: 12 y SEQ. ID. No: 14) mientras que las proteínas codificadas (SMDrLr1 y SMDrLr2) tuvieron la secuencias aminoácidas SEQ.ID. No: 13 y SEQ.ID. No: 15. Para cada una, el inserto, que comprende el gen de la SMDrLr correspondiente, fue liberado por digestión con las enzimas Bam HI y Sal I. Cada inserto fue purificado mediante un kit de purificación (ROCHE) y ligado al vector pQE30, previamente digerido con la mismas enzimas de restricción, obteniéndose los vectores PQE30Lr1 y PQE30Lr2.

15

EJEMPLO 10. Expresión controlada de las clonas completas de la SMDrLr.

A fin de controlar el nivel de expresión de la proteína recombinante (tanto de SMDrLr1 como de SMDrLr2), las células de *E. coli* BL21 transformadas con el vector PQE30Lr1 o PQE30Lr2 se incubaron en 3 ml de LB con Ampicilina a 37°C toda la noche, fueron transferidas a un matraz con 100 ml del mismo medio conteniendo 1 mM de IPTG y se incubaron 16 hr a una temperatura de 20-22°C. Las células fueron recuperadas por centrifugación (10 min a 10,000 rpm). El paquete celular fue resuspendido en 5 ml de PBS, sonificado en 6 ciclos de 30 seg con intervalos de 1 min en hielo y centrifugado nuevamente 25 min a 10,000 rpm. Tanto en el sobrenadante como en el pellet se encontró una proteína del peso molecular esperado (32 Kda).

Las proteínas recombinantes SMDrLr1 y SMDrLr2 solubles se purificaron haciendo pasar el sobrenadante por una columna de NTA (Niquel Trinitriloacético, QIAGEN), donde la proteína recombinante se queda pegada por la alta afinidad de la cola de 6 histidinas hacia el metal. Posteriormente fueron lavadas con 10 volúmenes de PBS y con 10 volúmenes de PBS más imidazol 25 mM, para finalmente eluir la proteína recombinante con PBS más 250 mM de imidazol. La elución fue colectada y dializada contra PBS para eliminar el imidazol presente. Se midió la actividad esfingomielinasa y resultó ser de 27.2 U/mg para la SMDrLr1 es decir prácticamente la misma que la encontrada para la isoforma I nativa y de 11.47 U/mg para la SMDrLr2.

35

39

EJEMPLO 11. Producción de anticuerpos neutralizantes a partir de la proteína recombinante activa SMDrLr1.

Se eligió una de las proteínas recombinantes, la SMDrLr1. Con la proteína producida conforme al ejemplo 10, se inocularon 2 conejos neozelandeses de 3.5 Kg, con un esquema de 8 inoculaciones, separadas 10 días entre sí, con cantidades incrementales de la proteína recombinante, desde 30 hasta 100 µg/conejo de proteína recombinante soluble (activa) en PBS. Las inoculaciones fueron intradérmicas en un volumen final de 1ml, con 0.5 ml de adyuvante de Freund, completo para la primera inoculación e incompleto para las subsecuentes.

Se midió el título de anticuerpos y fue de 28,000 para un conejo y 33,000 para el otro. Los conejos se sangraron hasta blanco y se separó el suero de ambos conejos y se mezcló (50/50% en volumen).

Para determinar la dosis efectiva media, ED50 de la mezcla de sueros, se usaron grupos de 4 ratones Balb-C de 18-20 g, inyectándoseles una mezcla preincubada (30 min a 37°C) de 12µg de toxina SMDrLr1 con cantidades crecientes de la mezcla del suero de los 2 conejos inmunizados, en SS (NaCl 0.15 M),

La dosis efectiva media del antiveneno anti-SMDrLr1 contra la propia proteína recombinante activa resultó ser de 165 µl por ratón, con 12µg de proteína. Los cálculos fueron realizados con el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc, San Diego, CA).

Mientras que en un ensayo similar se aplicaron 12 µg del veneno nativo de *L. rectus* por ratón preincubados con cantidades crecientes del suero homólogo (anti SMDrLr1), se encontró una DE50 de 175µl por ratón con 12µg de veneno homólogo.

EJEMPLO 12. Alisamiento de las clones completas de la esfingomielinasa D completa de *L. lecta*.

Se procedió como en el ejemplo 9 pero utilizando glándulas de *L. lecta* como fuente de transcritos y se utilizaron los oligos directo L15'BamH1 (SEQ.ID.NO: 16 y reverso L13'Sal I (SEQ.ID.NO: 17) para la PCR, diseñados con base en las secuencia reportadas para la variedad brasileña (Fernades Pedrosa, et. al., 2002), cuyos productos se purificaron y seleccionaron de igual forma, obteniéndose 2 clones con una secuencia claramente

identificada y con variaciones entre sí (88% de identidad) comprendiendo respectivamente las secuencias codificantes completas de dos isoformas de la esfingomielinasa D de *L. laeta* (SEQ. ID. No: 18 y SEQ. ID. No: 20) mientras que las proteínas codificadas (SMDrL1 y SMDrL2) tuvieron la secuencias aminoácídicas SEQ.ID. No: 19 y SEQ.ID. No: 21.

- 5 Finalmente se subclonaron en el plásmido pQE30, obteniéndose los vectores PQE30L1 y PQE30L2, listos para su expresión.

EJEMPLO 13. Expresión controlada de la clona completa SMDrL1.

- 10 Se seleccionaron las dos clonas SMDrL1 y SMDrL2 para su expresión. Para lograr su expresión controlada, a modo de evitar que toda la proteína recombinante fuera expresada en forma de cuerpos de inclusión, se procedió de la misma manera que en el ejemplo 10, pero transformando la células con los vectores PQE30L1 y PQE30L2. Las proteínas recombinantes así producidas tuvieron una actividad de 58.43 U/mg para la SMDrL1 y de 252 U/mg.

15

EJEMPLO 14. Producción de anticuerpos neutralizantes a partir de la proteína recombinante activa SMDrL1.

- 20 Se procedió de manera semejante al ejemplo 11 pero utilizando la proteína SMDrL1 del ejemplo 13 para inmunizar los animales. Los títulos alcanzaron valores de hasta 34,300 y se encontró una DE50 de 200 µl por ratón con 12 µg de la propia SMDrL1 y de 225 µl por ratón con 12 µg del veneno homólogo.

EJEMPLO 15. Ensayos de Protección Cruzada.

- 25 Se realizaron exitosamente ensayos de protección cruzada retando ratones con 12µg de veneno de *L. boneti* o de la proteína SMDrLb y se encontró un DE50 de 112µl de suero de conejo anti SMDrLr por ratón y que 200µl del mismo por ratón fueron suficientes para neutralizar el 100% del efecto tóxico del veneno. De igual manera se retaron ratones con 12 µg de veneno nativo de *L. reclusa* o de la proteína SMDrLr1 y se encontró que entre 160 y 200µl de suero de conejo anti SMDrLb fueron suficientes para neutralizar su efecto tóxico.

30

EJEMPLO 16. Subclonación de las clonas Lb1, Lr1, Lr2 y L2 con Histidinas en posición Carboxilo.

- 35 Para demostrar que la inclusión de la cola de histidinas en el extremo amino de las proteínas recombinantes SMD de la presente invención (versiones amino), no tiene un efecto significativo en la efectividad de la proteína, algunas de las clonas: Lb1, Lr1, Lr2 y L2 se subclonaron en el plásmido pQE80 que agrega la cola de Histidinas en el extremo

carboxilo, en lugar del amino. Para ello se utilizaron los mismos oligos Lb5'Bam HI (para Lb1, Lr1 y Lr2) y Ll5'Bam HI (para Ll2) como oligos directos y los oligos Lb3' Bgl II (SEQ.ID.NO: 23) y Ll3' Bgl II (SEQ.ID.NO: 24), respectivamente como oligos reversos. Las construcciones se expresaron de manera controlada en cepas de *E. coli* BL21 de la misma forma que en los ejemplos 7, 10 y 13. Las proteínas recombinantes así producidas (versión carboxilo), presentaron esencialmente las mismas actividades SDM que las versiones amino.

EJEMPLO 17. Producción de anticuerpos en caballos, contra una mezcla de varias de las proteínas recombinantes de las 3 especies de *Loxosceles*.

A fin de ilustrar más aun la capacidad de las proteínas recombinantes de la presente invención para generar anticuerpos neutralizantes en vertebrados, particularmente en mamíferos, esta vez se eligió al caballo para generar en él los anticuerpos. Al mismo tiempo para ilustrar la posibilidad de utilizar una composición inmunogénica que comprenda más de una de las proteínas recombinantes de la presente invención, se eligieron 4 de ellas, que se consideraron suficientemente representativas para neutralizar los venenos de al menos las 3 especies de la araña *Loxosceles*, algunas en su versión amino y otras en su versión carboxilo. De este modo la composición inmunogénica quedó compuesta por 2 partes de SMDrLr1 (versión amino o SMDrLr1-NH₂), 2 partes de SMDrLb (versión carboxilo o SMDrLb-COOH), 1 parte de la SMDrLl1 (versión amino o SMDrLl1-NH₂) y 1 parte de SMDrLl2 (versión carboxilo o SMDrLl2-COOH).

Se seleccionaron 5 caballos que nunca habían sido inmunizados o tenido algún contacto con algún antígeno relacionado con la araña *Loxosceles* y se inmunizaron con la composición inmunogénica mencionada en el párrafo anterior. La inmunización se realizó a lo largo de 9 meses iniciando con una dosis de 2.5 µg de la mezcla de toxinas recombinantes hasta llegar a 250 µg. Las inmunizaciones se realizaron con intervalos de dos semanas y se utilizaron, de manera alternada, adyuvante de Freund y alúmina como adyuvantes. La inmunización se realizó por vía subcutánea. A los caballos se les tomaron muestras de sangre con intervalos de un mes a fin de medir los títulos de anticuerpos por un ensayo inmunoenzimático.

Se sangraron los caballos al término de los nueve meses y el plasma fue mezclado y procesado para producir fragmentos F(ab')₂ por digestión con la enzima pepelina y su posterior purificación. Se determinó la dosis efectiva media de los fragmentos F(ab')₂ de manera similar a la descrita en el ejemplo 8. Se utilizaron 14 grupos de 5 ratones Balb-C

42

37

de 18-20 g, se inmunizaron dos grupos (uno control y uno con tratamiento con fragmentos F(ab')₂) para cada una de las siguientes proteínas recombinantes (toxinas recombinantes) o venenos: SMDrLr1-NH₂, SMDrLb-COOH, SMDrLi1-NH₂, SMDrLi2-COOH, veneno de *L. boneti*, veneno de *L. reclusa* y veneno de *L. laeta*. Para ello se les inyectó una mezcla preincubada (30 min a 37°C) de 5DL50 de la proteína recombinante o el veneno, ya sea con cantidades crecientes (de 100-200 µl) de los fragmentos F(ab')₂ obtenidos, en SS (NaCl 0.15 M) para los grupos con tratamiento, y con solamente SS para los grupos control. A partir de las DE50 determinadas con el ya citado programa GraphPad Prism, se calcularon las cantidades de toxina o veneno neutralizados por 1 mg de fragmentos F(ab')₂ (capacidad neutralizante) que se presentan a continuación:

Toxina recombinante o veneno natural	µg de toxina o veneno neutralizados por mg de fragmentos F(ab') ₂
SMDrLb-COOH	251
SMDrLr1-NH ₂	235
SMDrLi1-NH ₂	55
SMDrLi2-COOH	105
Veneno <i>L. boneti</i>	629
Veneno <i>L. reclusa</i>	587
Veneno <i>L. laeta</i>	394

EJEMPLO 18. Obtención de toxoides de la SMDrLb.

Con base en la identificación del centro catalítico de una de las isoformas de esfingomielinasas D de *L. laeta* recientemente reportada (Murakami et al. 2005), se decidió hacer mutagénesis sobre el DNA codificante de la SMDrLb (SEQ.ID.NO: 10), una mutante en el codón codificante del residuo de histidina de la posición 11, y la otra en el codón codificante del residuo de ácido glutámico de la posición 31, ambas contadas en la proteína madura. La primera mutante obtenida, denominada SMDrLb(H11K) consistió en la sustitución de la Histidina de la posición 11 por una Lisina y tiene una SEQ.ID.NO: 27 para su secuencia codificante y SEQ.ID.NO: 28 para la proteína madura expresada y la segunda mutante denominada SMDrLb(E31K) consistió en la sustitución del ácido glutámico de la posición 31 por Lisina y tiene una SEQ.ID.NO: 29 para su secuencia codificante y SEQ.ID.NO: 30 para la proteína madura expresada.

Para obtener las mutantes se utilizó la clona PQE30Lb-8c3.1 y el kit QuickChange de mutagénesis dirigida (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit) (Stratagene, La Jolla,

CA, USA) siguiendo el protocolo recomendado por la compañía (Papworth, C., et al., 1996).

Las dos mutantes SMDrLb(H11K) y SMDrLb(E31K) incorporadas en el vector pQE30 fueron aisladas y expresadas en forma controlada en la cepa *E. coli* BL21, de manera semejante a la descrita para la SMDrLb en el ejemplo 7.

Ambas proteínas fueron expresadas exitosamente en forma soluble (y parte como cuerpos de inclusión). Se les analizó su actividad enzimática de esfingomielinasa D por el método previamente descrito, resultando nula. Adicionalmente se hicieron pruebas de demonecrosis en conejos con lo que se demostró que carecen de este efecto.

Para determinar si estas versiones enzimáticamente inactivas y no demonecróticas pero expresadas en forma soluble, eran capaces de generar anticuerpos neutralizantes de la propia SMDrLb activa o del veneno de *L. boneti*, para cada una de las mutantes, se inocularon 2 conejos neozelandeses de 3.5 Kg, con un esquema de 8 inoculaciones, separadas 10 días entre sí, con cantidades incrementales de la proteína recombinante, desde 30 hasta 100 µg/conejo de proteína recombinante soluble (inactiva) en PBS. Las inoculaciones fueron intradérmicas en un volumen final de 1 ml, con 0.5 ml de adyuvante de Freund, completo para la primera inoculación e incompleto para las subsecuentes.

En ambos casos se obtuvieron títulos que variaron de entre 25,200 y 31,500. Para cada caso los 2 conejos se sangraron hasta blanco y se separó el suero de ambos conejos y se mezcló (50/50% en volumen).

Para determinar la dosis efectiva media, DE50 de la mezcla de sueros de cada caso, se usaron grupos de 4 ratones Balb-C de 18-20 g, inyectándoseles una mezcla preincubada (30 min a 37°C) de 12 µg de toxina SMDrLb con cantidades crecientes de la mezcla del suero de los 2 conejos inmunizados, en SS (NaCl 0.15 M),

A partir de las DE50 determinadas con el ya citado programa GraphPad Prism, se calcularon las cantidades de toxina o veneno neutralizados por 1 ml de cada uno de los sueros (capacidad neutralizante) que se presentan a continuación:

44

39

Toxina recombinante o veneno natural	µg de toxina o veneno neutralizados por ml de suero	
	anti- SMDrLb(H11K)	anti- SMDrLb(E31K)
SMDrLb-COOH	58.5	53.8
Veneno <i>L. batelli</i>	182.5	151.1

REFERENCIAS

- Alouf, Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138B:309 (1985).
- 5 Araujo, C. P., Alvarenga, L. M., Mangili, O. C., Kalapothakis, E., Chavez, O. C.,
2003 Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider
venom by immunization with a fused recombinant protein. *Toxicon*, 41 (3): 261-267.
- Audibert, F., Jollivet, M., Chedid, L., Amon R., and Sela, M., 1982. Successful immunization
10 with a totally synthetic diphtheria vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (16):5042-5048.
- Ayeb and Delori, In: Handbook of Natural Toxins, vol. 2, Insect Poisons, Allergens, and
Other Invertebrate Venoms (Anthony T. Tu, Ed.) (Marcel Dekker) (1984) Cap. 18, pp. 607-
638.
- 15 Barbaro, K.C., Ferreira, M.L., Cardoso, D.F., Eickstedt, V.R.D., Mota, I., 1996*. Identification
and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. *Braz. J. Med.
Biol. Res.* 29(11) 1491-1497 pp.
- 20 Barbaro, K.C., Sousa M.V., Morhy, L., Eickstedt, V.R.D., Mota, I. 1996*. Compared
chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus
Loxosceles (Araneae). *Journal Protein Chemical.* 15 (4), 337-343 pp.
- Cevallos, M.A., C. Navarro-Duque, M. Varela-Julia and A. C. Alagón. 1992. Molecular mass
25 determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-
polyacrilamide gel electrophoresis. *Toxicon* 30(8), 925-930 pp.
- Feltosa, L., Gramski, W., Velga, S.S., Elias, M.C.Q.B., Graner, E., Mangili, O.C. and
Brentani, R.R. 1998. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic,
30 fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*)
venom. *Toxicon*, . 36(7): 1039-1051.
- Fernandes Pedrosa, M.F., Junqueira de Azevedo I.L., Gonçalves-de-Andrade,
R.M., van den Berg, C.W., Ramos, C.R., Ho, P.L., Tambourgi, D.V. 2002.
- 35 Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and
haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem Biophys. Res Comm.*

F
46

288 (5), 638-45.

Furlanetto, R.S., Santos, N.P., Navas, J., 1962^a. Preparacao, purificacao e doseamento do soro antiloxoscélico. *Ciencia e Cultura* 14, 254.

5

Furlanetto, R.S., Bucherl, W., Rosa, R.R., Saliba, F., Navas, J., 1962^b. Observacao dos efeitos do veneno loxoscélico e avaliacao de sua atividade. *Ciencia e Cultura* 14, 254.

10

Gatt, S., Dinur, T., Barenholtz, Y., 1978. A spectrophotometric method for determination of sphingomyelinase. *Biochim. Biophys. Acta* 530, 503-507 pp.

Geren, C.R., Odell G.V. 1964. The biochemistry of spider venoms. In Tu, A.T. (Ed.), *Insect Poisons, Allergens, and Other Invertebrate Venoms*, Vol. 2. Marcel Dekker, New York, 441-481 pp.

15

Geratch, W.J., Ennik, F. 1983. The spider Genus *Loxosceles* In North America, Central America and the West India (Araneae, Loxoscelidae). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. USA* 176(3): 284-380 pp.

20 Gomez, H. F., M. J. Miller, M. W. Weggener, H. A. Lankford and J. S. Warren. (2001). Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *Loxosceles* spider species. *Toxicon* 39(7): 991-1002.

25 Guilherme, P., Fernandes, I., and Barbaro, K.C., 2001. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. *Toxicon* 39(9), pp. 1333-1342.

Hoffmann, A. 1976. Relación bibliográfica de las arañas de México (Arachnida: Araneae). Instituto de Biología, UNAM. Publicaciones especiales. 3: 21-23 pp.

30

Kalapohtakis, E., Araujo, S. C., de Castro, C. S., Mendes, T.M., Gomez M. V., Mangli, O. C., Gubert, I. C., Chavez, O. C. 2002 Molecular cloning, expression and immunological properties of LID1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles Intermedia* spider venom. *Toxicon* , 40 (12): 1691-1699.

35

Kukongviriyapan et al., J. Immunol. Meth. 48:97 (1982).

- Lomonte B., Gutierrez, J.M., and Mata, E., 1985. Isolation from a polyvalent antivenom of antibodies to a myotoxin in *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 23 (5): 807-813.
- 5 Maguire, J.H., Spielman A. Infestaciones por ectoparásitos y mordeduras y picaduras de artrópodos. En: Fauci A.S., Braunwald E., Isselbacher K.J., Wilson J.D., Martin J.B., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L., eds. 1998. *Principios de Medicina Interna*. Vol. II España: McGraw Hill-Interamericana:2908.
- 10 Mathews, C. y Holdo, K. 1998. *Bioquímica*. Segunda edición, Editorial Mc-GrawHill Interamericana, España.
- Moye De Alba, C.E. Picaduras y mordeduras . En Aguilar C.S., Chevolle R.J., Saucedo J, Kaplan, S.M., Díaz A.; Eraña, G.J., eds. 1997. *Manual de Terapéutica Médica y*
- 15 *Procedimientos de Urgencias*. México: Mc Graw Hill- Interamericana; 2835 pp.
- Murakami, M.T., Fernandes-Pedrosa M.F., Tambourgi V.D. and Arri, R.K. 2005. Structural basis for metal-ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J. Biol. Chem.* 280(14): 13,858-13,864.
- 20 Papwoth, C., Bauer, J.C., Braman, J. and Wright, D.A. 1998. Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Strategies* 9: 3-4.
- pET System Manual. Novagen. 9th Edition. 2000. Pag. 11.
- 25 Plattick, N.I. 2000 The World of Spider Catalog. The American Museum of Natural History. <http://research.amnh.org/entomology/spiders/>
- Ramoa, R.H., Vázquez R.I. 2000. Arañismo ocasionado por especies del Género *Loxosceles*, dentro del apartado Urgencias Médico-quirúrgicas. *Revista Educativa para la Salud*. 25-34 pp.
- 30 Rosse, W., Flankin, B.H. Anemias hemolíticas y por pérdida aguda de sangre. En: Fauci AS, Braunwald E., Isselbacher, K.J., Wilson J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo D.L., eds. *Principios de Medicina Interna*. Vol. 1, España: Mc Graw Hill-Interamericana, 1998. 784 pp.
- 35

Russell et al., 1985, Preparation . . . Chromatography, Am. J. Trop. Med. Hyg. 34:141-150.

Russell, F.E. 1987. Mordeduras y picaduras venenosas. En : Berkow R., Fletcher A, eds. El Manual Merck. España: Ediciones Doyma, 2835

5

Sánchez J. 1993. A cien Años de la Zoología Médica. México. Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

10 Tambourgi, D.V., Magnoli, F.C. van den Berg, C.W., Morgan, B.P., de Araujo, P.S., Alves, E.W., Dias Da Silva, W. 1998. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* responsible for both demonecrosis and complement-dependent hemolysis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 251 (1), 366-373 pp.

15 Tan, N.H., Ponnudurai, G., 1992. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. Comp. Biochem. Physiol. 103C (2), 299-302 pp.

20 Walsh, K.A., Ericsson, L.H., Parmelle, D.C., Titani, K., 1981. Advances in Protein Sequencing. Ann.Rev. Biochem. 50: 281-284.

Wright, R.P. 1973. Enzymatic characterization of brown recluse spider venom. Bull. Mo Acad. Sci. Supplement 2, 1-94 pp.

25 Yang, C.C., Lin M.F., and Chang, C.C., 1977. Purification of anticobrotoxin antibody by affinity chromatography. Toxicon 15 (1): 51-62

30 Young, A.R., S.J. Pincus. 2001. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotizing arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. Toxicon 39(2-3), 391-400 pp.

Se citan las siguientes patentes o solicitudes:

35 Solicitud de patente mexicana No: 9911191. Alagón, A., L. D. Possani, G. Gurrola, E. Grishin, A. Lipkin, y E. Volynski. "Inmunógeno, anti-veneno y vacuna contra el veneno de la araña viuda negra".

Patente norteamericana No. 5,904,922. Carroll, S. B. Treatment with polyvalent antivenom containing immunoglobulin which is greater than 50% venom-reactive.

- 5 Patente norteamericana No. 5,443,978. Carroll, S. B. Immobilization of *Crotalus atrox* and *Crotalus durissus terrificus* whole venoms on aldehyde-activated agarose.

Reivindicaciones.

Habiéndose descrito la presente invención se reivindica lo siguiente:

- 5 1. Una proteína aislada del veneno de la araña *Loxosceles boneti*, que presenta una actividad de esfingomielinasa y produce dermonecrosis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que tiene la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 11.
- 10 2. Una proteína recombinante que presenta una actividad de esfingomielinasa D y produce dermonecrosis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que comprende la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 11, o una mutación funcionalmente equivalente de la misma.
- 15 3. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 2, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 10, o una mutación silenciosa de la misma.
- 20 4. Una proteína recombinante que carece de actividad de esfingomielinasa D y que no produce dermonecrosis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que comprende la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 11 con una sustitución de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31, Asp33, Asp91, His11 y His47.
- 25 5. La proteína recombinante de la reivindicación 4, caracterizada por que la sustitución es en un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31 y His11.
- 30 6. La proteína recombinante de la reivindicación 5, caracterizada por que tiene la secuencia SEQ.ID.No: 28.
7. La proteína recombinante de la reivindicación 5, caracterizada por que tiene la secuencia SEQ.ID.No: 30.
- 35 8. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 4, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 10 con una mutación consistente de una sustitución del codón codificante de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31, Asp33, Asp91, His11 y His47.

- 51
9. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 5, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 10 con una mutación consistente de una sustitución del codón codificante de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31 y His11.
- 5
10. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 6, caracterizado por que tiene una secuencia nucleotídica SEQ.ID.No: 27.
- 10
11. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 7, caracterizado por que tiene una secuencia nucleotídica SEQ.ID.No: 29.
- 15
12. Una proteína recombinante que presenta una actividad de esfingomielinasa D y produce dermonecrosis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que comprende la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 13, o una mutación funcionalmente equivalente de la misma.
- 20
13. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 12, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 12, o una mutación silenciosa de la misma.
- 25
14. Una proteína recombinante que carece de actividad de esfingomielinasa D y que no produce dermonecrosis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que comprende la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 13 con una sustitución de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31, Asp33, Asp91, His11 y His47.
- 30
15. La proteína recombinante de la reivindicación 14, caracterizada por que la sustitución es en un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31 y His11.
- 35
16. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 14, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 12 con una mutación consistente de una sustitución del codón codificante de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31, Asp33, Asp91, His11 y His47.
17. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 15, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 12 con una mutación consistente de una sustitución del codón codificante de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31 y His11.

52

18. Una proteína recombinante que presenta una actividad de esfingomielinasa D y produce demonecrósis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que comprende la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 15, o una mutación funcionalmente
5 equivalente de la misma.
19. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 18, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 14, o una mutación silenciosa de la misma.
- 10 20. Una proteína recombinante que carece de actividad de esfingomielinasa D y que no produce demonecrósis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que comprende la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 16 con una sustitución de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31, Asp33, Asp91, His11 y His47.
- 15 21. La proteína recombinante de la reivindicación 20, caracterizada por que la sustitución es en un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31 y His11.
22. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 20, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 14 con una mutación consistente de una sustitución del codón codificante de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31, Asp33, Asp91, His11 y His47.
- 20 23. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 21, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 14 con una mutación consistente de una sustitución del codón codificante de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31 y His11.
- 25 24. Una proteína recombinante que presenta una actividad de esfingomielinasa D y produce demonecrósis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que comprende la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 18, o una mutación funcionalmente
30 equivalente de la misma.
25. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 24, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 18, o una mutación silenciosa de la misma.
- 35

26. Una proteína recombinante que carece de actividad de esfingomielinasa D y que no produce demonecrósis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que comprende la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 18 con una sustitución de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu32, Asp34, Asp91, His12 y His47.
- 5
27. La proteína recombinante de la reivindicación 26, caracterizada por que la sustitución es en un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu32 y His12.
- 10
28. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 26, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 18 con una mutación consistente de una sustitución del codón codificante de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu32, Asp34, Asp91, His12 y His47.
- 15
29. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 27, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 18 con una mutación consistente de una sustitución del codón codificante de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu32 y His12.
- 20
30. Una proteína recombinante que presenta una actividad de esfingomielinasa D y produce demonecrósis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que comprende la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 21, o una mutación funcionalmente equivalente de la misma.
- 25
31. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 30, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 20, o una mutación silenciosa de la misma.
- 30
32. Una proteína recombinante que carece de actividad de esfingomielinasa D y que no produce demonecrósis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que comprende la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 21 con una sustitución de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu32, Asp34, Asp91, His12 y His47.
- 35
33. La proteína recombinante de la reivindicación 32, caracterizada por que la sustitución es en un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu32 y His12.

54

34. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 32, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 20 con una mutación consistente de una sustitución del codón codificante de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu32, Asp34, Asp81, His12 o His47.

5

35. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 33, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 20 con una mutación consistente de una sustitución del codón codificante de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu32 y His12.

10

36. Un vector de expresión caracterizado por que comprende cualquiera de los fragmentos de DNA de las reivindicaciones 3, 8, 9, 10, 11, 13, 16, 17, 19, 22, 23, 25, 28, 31, 34 y 35.

15

37. Una Cepa bacteriana recombinante caracterizada por que ha sido transformada con el vector de la reivindicación 36.

38. La cepa bacteriana recombinante de la reivindicación 37 caracterizada por que es de *Escherichia coli*.

20

39. La cepa bacteriana recombinante de la reivindicación 38 caracterizada por que es *Escherichia coli* BL21.

25

40. Un método para la producción de las proteínas recombinantes de cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5, 6, 7, 12, 14, 15, 18, 20, 21, 24, 26, 27, 30, 32 o 33, caracterizado por que comprende los pasos de:

30

- a) Incubar en un medio adecuado y en condiciones adecuadas de cultivo, una cepa bacteriana recombinante transformada con un vector de expresión que comprende un fragmento de DNA seleccionado del grupo que consiste de los fragmentos de DNA con secuencia SEQ. ID. NO: 10, SEQ. ID. NO: 12, SEQ. ID. NO: 14, SEQ. ID. NO: 18, SEQ. ID. NO: 20, SEQ. ID. NO: 27 y SEQ. ID. NO: 28,
- b) opcionalmente, separar del medio la masa celular y
- c) romper las células para liberar la proteína y
- d) opcionalmente separar y purificar la proteína recombinante.

35

41. El método de la reivindicación 40, caracterizado por que, adicionalmente después del paso de incubación, al alcanzarse una masa celular adecuada, se induce la expresión con

una concentración de IPTG de 0.1mM, a una temperatura entre 20 y 25°C y por un período de al menos 12 a 20 hr.

42. El método de la reivindicación 40, caracterizado por que la cepa bacteriana es de
5 *Escherichia coli*.

43. El método de la reivindicación 42, caracterizado por que la cepa de *Escherichia coli* es BL21.

10 44. Una composición inmunogénica o antigénica que comprende al menos una de las proteínas de las reivindicaciones 2, 4, 5, 6, 7, 12, 14, 15, 18, 20, 21, 24, 26, 27, 30, 32 o 33.

15 45. Un método para producir anticuerpos contra el veneno de arañas del género *Loxosceles*, caracterizado por que comprende el inyectar en un vertebrado, una cantidad efectiva suficiente para generar anticuerpos, de una composición inmunogénica o antigénica que comprende al menos una proteína recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5, 6, 7, 12, 14, 15, 18, 20, 21, 24, 26, 27, 30, 32 o 33.

20 46. El método de la reivindicación 45, caracterizado por que el vertebrado es un mamífero.

47. El método de la reivindicación 46, caracterizado por que el mamífero es un caballo.

25 48. El método de la reivindicación 45 caracterizado por que los anticuerpos son neutralizantes del veneno de la araña *Loxosceles*.

49. El método de la reivindicación 45, caracterizado por que adicionalmente incluye la recuperación de dichos anticuerpos de dicho mamífero y opcionalmente su purificación.

30 50. El método de la reivindicación 48 caracterizado por que dicha araña *Loxosceles* es de una especie seleccionada del grupo que consiste de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*.

35 51. Una composición farmacéutica de los anticuerpos producidos mediante el método de la reivindicación 48, o sus fragmentos de unión al antígeno y adyuvantes farmacéuticos aceptables, caracterizada por que dicha composición neutraliza el efecto *in vivo* del veneno de arañas del género *Loxosceles*.

Handwritten marks: a stylized 'M' and a signature.

52. La composición de la reivindicación 51 caracterizada por que dicha araña *Loxosceles* es de una especie seleccionada del grupo que consiste de *L. boneti*, *L. reclusa* o *L. laeta*.

53. Una composición que comprende al menos una proteína recombinante cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5, 6, 7, 12, 14, 15, 18, 20, 21, 24, 26, 27, 30, 32 o 33 ligadas a un sustrato caracterizado por que dicha composición liga específicamente anticuerpos generados contra el veneno de arañas del género *Loxosceles* o contra el veneno de arañas *Loxosceles* enriquecidos con al menos una de las proteínas recombinantes de las reivindicaciones 2, 4, 5, 6, 7, 12, 14, 15, 18, 20, 21, 24, 26, 27, 30, 32 o 33.

10

54. Un dispositivo de diagnóstico caracterizado por que comprende la composición de la reivindicación 53.

55. Un método para diagnosticar si la araña que mordió a un individuo pertenece a una especie particular de *Loxosceles* caracterizado porque se hace contactar el dispositivo diagnóstico de la reivindicación 54 con una muestra del individuo picado y se detecta la presencia de anticuerpos específicos en el dispositivo.

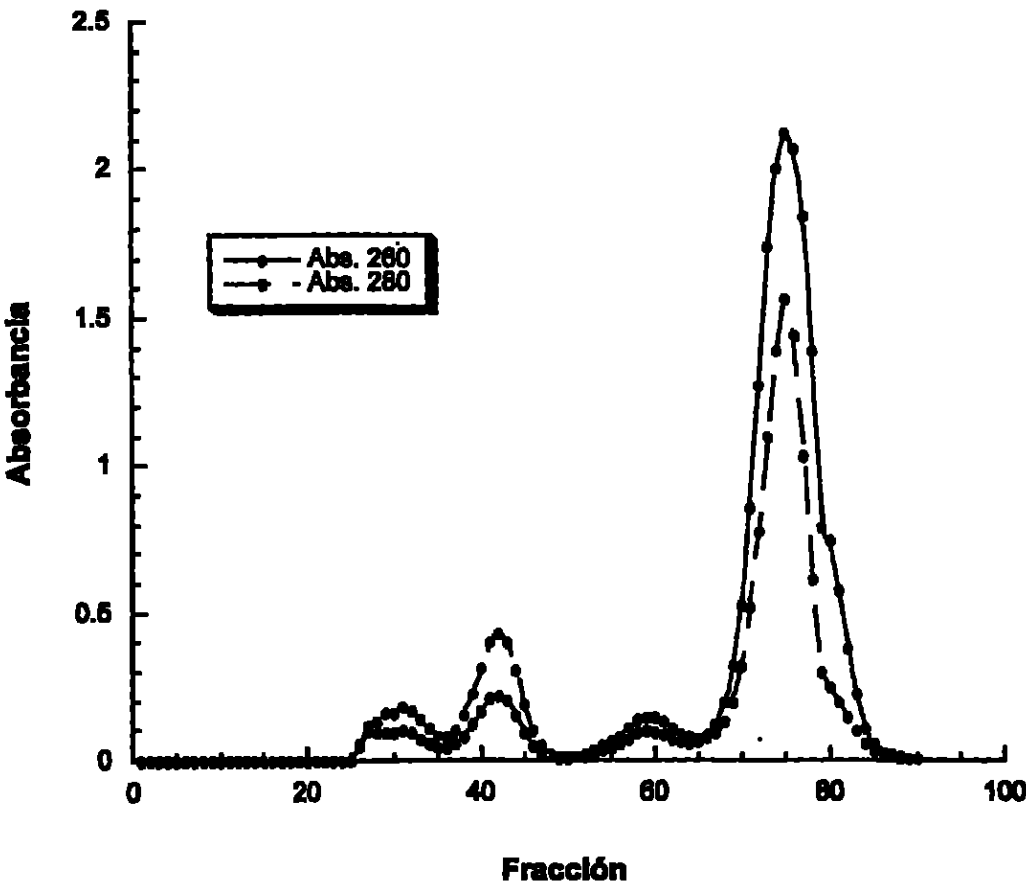
56. Un método para tratar el envenenamiento por mordedura de arañas *Loxosceles* caracterizado por que comprende el administrar a un individuo que requiere dicho tratamiento la composición farmacéutica de la reivindicación 51.

20

57

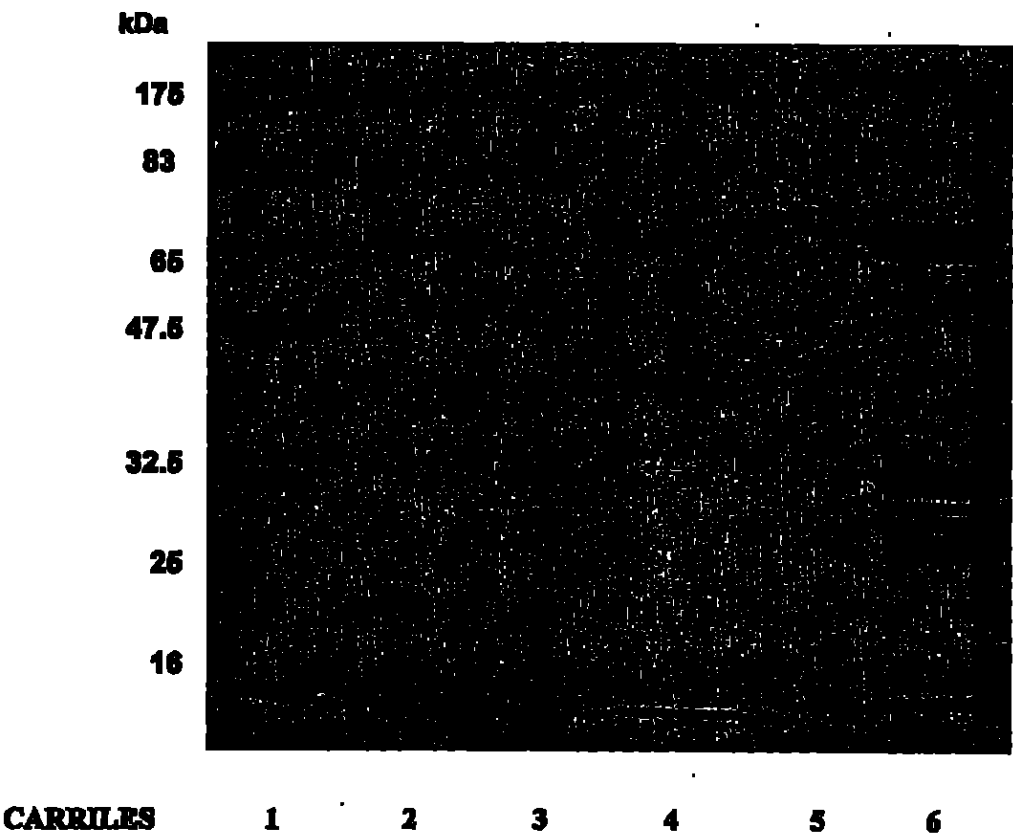
1/5

FIGURA 1



58

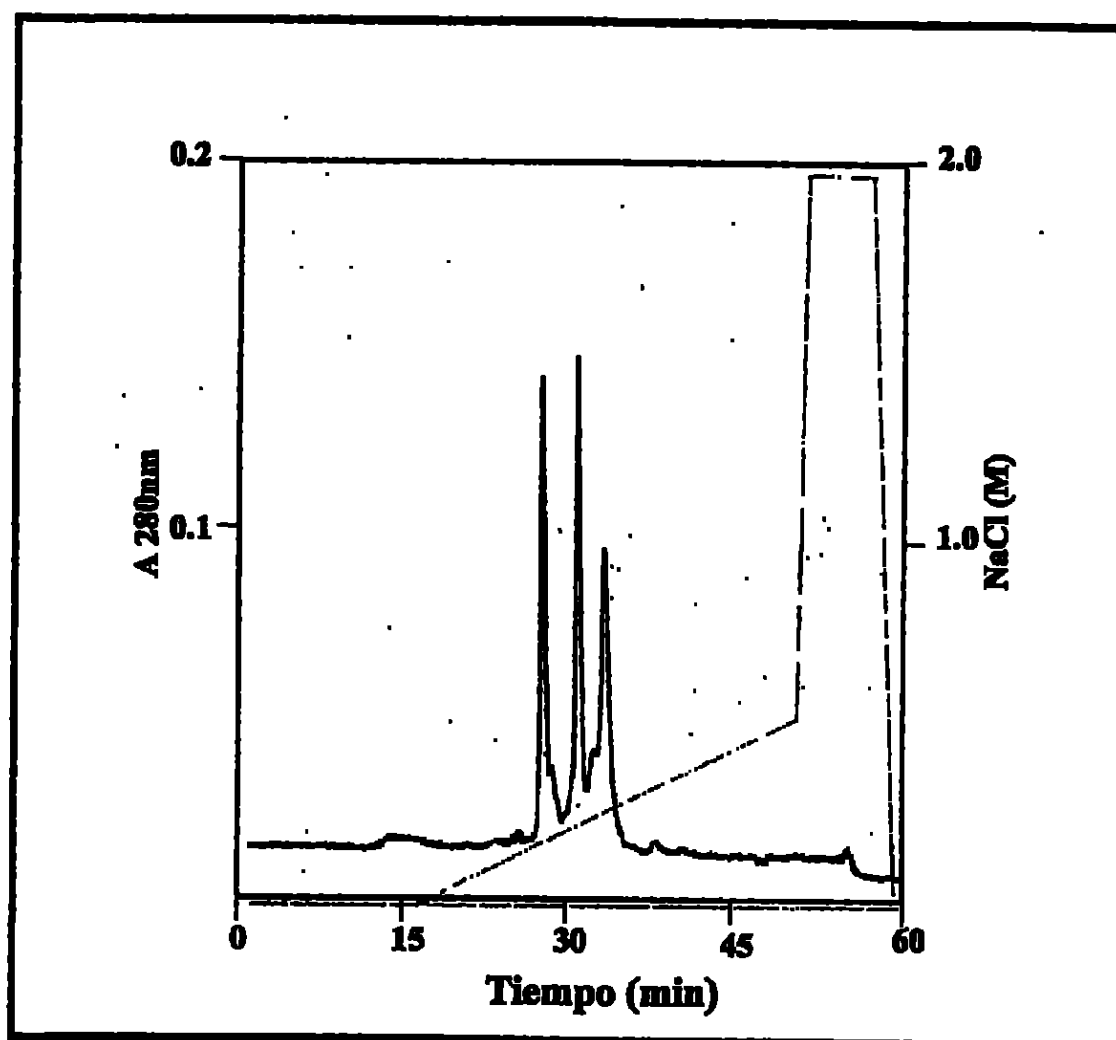
FIGURA 2



P
59

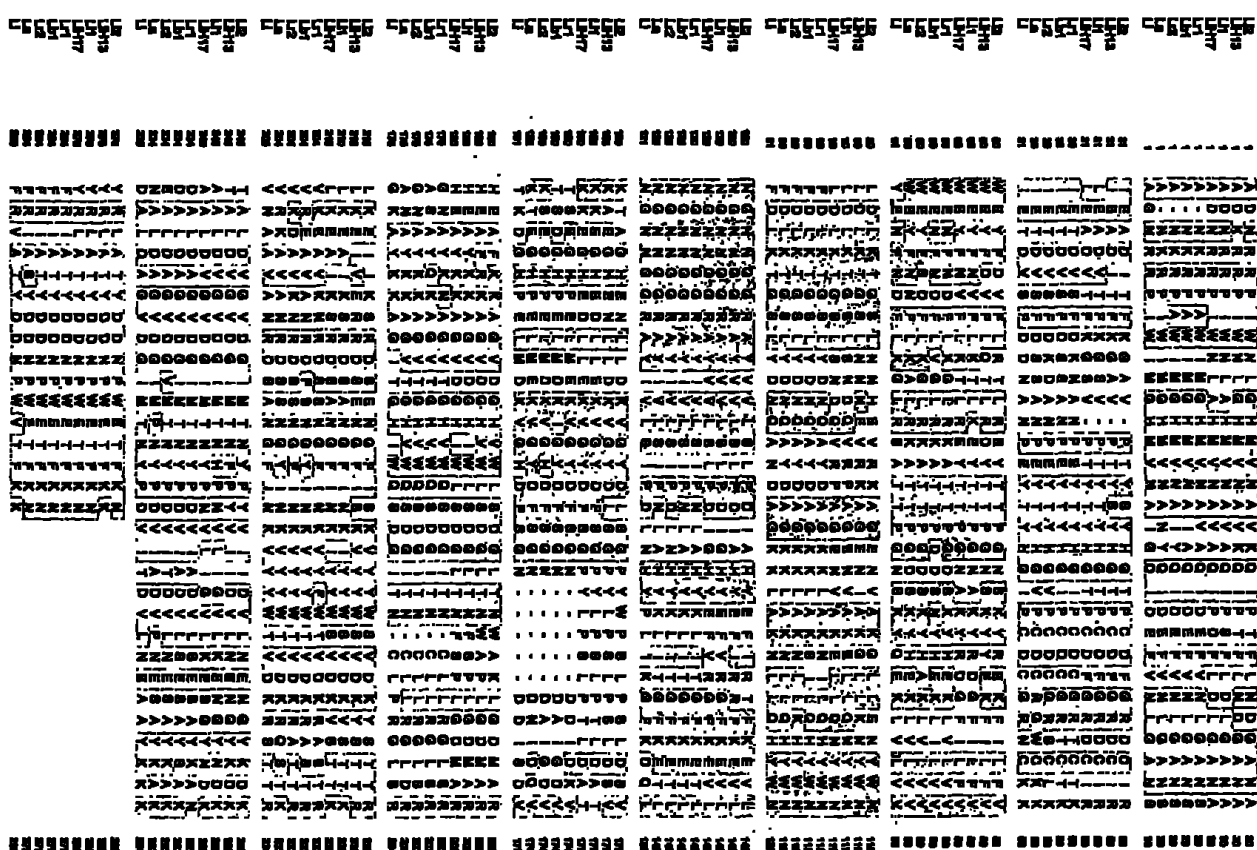
3/5

FIGURA 3



55 51

FIGURA 4



Porcentaje de identidad de aminoácidos entre necrotodinas de diferentes especies de *Loxosceles*.

especie	Lb1	Lr1	Lr2	La	Li	Li-H17	Li-H18	Li-1	Li-2
Lb1	-								
Lr1	91	-							
Lr2	84	90	-						
La	86	88	87	-					
Li	82	84	85	80	-				
Li-H17	57	60	60	59	59	-			
Li-H18	57	60	61	58	60	80	-		
Li-1	56	59	59	58	59	99	80	-	
Li-2	67	60	61	59	59	82	94	82	-

5/5

FIGURA 5

No. de secuencias: 30

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 1

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 35 aa
 - (B) TIPO: aminoácidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: péptido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (V) TIPO DE FRAGMENTO: Amino terminal
- (VI) FUENTE ORIGINAL
 - (A) ORGANISMO: *Loxosceles boneti*
- (IX) CARACTERISTICAS
 - (A) NOMBRE: Fragmento de esfingomielinasa D, isoforma I
 - (B) LOCALIZACION: 1 a 35

Ala Asn Lys Arg Pro Ala Trp Ile Met Gly His Met Val Asn Ala Ile
1 5 10 15

Ala Gln Ile Asp Glu Phe Val Asn Leu Gly Ala Asn Ser Ile Glu Thr
20 25 30

Asp Val Ser
35

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 2

- (I) **CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:**
 (A) **LONGITUD:** 33 aa
 (B) **TIPO:** aminoácidos
 (II) **TIPO DE MOLECULA:** péptido
 (III) **HIPOTÉTICA:** No
 (V) **TIPO DE FRAGMENTO:** Amino terminal

64
76

- (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL
- (A) ORGANISMO: Artificial
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: oligonucleótido Adapted Primer
- (B) LOCALIZACION: 1 a 37

ggccacgcgt cgactagtac tttttttttt tttttt

37

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 5

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 20 pb
 - (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL
- (A) ORGANISMO: Artificial
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: oligonucleótido AUAP
- (B) LOCALIZACION: 1 a 20

ggccacgcgt cgactagtac

20

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 6

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 17pb
 - (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido

- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL
- (A) ORGANISMO: Artificial
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: oligonucleótido Lb1
- (B) LOCALIZACION: 1 a 17

ccigcittgga thatggg 17

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 7

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 17 pb
- (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL
- (A) ORGANISMO: Artificial
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: oligonucleótido Lb-nested
- (B) LOCALIZACION: 1 a 17

gathatgggi cayatggt 17

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 8

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 36 pb
- (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No

66 J

(VI) FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Artificial

(IX) CARACTERISTICAS

(A) NOMBRE: oligonucleótido Lb5'Bam HI

(B) LOCALIZACION: 1 a 36

aaaggatccg cgaalaaacg cccggcgtgg atcatg

36

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 9

(I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pb

(B) TIPO: nucleótidos

(II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido

(III) HIPOTÉTICA: No

(IV) ANTISENTIDO: No

(VI) FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Artificial

(IX) CARACTERISTICAS

(A) NOMBRE: oligonucleótido Lb3'Sal I

(B) LOCALIZACION: 1 a 27

gggggtcgac ttaattcttg aatgttc

27

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 10

(I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 837 pb

(B) TIPO: nucleótidos

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGIA: lineal

(II) TIPO DE MOLECULA: ADNc para ARNm

(III) HIPOTÉTICA: No

67 \$

- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: *Loxosceles boneti*
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: Clona Lb1
- (B) LOCALIZACION: 1-837
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: Secuencia codificadora
- (B) LOCALIZACION: 1-837

gcg aac aaa cgc ccg gcg tgg atc atg ggc cac atg gtc aat gct att	48
Ala Asn Lys Arg Pro Ala Trp Ile Met Gly His Met Val Asn Ala Ile	
1 5 10 15	
gct cag ata gac gag ttt gtg aac ctt gga gcg aat tcc att gaa aca	96
Ala Gln Ile Asp Glu Phe Val Asn Leu Gly Ala Asn Ser Ile Glu Thr	
20 25 30	
gac gtg tct ttc gac tca agt gcc aat cct gaa tat acg tat cat ggt	144
Asp Val Ser Phe Asp Ser Ser Ala Asn Pro Glu Tyr Thr Tyr His Gly	
35 40 45	
att cca tgt gat tgt gga.agg act tgt acg aag tgg gag aat ttc aac	192
Ile Pro Cys Asp Cys Gly Arg Thr Cys Thr Lys Trp Glu Asn Phe Asn	
50 55 60	
gat ttt ctg gta gga ctg cga aag gcc aca aca cca gac gac tcc aac	240
Asp Phe Leu Val Gly Leu Arg Lys Ala Thr Thr Pro Asp Asp Ser Asn	
65 70 75 80	
tat cat gaa aag ttg att tta gtt gta ttt gac ctg aaa acc ggt agc	288
Tyr His Glu Lys Leu Ile Leu Val Val Phe Asp Leu Lys Thr Gly Ser	
85 90 95	
ctc tac gat aac caa gct tac gac gct ggg aag aaa tta gcg aaa agt	336
Leu Tyr Asp Asn Gln Ala Tyr Asp Ala Gly Lys Lys Leu Ala Lys Ser	
100 105 110	
ata ctt cag cat tac tgg aac aac ggc aat aat ggt gga aga gca tac	384
Ile Leu Gln His Tyr Trp Asn Asn Gly Asn Asn Gly Gly Arg Ala Tyr	
115 120 125	
att gta tta tcc ata.cca aac ctt gcc cat tat aaa tta att act gga	432
Ile Val Leu Ser Ile Pro Asn Leu Ala His Tyr Lys Leu Ile Thr Gly	

130	135	140	
ttt aaa gaa acg ctc aca agc gat ggg cat cca gag ttg atg gac aaa			480
Phe Lys Glu Thr Leu Thr Ser Asp Gly His Pro Glu Leu Met Asp Lys			
145	150	155	160
att gga tat gac ttc tct gga aac gat gcc atc ggc gac gtt gca agt			528
Ile Gly Tyr Asp Phe Ser Gly Asn Asp Ala Ile Gly Asp Val Ala Ser			
	165	170	175
gct tac cag aaa gcc gga gta aca gga cat gtg tgg cag agc gat ggc			576
Ala Tyr Gln Lys Ala Gly Val Thr Gly His Val Trp Gln Ser Asp Gly			
	180	185	190
atc acc aac tgt tta ctg cgc gga ctt agt cgc gtg agg gaa gcg gtc			624
Ile Thr Asn Cys Leu Leu Arg Gly Leu Ser Arg Val Arg Glu Ala Val			
	195	200	205
gca aac aga gat tct tcc aac gga tac att aac aaa gtg tac tat tgg			672
Ala Asn Arg Asp Ser Ser Asn Gly Tyr Ile Asn Lys Val Tyr Tyr Trp			
	210	215	220
aca gtg gac aag cgc gca tcg act aga gat gca ctc gat gct gga gtc			720
Thr Val Asp Lys Arg Ala Ser Thr Arg Asp Ala Leu Asp Ala Gly Val			
	225	230	235
gat gga ata atg acc aat tac cca gat gtt att gct gat gtc ctc agt			768
Asp Gly Ile Met Thr Asn Tyr Pro Asp Val Ile Ala Asp Val Leu Ser			
	245	250	255
gaa tct gct tat agt gcg aaa ttc aga att gcc aca tac gac gac aat			816
Glu Ser Ala Tyr Ser Ala Lys Phe Arg Ile Ala Thr Tyr Asp Asp Asn			
	260	265	270
cct tgg gaa aca ttc aag aat			837
Pro Trp Glu Thr Phe Lys Asn			
	275		

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 11

(I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 279 aa

(B) TIPO: aminoácidos

(II) TIPO DE MOLECULA: Proteína completa

(III) HIPOTÉTICA: No

(VI) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Loxosceles boneti*

(IX) CARACTERISTICAS

(A) NOMBRE: Proteína SMDrLb

(B) LOCALIZACION: 1-279

(D) INFORACIÓN ADICIONAL: Presenta Actividad Esfingomielinasa D y dermonecrotica.

Ala	Asn	Lys	Arg	Pro	Ala	Trp	Ile	Met	Gly	His	Met	Val	Asn	Ala	Ile	1	5	10	15
Ala	Gln	Ile	Asp	Glu	Phe	Val	Asn	Leu	Gly	Ala	Asn	Ser	Ile	Glu	Thr	20	25	30	
Asp	Val	Ser	Phe	Asp	Ser	Ser	Ala	Asn	Pro	Glu	Tyr	Thr	Tyr	His	Gly	35	40	45	
Ile	Pro	Cys	Asp	Cys	Gly	Arg	Thr	Cys	Thr	Lys	Trp	Glu	Asn	Phe	Asn	50	55	60	
Asp	Phe	Leu	Val	Gly	Leu	Arg	Lys	Ala	Thr	Thr	Pro	Asp	Asp	Ser	Asn	65	70	75	80
Tyr	His	Glu	Lys	Leu	Ile	Leu	Val	Val	Phe	Asp	Leu	Lys	Thr	Gly	Ser	85	90	95	
Leu	Tyr	Asp	Asn	Gln	Ala	Tyr	Asp	Ala	Gly	Lys	Lys	Leu	Ala	Lys	Ser	100	105	110	
Ile	Leu	Gln	His	Tyr	Trp	Asn	Asn	Gly	Asn	Asn	Gly	Gly	Arg	Ala	Tyr	115	120	125	
Ile	Val	Leu	Ser	Ile	Pro	Asn	Leu	Ala	His	Tyr	Lys	Leu	Ile	Thr	Gly	130	135	140	
Phe	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Gly	His	Pro	Glu	Leu	Met	Asp	Lys	145	150	155	160
Ile	Gly	Tyr	Asp	Phe	Ser	Gly	Asn	Asp	Ala	Ile	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	165	170	175	
Ala	Tyr	Gln	Lys	Ala	Gly	Val	Thr	Gly	His	Val	Trp	Gln	Ser	Asp	Gly	180	185	190	
Ile	Thr	Asn	Cys	Leu	Leu	Arg	Gly	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Val	195	200	205	
Ala	Asn	Arg	Asp	Ser	Ser	Asn	Gly	Tyr	Ile	Asn	Lys	Val	Tyr	Tyr	Trp	210	215	220	
Thr	Val	Asp	Lys	Arg	Ala	Ser	Thr	Arg	Asp	Ala	Leu	Asp	Ala	Gly	Val	225	230	235	240
Asp	Gly	Ile	Met	Thr	Asn	Tyr	Pro	Asp	Val	Ile	Ala	Asp	Val	Leu	Ser				

70 \$

	245		250		255
Glu Ser Ala Tyr Ser Ala Lys Phe Arg Ile Ala Thr Tyr Asp Asp Asn					
260		265		270	
Pro Trp Glu Thr Phe Lys Asn					
275					

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 12

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 837 pb
 - (B) TIPO: nucleóidos
 - (C) TIPO DE CADENA: doble
 - (D) TOPOLOGIA: lineal
- (II) TIPO DE MOLECULA: ADNc para ARNm
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: *Laxosceles reclusa*
- (IX) CARACTERISTICAS
 - (A) NOMBRE: Clona Lr1
 - (B) LOCALIZACION: 1-837
- (IX) CARACTERISTICAS
 - (A) NOMBRE: Secuencia codificadora
 - (B) LOCALIZACION: 1-837

gcg aac aaa cgc ccg gcg tgg atc atg ggg cac atg gtc aac gct att	48
Ala Asn Lys Arg Pro Ala Trp Ile Met Gly His Met Val Asn Ala Ile	
1 5 10 15	
tat cag ata gac gag ttt gtg aac ctt gga gcg aat tcc att gaa aca	96
Tyr Gln Ile Asp Glu Phe Val Asn Leu Gly Ala Asn Ser Ile Glu Thr	
20 25 30	
gac gtg tct ttc gac aaa gat gcc aat cct gaa tac acg tat cac ggc	144
Asp Val Ser Phe Asp Lys Asp Ala Asn Pro Glu Tyr Thr Tyr His Gly	
35 40 45	
gtt cca tgt gat tgc ggg agg tct tgc ttg aag tgg gag tat ttt agc	192
Val Pro Cys Asp Cys Gly Arg Ser Cys Leu Lys Trp Glu Tyr Phe Ser	

50	55	60	
gat ttt cta aaa ggt cta cga aaa gcc aca aca cca ggc gat tcc aag			240
Asp Phe Leu Lys Gly Leu Arg Lys Ala Thr Thr Pro Gly Asp Ser Lys			
65	70	75	80
tat cat gca aaa tta gtg tta gtt gta ttt gac ctg aaa acc ggc agc			288
Tyr His Ala Lys Leu Val Leu Val Val Phe Asp Leu Lys Thr Gly Ser			
85	90	95	
ctc tac gat aac caa gct tac gac gca gga aag aag tta gcg aaa aat			336
Leu Tyr Asp Asn Gln Ala Tyr Asp Ala Gly Lys Lys Leu Ala Lys Asn			
100	105	110	
ctg ctt aag cat tac tgg aac aac ggc aat aat ggt gga aga gca tac			384
Leu Leu Lys His Tyr Trp Asn Asn Gly Asn Asn Gly Gly Arg Ala Tyr			
115	120	125	
att gta tta tcc ata cca gac ctt aac cat tat aaa tta att act gga			432
Ile Val Leu Ser Ile Pro Asp Leu Asn His Tyr Lys Leu Ile Thr Gly			
130	135	140	
ttt aaa gaa acg ctc aaa agc gag ggg cat ccc gag tta atg gac aaa			480
Phe Lys Glu Thr Leu Lys Ser Glu Gly His Pro Glu Leu Met Asp Lys			
145	150	155	160
gtt gga cat gac ttc tct gga aac gat gcc atc ggc gac gtc ggg aat			528
Val Gly His Asp Phe Ser Gly Asn Asp Ala Ile Gly Asp Val Gly Asn			
165	170	175	
gct tac aag aaa gcc gga gta aca gga cat gtg tgg cag agc gat ggc			576
Ala Tyr Lys Lys Ala Gly Val Thr Gly His Val Trp Gln Ser Asp Gly			
180	185	190	
atc acc aac tgt tta ctg cgg gga ctt agt cgt gtg aag gat gct gtg			624
Ile Thr Asn Cys Leu Leu Arg Gly Leu Ser Arg Val Lys Asp Ala Val			
195	200	205	
aaa aac aga gat tct tca aac gga ttc att aac aaa gtg tac tat tgg			672
Lys Asn Arg Asp Ser Ser Asn Gly Phe Ile Asn Lys Val Tyr Tyr Trp			
210	215	220	
aca gtg gac aag cgc gca acg act aga gag gca ctc gat gct gga gtc			720
Thr Val Asp Lys Arg Ala Thr Thr Arg Glu Ala Leu Asp Ala Gly Val			
225	230	235	240
gat ggc gtg atg acc aat tac ccg gat gtt att act gat gtt ctc aac			768
Asp Gly Val Met Thr Asn Tyr Pro Asp Val Ile Thr Asp Val Leu Asn			
245	250	255	
gaa tct gct tat aag gcg aaa ttc aga att gcc aca tac gac gac aat			816
Glu Ser Ala Tyr Lys Ala Lys Phe Arg Ile Ala Thr Tyr Asp Asp Asn			

72 7

260265270

cct tgg gaa aca ttc aag aat

Pro Trp Glu Thr Phe Lys Asn

275

837

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 13

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 279 aa
- (B) TIPO: aminoácidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: Proteína completa
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: *Loxosceles reclusa*
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: Proteína SMDrLr1
- (B) LOCALIZACION: 1-279
- (D) INFORACIÓN ADICIONAL: Presenta Actividad Esfingomielinasa D y dermonecrotica.

Ala Asn Lys Arg Pro Ala Trp Ile Met Gly His Met Val Asn Ala Ile

151015

Tyr Gln Ile Asp Glu Phe Val Asn Leu Gly Ala Asn Ser Ile Glu Thr

202530

Asp Val Ser Phe Asp Lys Asp Ala Asn Pro Glu Tyr Thr Tyr His Gly

354045

Val Pro Cys Asp Cys Gly Arg Ser Cys Leu Lys Trp Glu Tyr Phe Ser

505560

Asp Phe Leu Lys Gly Leu Arg Lys Ala Thr Thr Pro Gly Asp Ser Lys

65707580

Tyr His Ala Lys Leu Val Leu Val Val Phe Asp Leu Lys Thr Gly Ser

859095

Leu Tyr Asp Asn Gln Ala Tyr Asp Ala Gly Lys Lys Leu Ala Lys Asn

100105110

Leu Leu Lys His Tyr Trp Asn Asn Gly Asn Asn Gly Gly Arg Ala Tyr

115120125

Ile Val Leu Ser Ile Pro Asp Leu Asn His Tyr Lys Leu Ile Thr Gly

130	135	140
Phe Lys Glu Thr Leu Lys Ser Glu Gly His Pro Glu Leu Met Asp Lys		
145	150	155
Val Gly His Asp Phe Ser Gly Asn Asp Ala Ile Gly Asp Val Gly Asn		
165	170	175
Ala Tyr Lys Lys Ala Gly Val Thr Gly His Val Trp Gln Ser Asp Gly		
180	185	190
Ile Thr Asn Cys Leu Leu Arg Gly Leu Ser Arg Val Lys Asp Ala Val		
195	200	205
Lys Asn Arg Asp Ser Ser Asn Gly Phe Ile Asn Lys Val Tyr Tyr Trp		
210	215	220
Thr Val Asp Lys Arg Ala Thr Thr Arg Glu Ala Leu Asp Ala Gly Val		
225	230	235
Asp Gly Val Met Thr Asn Tyr Pro Asp Val Ile Thr Asp Val Leu Asn		
245	250	255
Glu Ser Ala Tyr Lys Ala Lys Phe Arg Ile Ala Thr Tyr Asp Asp Asn		
260	265	270
Pro Trp Glu Thr Phe Lys Asn		
275		

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 14

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 837 pb
 - (B) TIPO: nucleóidos
 - (C) TIPO DE CADENA: doble
 - (D) TOPOLOGIA: lineal
- (II) TIPO DE MOLECULA: ADNc para ARNm
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: *Loxosceles reclusa*
- (IX) CARACTERISTICAS
 - (A) NOMBRE: Clona Lr2
 - (B) LOCALIZACION: 1-837
- (IX) CARACTERISTICAS

(A) NOMBRE: Secuencia codificadora

(B) LOCALIZACION: 1-837

gcg aac aaa cgc ccg gcg tgg atc atg ggg cac atg gtc aac gct att	48
Ala Asn Lys Arg Pro Ala Trp Ile Met Gly His Met Val Asn Ala Ile	
1 5 10 15	
tat cag ata gac gag ttt gtg aac ctt gga gcg aat tcc att gaa aca	96
Tyr Gln Ile Asp Glu Phe Val Asn Leu Gly Ala Asn Ser Ile Glu Thr	
20 25 30	
gac gtg tct ttc gac aaa gat gcc aat cct gaa tac acg tat cac ggc	144
Asp Val Ser Phe Asp Lys Asp Ala Asn Pro Glu Tyr Thr Tyr His Gly	
35 40 45	
gtt cca tgt gat tgc ggg agg tct tgc ttg aag tgg gag tat ttt agc	192
Val Pro Cys Asp Cys Gly Arg Ser Cys Leu Lys Trp Glu Tyr Phe Ser	
50 55 60	
gat ttt cta aaa ggt cta cga aaa gcc aca aca cca ggc gat tcc aag	240
Asp Phe Leu Lys Gly Leu Arg Lys Ala Thr Thr Pro Gly Asp Ser Lys	
65 70 75 80	
tat cat gca aaa tta gtg tta gtt gta ttt gac ctg aaa acc ggc agc	288
Tyr His Ala Lys Leu Val Leu Val Val Phe Asp Leu Lys Thr Gly Ser	
85 90 95	
ctc tac gat aac caa gct tac gac gca gga aag aag tta gcg aaa aat	336
Leu Tyr Asp Asn Gln Ala Tyr Asp Ala Gly Lys Lys Leu Ala Lys Asn	
100 105 110	
ctg ctt aag cat tac tgg aac aac ggc aat aat ggt gga aga gca tac	384
Leu Leu Lys His Tyr Trp Asn Asn Gly Asn Asn Gly Gly Arg Ala Tyr	
115 120 125	
att gta tta tcc ata cca gac ctt aac cat tat aaa tta att act gga	432
Ile Val Leu Ser Ile Pro Asp Leu Asn His Tyr Lys Leu Ile Thr Gly	
130 135 140	
ttt aaa gaa acg ctc aaa agc gag ggg cat ccc gag tta atg gac aaa	480
Phe Lys Glu Thr Leu Lys Ser Glu Gly His Pro Glu Leu Met Asp Lys	
145 150 155 160	
gtt gga cat gac ttc tct gga aac gat gcc atc ggc gac gtc ggg aat	528
Val Gly His Asp Phe Ser Gly Asn Asp Ala Ile Gly Asp Val Gly Asn	
165 170 175	
gct tac aag aaa gcc gga gta aca gga cat gtg tgg cag agc gat ggc	576
Ala Tyr Lys Lys Ala Gly Val Thr Gly His Val Trp Gln Ser Asp Gly	

75 F

180	185	190	
atc acc aac tgt tta ctg cgg gga ctt agt cgt gtg aag gat gct gtg			624
Ile Thr Asn Cys Leu Leu Arg Gly Leu Ser Arg Val Lys Asp Ala Val			
195	200	205	
aaa aac aga gat tct tca aac gga ttc att aac aaa gtg tac tat tgg			672
Lys Asn Arg Asp Ser Ser Asn Gly Phe Ile Asn Lys Val Tyr Tyr Trp			
210	215	220	
aca gtg gac aag cgc gca acg act aga gag gca ctc gat gct gga gtc			720
Thr Val Asp Lys Arg Ala Thr Thr Arg Glu Ala Leu Asp Ala Gly Val			
225	230	235	240
gat ggc gtg atg acc aat tac ccg gat gtt att act gat gtt ctc aac			768
Asp Gly Val Met Thr Asn Tyr Pro Asp Val Ile Thr Asp Val Leu Asn			
245	250	255	
gaa tct gct tat aag gcg aaa ttc aga att gcc aca tac gac gac aat			816
Glu Ser Ala Tyr Lys Ala Lys Phe Arg Ile Ala Thr Tyr Asp Asp Asn			
260	265	270	
cct tgg gaa aca ttc aag aat			837
Pro Trp Glu Thr Phe Lys Asn			
275			

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 15

(I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 279 aa

(B) TIPO: aminoácidos

(II) TIPO DE MOLECULA: Proteína completa

(III) HIPOTÉTICA: No

(VI) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Loxosceles reclusa*

(IX) CARACTERISTICAS

(A) NOMBRE: Proteína SMDrLr2

(B) LOCALIZACION: 1-279

(D) INFORACIÓN ADICIONAL: Presenta Actividad Esfingomielinasa D y dermonecrotica.

Ala Asn Lys Arg Pro Ala Trp Ile Met Gly His Met Val Asn Ala Ile	
1	5
Tyr Gln Ile Asp Glu Phe Val Asn Leu Gly Ala Asn Ser Ile Glu Thr	10
	15

76

20						25						30							
Asp	Val	Ser	Phe	Asp	Lys	Asp	Ala	Asn	Pro	Glu	Tyr	Thr	Tyr	His	Gly				
35						40						45							
Val	Pro	Cys	Asp	Cys	Gly	Arg	Ser	Cys	Leu	Lys	Trp	Glu	Tyr	Phe	Ser				
50						55						60							
Asp	Phe	Leu	Lys	Gly	Leu	Arg	Lys	Ala	Thr	Thr	Pro	Gly	Asp	Ser	Lys				
65						70						75						80	
Tyr	His	Ala	Lys	Leu	Val	Leu	Val	Val	Phe	Asp	Leu	Lys	Thr	Gly	Ser				
85						90						95							
Leu	Tyr	Asp	Asn	Gln	Ala	Tyr	Asp	Ala	Gly	Lys	Lys	Leu	Ala	Lys	Asn				
100						105						110							
Leu	Leu	Lys	His	Tyr	Trp	Asn	Asn	Gly	Asn	Asn	Gly	Gly	Arg	Ala	Tyr				
115						120						125							
Ile	Val	Leu	Ser	Ile	Pro	Asp	Leu	Asn	His	Tyr	Lys	Leu	Ile	Thr	Gly				
130						135						140							
Phe	Lys	Glu	Thr	Leu	Lys	Ser	Glu	Gly	His	Pro	Glu	Leu	Met	Asp	Lys				
145						150						155						160	
Val	Gly	His	Asp	Phe	Ser	Gly	Asn	Asp	Ala	Ile	Gly	Asp	Val	Gly	Asn				
165						170						175							
Ala	Tyr	Lys	Lys	Ala	Gly	Val	Thr	Gly	His	Val	Trp	Gln	Ser	Asp	Gly				
180						185						190							
Ile	Thr	Asn	Cys	Leu	Leu	Arg	Gly	Leu	Ser	Arg	Val	Lys	Asp	Ala	Val				
195						200						205							
Lys	Asn	Arg	Asp	Ser	Ser	Asn	Gly	Phe	Ile	Asn	Lys	Val	Tyr	Tyr	Trp				
210						215						220							
Thr	Val	Asp	Lys	Arg	Ala	Thr	Thr	Arg	Glu	Ala	Leu	Asp	Ala	Gly	Val				
225						230						235						240	
Asp	Gly	Val	Met	Thr	Asn	Tyr	Pro	Asp	Val	Ile	Thr	Asp	Val	Leu	Asn				
245						250						255							
Glu	Ser	Ala	Tyr	Lys	Ala	Lys	Phe	Arg	Ile	Ala	Thr	Tyr	Asp	Asp	Asn				
260						265						270							
Pro	Trp	Glu	Thr	Phe	Lys	Asn													
275																			

- INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 16
- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 26 pb
 - (B) TIPO: nucleótidos

77 5

- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL
- (A) ORGANISMO: Artificial
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: oligonucleótido L15'Bam HI
- (B) LOCALIZACION: 1 a 26

AAAGGATCCG CTGATAACCG TCGTCC

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 17

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 31 pb
- (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL
- (A) ORGANISMO: Artificial
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: oligonucleótido L13'Sal I
- (B) LOCALIZACION: 1 a 31

GGGGGTCGAC CTAATTTTAA AAGTCTCCC A

31

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 18

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 855 pb
- (B) TIPO: nucleótidos
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGIA: lineal
- (II) TIPO DE MOLECULA: ADNc para ARNm
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No

(VI) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: *Laxosceles laeta*
 (IX) CARACTERISTICAS
 (A) NOMBRE: Clona L11
 (B) LOCALIZACION: 1-855
 (IX) CARACTERISTICAS
 (A) NOMBRE: Secuencia codificadora
 (B) LOCALIZACION: 1-855

GCT GAT AAC CGT CGT CCA ATT TGG AAC CTG GCT CAT ATG GTG AAC GCT	48
Ala Asp Asn Arg Arg Pro Ile Trp Asn Leu Ala His Met Val Asn Ala	
1 5 10 15	
GTA GCA CAG ATA CCA TCC TTT TTG GAT CTT GGT GCA AAC GCA TTA GAA	96
Val Ala Gln Ile Pro Ser Phe Leu Asp Leu Gly Ala Asn Ala Leu Glu	
20 25 30	
GCG GAT GTT ACT TTT AAG GGA TCG GTG CCT ACC TAC ACT TAC CAC GGA	144
Ala Asp Val Thr Phe Lys Gly Ser Val Pro Thr Tyr Thr Tyr His Gly	
35 40 45	
ACG CCT TGC GAC TTC GGT AGG GAC TGC ATC AGA TGG GAG TAT TTC AAT	192
Thr Pro Cys Asp Phe Gly Arg Asp Cys Ile Arg Trp Glu Tyr Phe Asn	
50 55 60	
GTA TTT CTG AAA ACA CTG AAA GAA TAC ACA ACG CCA GGA AAT GCC AAG	240
Val Phe Leu Lys Thr Leu Lys Glu Tyr Thr Thr Pro Gly Asn Ala Lys	
65 70 75 80	
TAT CGT GAT GGG TTC ATA CTG TTC GTT TTG GAC TTG AAG ACG GGT AGC	288
Tyr Arg Asp Gly Phe Ile Leu Phe Val Leu Asp Leu Lys Thr Gly Ser	
85 90 95	
CTG AGC AAC GAT CAA GTA CGT CCT GCC GGA GAA AAT GTA GCA AAG GAA	336
Leu Ser Asn Asp Gln Val Arg Pro Ala Gly Glu Asn Val Ala Lys Glu	
100 105 110	
CTT CTA CAG AAT TAC TGG AAC AAT GGT AAT AAT GGT GGA AGA GCG TAC	384
Leu Leu Gln Asn Tyr Trp Asn Asn Gly Asn Asn Gly Gly Arg Ala Tyr	
115 120 125	
GTA GTA TTG TCA TTA CCT GAT ATC GGG CAT TAC GAA TTT GTA AGA GGA	432
Val Val Leu Ser Leu Pro Asp Ile Gly His Tyr Glu Phe Val Arg Gly	
130 135 140	
TTT AAA GAA GTA CTT AAG AAA GAA GGT CAT GAG GAC TTG TTG GAG AAA	480

59

Phe	Lys	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Glu	Gly	His	Glu	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	
145					150				155					160		
GTA	GGA	TAC	GAC	TTC	TCT	GGC	CCA	TAC	CTG	CCG	AGC	CTT	CCC	ACA	CTA	528
Val	Gly	Tyr	Asp	Phe	Ser	Gly	Pro	Tyr	Leu	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Leu	
				165				170						175		
GAT	GCA	ACC	CAC	GAA	GCC	TAT	AAA	AAA	GCT	GGA	GTG	GAC	GGT	CAC	ATC	576
Asp	Ala	Thr	His	Glu	Ala	Tyr	Lys	Lys	Ala	Gly	Val	Asp	Gly	His	Ile	
				180				185						190		
TGG	TTA	AGT	GAT	GGC	CTC	ACC	AAT	TTT	TCC	CCA	CTT	GGT	GAC	ATG	GCT	624
Trp	Leu	Ser	Asp	Gly	Leu	Thr	Asn	Phe	Ser	Pro	Leu	Gly	Asp	Met	Ala	
		195					200					205				
CGA	CTA	AAA	GAA	GCT	ATA	AAA	AGT	AGG	GAT	TCG	GCA	AAT	GGA	TTT	ATC	672
Arg	Leu	Lys	Glu	Ala	Ile	Lys	Ser	Arg	Asp	Ser	Ala	Asn	Gly	Phe	Ile	
	210					215						220				
AAT	AAA	ATT	TAC	TAC	TGG	TCT	GTG	GAC	AAA	GTG	TCA	ACA	ACG	AAG	GCA	720
Asn	Lys	Ile	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Val	Asp	Lys	Val	Ser	Thr	Thr	Lys	Ala	
	225				230				235					240		
GCA	CTC	GAT	GTT	GGC	GTT	GAT	GGA	ATA	ATG	ACC	AAT	CAT	CCG	AAC	GTT	768
Ala	Leu	Asp	Val	Gly	Val	Asp	Gly	Ile	Met	Thr	Asn	His	Pro	Asn	Val	
				245				250						255		
CTT	ATT	GGC	GTC	CTC	AAG	GAA	AAT	GGA	TAC	AAT	GAT	AAG	TAC	AGA	TTG	816
Leu	Ile	Gly	Val	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Tyr	Asn	Asp	Lys	Tyr	Arg	Leu	
		260					265							270		
GCA	ACT	TAC	GAC	GAC	AAT	CCA	TGG	GAG	ACT	TTT	AAA	AAT				855
Ala	Thr	Tyr	Asp	Asp	Asn	Pro	Trp	Glu	Thr	Phe	Lys	Asn				
		275				280						285				

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 19

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 285 aa
 - (B) TIPO: aminoácidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: Proteína completa
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: *Loxosceles laeta*
- (IX) CARACTERISTICAS

- (A) NOMBRE: Proteína SMDrL11
- (B) LOCALIZACION: 1-285
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL: Presenta Actividad Esfingomielinasa D y dermonecrotica.

Ala	Asp	Asn	Arg	Arg	Pro	Ile	Trp	Asn	Leu	Ala	His	Met	Val	Asn	Ala	1	5	10	15
Val	Ala	Gln	Ile	Pro	Ser	Phe	Leu	Asp	Leu	Gly	Ala	Asn	Ala	Leu	Glu	20	25	30	
Ala	Asp	Val	Thr	Phe	Lys	Gly	Ser	Val	Pro	Thr	Tyr	Thr	Tyr	His	Gly	35	40	45	
Thr	Pro	Cys	Asp	Phe	Gly	Arg	Asp	Cys	Ile	Arg	Trp	Glu	Tyr	Phe	Asn	50	55	60	
Val	Phe	Leu	Lys	Thr	Leu	Lys	Glu	Tyr	Thr	Thr	Pro	Gly	Asn	Ala	Lys	65	70	75	80
Tyr	Arg	Asp	Gly	Phe	Ile	Leu	Phe	Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Thr	Gly	Ser	85	90	95	
Leu	Ser	Asn	Asp	Gln	Val	Arg	Pro	Ala	Gly	Glu	Asn	Val	Ala	Lys	Glu	100	105	110	
Leu	Leu	Gln	Asn	Tyr	Trp	Asn	Asn	Gly	Asn	Asn	Gly	Gly	Arg	Ala	Tyr	115	120	125	
Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Asp	Ile	Gly	His	Tyr	Glu	Phe	Val	Arg	Gly	130	135	140	
Phe	Lys	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Glu	Gly	His	Glu	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	145	150	155	160
Val	Gly	Tyr	Asp	Phe	Ser	Gly	Pro	Tyr	Leu	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Leu	165	170	175	
Asp	Ala	Thr	His	Glu	Ala	Tyr	Lys	Lys	Ala	Gly	Val	Asp	Gly	His	Ile	180	185	190	
Trp	Leu	Ser	Asp	Gly	Leu	Thr	Asn	Phe	Ser	Pro	Leu	Gly	Asp	Met	Ala	195	200	205	
Arg	Leu	Lys	Glu	Ala	Ile	Lys	Ser	Arg	Asp	Ser	Ala	Asn	Gly	Phe	Ile	210	215	220	
Asn	Lys	Ile	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Val	Asp	Lys	Val	Ser	Thr	Thr	Lys	Ala	225	230	235	240
Ala	Leu	Asp	Val	Gly	Val	Asp	Gly	Ile	Met	Thr	Asn	His	Pro	Asn	Val	245	250	255	

Leu Ile Gly Val Leu Lys Glu Asn Gly Tyr Asn Asp Lys Tyr Arg Leu
260 265 270
Ala Thr Tyr Asp Asp Asn Pro Trp Glu Thr Phe Lys Asn
275 280 285

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 20

(I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 855 pb
- (B) TIPO: nucleótidicos
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGIA: lineal
- (II) TIPO DE MOLECULA: ADNc para ARNm
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Loxosceles laeta*

(IX) CARACTERISTICAS

- (A) NOMBRE: Clona L12
- (B) LOCALIZACION: 1-855

(IX) CARACTERISTICAS

- (A) NOMBRE: Secuencia codificadora
- (B) LOCALIZACION: 1-855

GCT GAT AAC CGT CGT CCA ATT TGG AAC CTG GGC CAC ATG GTG AAC GCT	48
Ala Asp Asn Arg Arg Pro Ile Trp Asn Leu Gly His Met Val Asn Ala	
1 5 10 15	
GTA AAA CAG ATA CCA ACT TTT TTA AAT GAT GGT GCA AAC GCA ATA GAA	96
Val Lys Gln Ile Pro Thr Phe Leu Asn Asp Gly Ala Asn Ala Ile Glu	
20 25 30	
GCG GAC ATT ACT TTT AAG GGA GCG GTG CCC ACC TAC AGT TAC CAT GGA	144
Ala Asp Ile Thr Phe Lys Gly Ala Val Pro Thr Tyr Ser Tyr His Gly	
35 40 45	
ACG CCT TGC GAC TTC GGC AGG GAT TGC ATC AGA TGG GAG TAT TTT GAC	192
Thr Pro Cys Asp Phe Gly Arg Asp Cys Ile Arg Trp Glu Tyr Phe Asp	

50	55	60	
GTA TTC TTG AGA ACA CTG AGA GAA TAT ACT ACG CCA GGA AAT TCC AAG			240
Val Phe Leu Arg Thr Leu Arg Glu Tyr Thr Thr Pro Gly Asn Ser Lys			
65	70	75	80
TAT CGT GAG AAG TTT ATA CTG TTT GTT TTG GAC TTG AAG ACG GGC AGC			288
Tyr Arg Glu Lys Phe Ile Leu Phe Val Leu Asp Leu Lys Thr Gly Ser			
85	90	95	
TTG AAC AAC CAT GAA GTG AGA AAA GCC GGA GAA AAT GTA GCC AAG GGA			336
Leu Asn Asn His Glu Val Arg Lys Ala Gly Glu Asn Val Ala Lys Gly			
100	105	110	
CTT CTG GAG AAT TAC TGG AAC AAT GGT AAT AAT GGA GGA AGA GCA TAC			384
Leu Leu Glu Asn Tyr Trp Asn Asn Gly Asn Asn Gly Gly Arg Ala Tyr			
115	120	125	
GTA GTA TTG TCA TTA CCT GAT ATC GCG CAT TAC GAA TTT ATA CGA ACA			432
Val Val Leu Ser Leu Pro Asp Ile Ala His Tyr Glu Phe Ile Arg Thr			
130	135	140	
TTT AAA GAA GTA CTT AAG ACA GCA GGT CAT GAG AAT TTG TTG GAC AAA			480
Phe Lys Glu Val Leu Lys Thr Ala Gly His Glu Asn Leu Leu Asp Lys			
145	150	155	160
GTA GGA TAC GAC TTA TCT GGC CCA TAC TGG CCA AGC CTA CCC TCG CTG			528
Val Gly Tyr Asp Leu Ser Gly Pro Tyr Trp Pro Ser Leu Pro Ser Leu			
165	170	175	
GAT TCA GTT CAC GAA GCC TTT AAA AAA GCT GGA GTG GAT GGT CAC GTC			576
Asp Ser Val His Glu Ala Phe Lys Lys Ala Gly Val Asp Gly His Val			
180	185	190	
TGG CTA AGT GAT GGC CTC ACT AAT TGG GCG AAA CTT GGT GAC ATG GCT			624
Trp Leu Ser Asp Gly Leu Thr Asn Trp Ala Lys Leu Gly Asp Met Ala			
195	200	205	
CGA CTA AAA GAA ATT ATA AAA AGT AGG GAC TCG GAA AAT GGA TTT ATT			672
Arg Leu Lys Glu Ile Ile Lys Ser Arg Asp Ser Glu Asn Gly Phe Ile			
210	215	220	
AGT AAA GTT TAC TAC TGG TCT GTA GAC AAA TAT TCA ACA ACA AGA ACA			720
Ser Lys Val Tyr Tyr Trp Ser Val Asp Lys Tyr Ser Thr Thr Arg Thr			
225	230	235	240
GCA CTC GAT GTT GGC GTT GAT GGA ATA ATG ACC AAT TAT CCG TAC GTT			768
Ala Leu Asp Val Gly Val Asp Gly Ile Met Thr Asn Tyr Pro Tyr Val			
245	250	255	
ATT ATT GAC GTC CTC AAC GAA AAT GGA TAC AAG GAC AAA TAC AGG TTG			816
Ile Ile Asp Val Leu Asn Glu Asn Gly Tyr Lys Asp Lys Tyr Arg Leu			

260

265

270

GCA ACT TAC GAC GAC AAT CCA TGG GAG ACT TTT AAA AAT

Ala Thr Tyr Asp Asp Asn Pro Trp Glu Thr Phe Lys Asn

275

280

285

855

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 21

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 285 aa

(B) TIPO: aminoácidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: Proteína completa
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: *Loxosceles laeta*

(IX) CARACTERISTICAS

(A) NOMBRE: Proteína SMDrL12

(B) LOCALIZACION: 1-285
- (D) INFORACIÓN ADICIONAL: Presenta Actividad Esfingomielinasa D y dermonecrotica.

Ala Asp Asn Arg Arg Pro Ile Trp Asn Leu Gly His Met Val Asn Ala

1 5 10 15

Val Lys Gln Ile Pro Thr Phe Leu Asn Asp Gly Ala Asn Ala Ile Glu

20 25 30

Ala Asp Ile Thr Phe Lys Gly Ala Val Pro Thr Tyr Ser Tyr His Gly

35 40 45

Thr Pro Cys Asp Phe Gly Arg Asp Cys Ile Arg Trp Glu Tyr Phe Asp

50 55 60

Val Phe Leu Arg Thr Leu Arg Glu Tyr Thr Thr Pro Gly Asn Ser Lys

65 70 75 80

Tyr Arg Glu Lys Phe Ile Leu Phe Val Leu Asp Leu Lys Thr Gly Ser

85 90 95

Leu Asn Asn His Glu Val Arg Lys Ala Gly Glu Asn Val Ala Lys Gly

100 105 110

Leu Leu Glu Asn Tyr Trp Asn Asn Gly Asn Asn Gly Gly Arg Ala Tyr

115 120 125

Val Val Leu Ser Leu Pro Asp Ile Ala His Tyr Glu Phe Ile Arg Thr
130 135 140
Phe Lys Glu Val Leu Lys Thr Ala Gly His Glu Asn Leu Leu Asp Lys
145 150 155 160
Val Gly Tyr Asp Leu Ser Gly Pro Tyr Trp Pro Ser Leu Pro Ser Leu
165 170 175
Asp Ser Val His Glu Ala Phe Lys Lys Ala Gly Val Asp Gly His Val
180 185 190
Trp Leu Ser Asp Gly Leu Thr Asn Trp Ala Lys Leu Gly Asp Met Ala
195 200 205
Arg Leu Lys Glu Ile Ile Lys Ser Arg Asp Ser Glu Asn Gly Phe Ile
210 215 220
Ser Lys Val Tyr Tyr Trp Ser Val Asp Lys Tyr Ser Thr Thr Arg Thr
225 230 235 240
Ala Leu Asp Val Gly Val Asp Gly Ile Met Thr Asn Tyr Pro Tyr Val
245 250 255
Ile Ile Asp Val Leu Asn Glu Asn Gly Tyr Lys Asp Lys Tyr Arg Leu
260 265 270
Ala Thr Tyr Asp Asp Asn Pro Trp Glu Thr Phe Lys Asn
275 280 285

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 22

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 24 pb
 - (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL
 - (A) ORGANISMO: Artificial
- (IX) CARACTERISTICAS
 - (A) NOMBRE: oligonucleótido Lb5' incompleto
 - (B) LOCALIZACION: 1 a 24

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 23

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 28 pb
 - (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL
 - (A) ORGANISMO: Artificial
- (IX) CARACTERISTICAS
 - (A) NOMBRE: oligonucleótido Lb3' Bgl II
 - (B) LOCALIZACION: 1 a 28

GGGGAGATCT ATTCTTGAAT GTTTCCCA

28

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 24

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 30 pb
 - (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL
 - (A) ORGANISMO: Artificial
- (IX) CARACTERISTICAS
 - (A) NOMBRE: oligonucleótido L13' Bgl II
 - (B) LOCALIZACION: 1 a 30

GGGGAGATCT ATTTTAAATA GTCTCCCATG

30

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 25

86 15

(I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 aa
- (B) TIPO: aminoácidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: péptido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (V) TIPO DE FRAGMENTO: Amino terminal
- (VI) FUENTE ORIGINAL
- (A) ORGANISMO: Artificial

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser
1 5 10

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 26

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 8 aa
- (B) TIPO: aminoácidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: péptido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (V) TIPO DE FRAGMENTO: Carboxilo terminal
- (VI) FUENTE ORIGINAL
- (A) ORGANISMO: Artificial

Arg Ser His His His His His His
1 5

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 27

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 837 pb
- (B) TIPO: nucleótidos
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGIA: lineal
- (II) TIPO DE MOLECULA: ADNc para ARNm
- (III) HIPOTÉTICA: No

- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: *Loxosceles boneti*
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: Clona Lb1(H11K)
- (B) LOCALIZACION: 1-837
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: Secuencia codificadora
- (B) LOCALIZACION: 1-837
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: sustitución del codón codificante de la Histidina 11 por un codón codificante de Lisina
- (B) LOCALIZACION: 31-33

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

Ile	Leu	Gln	His	Tyr	Trp	Asn	Asn	Gly	Asn	Asn	Gly	Gly	Arg	Ala	Tyr		
115				120				125									
att	gta	tta	tcc	ata	cca	aac	ctt	gcc	cat	tat	aaa	tta	att	act	gga	432	
Ile	Val	Leu	Ser	Ile	Pro	Asn	Leu	Ala	His	Tyr	Lys	Leu	Ile	Thr	Gly		
130				135				140									
ttt	aaa	gaa	acg	ctc	aca	agc	gat	ggg	cat	cca	gag	ttg	atg	gac	aaa	480	
Phe	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Gly	His	Pro	Glu	Leu	Met	Asp	Lys		
145				150				155				160					
att	gga	tat	gac	ttc	tct	gga	aac	gat	gcc	atc	ggc	gac	gtt	gca	agt	528	
Ile	Gly	Tyr	Asp	Phe	Ser	Gly	Asn	Asp	Ala	Ile	Gly	Asp	Val	Ala	Ser		
165				170				175									
gct	tac	cag	aaa	gcc	gga	gta	aca	gga	cat	gtg	tgg	cag	agc	gat	ggc	576	
Ala	Tyr	Gln	Lys	Ala	Gly	Val	Thr	Gly	His	Val	Trp	Gln	Ser	Asp	Gly		
180				185				190									
atc	acc	aac	tgt	tta	ctg	cgc	gga	ctt	agt	cgc	gtg	agg	gaa	gcg	gtc	624	
Ile	Thr	Asn	Cys	Leu	Leu	Arg	Gly	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Val		
195				200				205									
gca	aac	aga	gat	tct	tcc	aac	gga	tac	att	aac	aaa	gtg	tac	tat	tgg	672	
Ala	Asn	Arg	Asp	Ser	Ser	Asn	Gly	Tyr	Ile	Asn	Lys	Val	Tyr	Tyr	Trp		
210				215				220									
aca	gtg	gac	aag	cgc	gca	tcg	act	aga	gat	gca	ctc	gat	gct	gga	gtc	720	
Thr	Val	Asp	Lys	Arg	Ala	Ser	Thr	Arg	Asp	Ala	Leu	Asp	Ala	Gly	Val		
225				230				235				240					
gat	gga	ata	atg	acc	aat	tac	cca	gat	ggt	att	gct	gat	gtc	ctc	agt	768	
Asp	Gly	Ile	Met	Thr	Asn	Tyr	Pro	Asp	Val	Ile	Ala	Asp	Val	Leu	Ser		
245				250				255									
gaa	tct	gct	tat	agt	gcg	aaa	ttc	aga	att	gcc	aca	tac	gac	gac	aat	816	
Glu	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ala	Lys	Phe	Arg	Ile	Ala	Thr	Tyr	Asp	Asp	Asn		
260				265				270									
cct	tgg	gaa	aca	ttc	aag	aat										837	
Pro	Trp	Glu	Thr	Phe	Lys	Asn											
275																	

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 28

(I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 279 aa

(B) TIPO: aminoácidos

(II) TIPO DE MOLECULA: Proteína completa

- (III) HIPOTÉTICA: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: *Loxosceles boneti*
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: Proteína SMDrLb(H11K)
- (B) LOCALIZACION: 1-279
- (A) NOMBRE: SUSTITUCIÓN DE HISTIDINA 11 POR LISINA
- (D) INFORACIÓN ADICIONAL: No Presenta Actividad Esfingomielinasa D ni dermonecrotica, pero si generara anticuerpos neutralizantes del veneno de *L. boneti*.

Ala	Asn	Lys	Arg	Pro	Ala	Trp	Ile	Met	Gly	Lys	Met	Val	Asn	Ala	Ile
1				5					10					15	
Ala	Gln	Ile	Asp	Glu	Phe	Val	Asn	Leu	Gly	Ala	Asn	Ser	Ile	Glu	Thr
			20					25					30		
Asp	Val	Ser	Phe	Asp	Ser	Ser	Ala	Asn	Pro	Glu	Tyr	Thr	Tyr	His	Gly
		35					40					45			
Ile	Pro	Cys	Asp	Cys	Gly	Arg	Thr	Cys	Thr	Lys	Trp	Glu	Asn	Phe	Asn
	50					55					60				
Asp	Phe	Leu	Val	Gly	Leu	Arg	Lys	Ala	Thr	Thr	Pro	Asp	Asp	Ser	Asn
65					70				75					80	
Tyr	His	Glu	Lys	Leu	Ile	Leu	Val	Val	Phe	Asp	Leu	Lys	Thr	Gly	Ser
			85						90					95	
Leu	Tyr	Asp	Asn	Gln	Ala	Tyr	Asp	Ala	Gly	Lys	Lys	Leu	Ala	Lys	Ser
			100					105					110		
Ile	Leu	Gln	His	Tyr	Trp	Asn	Asn	Gly	Asn	Asn	Gly	Gly	Arg	Ala	Tyr
	115					120					125				
Ile	Val	Leu	Ser	Ile	Pro	Asn	Leu	Ala	His	Tyr	Lys	Leu	Ile	Thr	Gly
	130					135					140				
Phe	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Gly	His	Pro	Glu	Leu	Met	Asp	Lys
145				150					155					160	
Ile	Gly	Tyr	Asp	Phe	Ser	Gly	Asn	Asp	Ala	Ile	Gly	Asp	Val	Ala	Ser
			165					170					175		
Ala	Tyr	Gln	Lys	Ala	Gly	Val	Thr	Gly	His	Val	Trp	Gln	Ser	Asp	Gly
		180						185					190		
Ile	Thr	Asn	Cys	Leu	Leu	Arg	Gly	Leu	Ser	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Val
	195					200						205			

90
 5p

Ala	Asn	Arg	Asp	Ser	Ser	Asn	Gly	Tyr	Ile	Asn	Lys	Val	Tyr	Tyr	Trp
210				215				220							
Thr	Val	Asp	Lys	Arg	Ala	Ser	Thr	Arg	Asp	Ala	Leu	Asp	Ala	Gly	Val
225				230				235				240			
Asp	Gly	Ile	Met	Thr	Asn	Tyr	Pro	Asp	Val	Ile	Ala	Asp	Val	Leu	Ser
				245				250				255			
Glu	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ala	Lys	Phe	Arg	Ile	Ala	Thr	Tyr	Asp	Asp	Asn
				260				265				270			
Pro	Trp	Glu	Thr	Phe	Lys	Asn									
275															

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 29

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 837 pb
 - (B) TIPO: nucleótidos
 - (C) TIPO DE CADENA: doble
 - (D) TOPOLOGIA: lineal
- (II) TIPO DE MOLECULA: ADNc para ARNm
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: *Loxosceles boneti*
- (IX) CARACTERISTICAS
 - (A) NOMBRE: Clona Lb1(E31K)
 - (B) LOCALIZACION: 1-837
- (IX) CARACTERISTICAS
 - (A) NOMBRE: Secuencia codificadora
 - (B) LOCALIZACION: 1-837
- (IX) CARACTERISTICAS
 - (A) NOMBRE: sustitución del codón codificante del ácido glutámico 31 por un codón codificante de Lisina
 - (B) LOCALIZACION: 91-93

Ala Asn Lys Arg Pro Ala Trp Ile Met Gly His Met Val Asn Ala Ile	
1 5 10 15	
gct cag ata gac gag ttt gtg aac ctt gga gcg aat tcc att aaa aca	96
Ala Gln Ile Asp Glu Phe Val Asn Leu Gly Ala Asn Ser Ile Lys Thr	
20 25 30	
gac gtg tct ttc gac tca agt gcc aat cct gaa tat acg tat cat ggt	144
Asp Val Ser Phe Asp Ser Ser Ala Asn Pro Glu Tyr Thr Tyr His Gly	
35 40 45	
att cca tgt gat tgt gga agg act tgt acg aag tgg gag aat ttc aac	192
Ile Pro Cys Asp Cys Gly Arg Thr Cys Thr Lys Trp Glu Asn Phe Asn	
50 55 60	
gat ttt ctg gta gga ctg cga aag gcc aca aca cca gac gac tcc aac	240
Asp Phe Leu Val Gly Leu Arg Lys Ala Thr Thr Pro Asp Asp Ser Asn	
65 70 75 80	
tat cat gaa aag ttg att tta gtt gta ttt gac ctg aaa acc ggt agc	288
Tyr His Glu Lys Leu Ile Leu Val Val Phe Asp Leu Lys Thr Gly Ser	
85 90 95	
ctc tac gat aac caa gct tac gac gct ggg aag aaa tta gcg aaa agt	336
Leu Tyr Asp Asn Gln Ala Tyr Asp Ala Gly Lys Lys Leu Ala Lys Ser	
100 105 110	
ata ctt cag cat tac tgg aac aac ggc aat aat ggt gga aga gca tac	384
Ile Leu Gln His Tyr Trp Asn Asn Gly Asn Asn Gly Gly Arg Ala Tyr	
115 120 125	
att gta tta tcc ata cca aac ctt gcc cat tat aaa tta att act gga	432
Ile Val Leu Ser Ile Pro Asn Leu Ala His Tyr Lys Leu Ile Thr Gly	
130 135 140	
ttt aaa gaa acg ctc aca agc gat ggg cat cca gag ttg atg gac aaa	480
Phe Lys Glu Thr Leu Thr Ser Asp Gly His Pro Glu Leu Met Asp Lys	
145 150 155 160	
att gga tat gac ttc tct gga aac gat gcc atc ggc gac gtt gca agt	528
Ile Gly Tyr Asp Phe Ser Gly Asn Asp Ala Ile Gly Asp Val Ala Ser	
165 170 175	
gct tac cag aaa gcc gga gta aca gga cat gtg tgg cag agc gat ggc	576
Ala Tyr Gln Lys Ala Gly Val Thr Gly His Val Trp Gln Ser Asp Gly	
180 185 190	
atc acc aac tgt tta ctg cgc gga ctt agt cgc gtg agg gaa gcg gtc	624
Ile Thr Asn Cys Leu Leu Arg Gly Leu Ser Arg Val Arg Glu Ala Val	
195 200 205	
gca aac aga gat tct tcc aac gga tac att aac aaa gtg tac tat tgg	672

Ala Asn Arg Asp Ser Ser Asn Gly Tyr Ile Asn Lys Val Tyr Tyr Trp
210 215 220
aca gtg gac aag cgc gca tcg act aga gat gca ctc gat gct gga gtc 720
Thr Val Asp Lys Arg Ala Ser Thr Arg Asp Ala Leu Asp Ala Gly Val
225 230 235 240
gat gga ata atg acc aat tac cca gat gtt att gct gat gtc ctc agt 768
Asp Gly Ile Met Thr Asn Tyr Pro Asp Val Ile Ala Asp Val Leu Ser
245 250 255
gaa tct gct tat agt gcg aaa ttc aga att gcc aca tac gac gac aat 816
Glu Ser Ala Tyr Ser Ala Lys Phe Arg Ile Ala Thr Tyr Asp Asp Asn
260 265 270
cct tgg gaa aca ttc aag aat 837
Pro Trp Glu Thr Phe Lys Asn
275

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO: 30

- (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 279 aa
 - (B) TIPO: aminoácidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: Proteína completa
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: *Loxosceles boneti*
- (IX) CARACTERISTICAS
 - (A) NOMBRE: Proteína SMDrLb(E31K)
 - (B) LOCALIZACION: 1-279
 - (A) NOMBRE: SUSTITUCIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO 31 POR LISINA
- (D) INFORACIÓN ADICIONAL: No Presenta Actividad Esfingomielinasa D ni dermonecrotica, pero si generara anticuerpos neutralizantes del veneno de *L. boneti*.

Ala Asn Lys Arg Pro Ala Trp Ile Met Gly His Met Val Asn Ala Ile
1 5 10 15
Ala Gln Ile Asp Glu Phe Val Asn Leu Gly Ala Asn Ser Ile Lys Thr
20 25 30
Asp Val Ser Phe Asp Ser Ser Ala Asn Pro Glu Tyr Thr Tyr His Gly

35	40	45
Ile Pro Cys Asp Cys Gly Arg Thr Cys Thr Lys Trp Glu Asn Phe Asn		
50	55	60
Asp Phe Leu Val Gly Leu Arg Lys Ala Thr Thr Pro Asp Asp Ser Asn		
65	70	75
Tyr His Glu Lys Leu Ile Leu Val Val Phe Asp Leu Lys Thr Gly Ser		
85	90	95
Leu Tyr Asp Asn Gln Ala Tyr Asp Ala Gly Lys Lys Leu Ala Lys Ser		
100	105	110
Ile Leu Gln His Tyr Trp Asn Asn Gly Asn Asn Gly Gly Arg Ala Tyr		
115	120	125
Ile Val Leu Ser Ile Pro Asn Leu Ala His Tyr Lys Leu Ile Thr Gly		
130	135	140
Phe Lys Glu Thr Leu Thr Ser Asp Gly His Pro Glu Leu Met Asp Lys		
145	150	155
Ile Gly Tyr Asp Phe Ser Gly Asn Asp Ala Ile Gly Asp Val Ala Ser		
165	170	175
Ala Tyr Gln Lys Ala Gly Val Thr Gly His Val Trp Gln Ser Asp Gly		
180	185	190
Ile Thr Asn Cys Leu Leu Arg Gly Leu Ser Arg Val Arg Glu Ala Val		
195	200	205
Ala Asn Arg Asp Ser Ser Asn Gly Tyr Ile Asn Lys Val Tyr Tyr Trp		
210	215	220
Thr Val Asp Lys Arg Ala Ser Thr Arg Asp Ala Leu Asp Ala Gly Val		
225	230	235
Asp Gly Ile Met Thr Asn Tyr Pro Asp Val Ile Ala Asp Val Leu Ser		
245	250	255
Glu Ser Ala Tyr Ser Ala Lys Phe Arg Ile Ala Thr Tyr Asp Asp Asn		
260	265	270
Pro Trp Glu Thr Phe Lys Asn		
275		

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
9 de Marzo de 2006 (09.03.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/025718 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 14435 (2006.01) A61K 3843 (2006.01)
C12N 1512 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/MX2005/000071

(22) Fecha de presentación internacional:
29 de Agosto de 2005 (29.08.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
PA/A/2004/008435
31 de Agosto de 2004 (31.08.2004) MX

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo
US): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO [MX/MX]; 9° Piso de la Torre Rectoría, Ciudad
Universitaria, Delegación Coyoacán, CEP-04510 México
D.F. (MX). LABORATORIOS SILANES S.A. DE C.V.
[MX/MX]; Amores 1304, Colonia del Valle, Delegación
Benito Juárez, CEP-03100 México D.F. (MX).

(72) Inventores; e

(73) Inventores/Solicitantes (para US solamente): OLIVERA
RODRIGUEZ, Alejandro [MX/MX]; Las Fuentes N°27,
Colonia Las Águilas, CEP-62470 Cuernavaca, Morelos
(MX). STOCK SILBERMAN, Roberto Pablo [UY/MX];
Restomo Nueva Galicia N°7 Colonia Jardines de Rafo,
rma, 2a sección, CEP-62260 Cuernavaca, Morelos (MX).
RAMOS CERRILLO, Blanca Margarita [MX/MX];
Fundidora De Monterrey N°113, Colonia Industrial,

CEP-07800 México D.F. (MX). SANCHEZ-LÓPEZ,
Rosana [MX/MX]; Morelos N°130, Colonia López de
Nava, CEP-62300 Cuernavaca, Morelos (MX). ALAGÓN
CANO, Alejandro [MX/MX]; Retorno Nueva Galicia N°6
Colonia Jardines de Rafo, rma, 2a Sección, CEP-62260
Cuernavaca, Morelos (MX).

(74) Mandatarios: PANIAGUA SOLÍS, Jorge, F.; Amores
N°1304 Colonia Del Valle, Delegación Benito Juárez,
CEP-03100 México D.F. (MX).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KR, KG, KM, KP, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SI, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

(Contribuir en la página siguiente)

(54) Título: IMMUNOGEN AND ANTIVENOM AGAINST VIOLIN SPIDER VENOM

(54) Título: INMUNÓGENO Y ANTIVENENO CONTRA EL VENENO DE LA ARAÑA VIOLINISTA

(57) Abstract: The invention relates to the isolation, characterization and expression of DNA fragments encoding sphingomyelinases D from three species of *Loxosceles* genus spiders, namely *L. boneti*, *L. reclusa* and *L. laeta*, and the toxoids thereof. The invention also relates to the production of active sphingomyelinases D and the toxoids thereof using recombinant means and to the use of same as an immunogen for the production in vertebrates of antibodies that neutralise the corresponding venom and the respective fragments F(ab')₂. The invention further relates to the use of recombinant sphingomyelinases D as part of an antigen matrix which can be used in the immunopurification of antibodies and the fragments thereof or as part of any diagnostic device used to obtain clinical confirmation that the causal agent of poisoning in a patient is a spider of the *Loxosceles* genus. In addition, the invention includes molecular vectors for the expression of the DNA fragments, strains comprising same, which can express *Loxosceles* sphingomyelinases D, and methods for the expression thereof.

(57) Resumen: La presente invención comprende el aislamiento caracterización y expresión de los fragmentos de DNA codificantes de las esfingomielinasas D de 3 especies de araña del género *Loxosceles*: *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta* y sus toxoides. También comprende la producción por medios recombinantes de las esfingomielinasas D activas y sus toxoides su uso como inmunógeno para la producción en vertebrados de anticuerpos neutralizantes del veneno correspondiente y de los fragmentos F(ab')₂ respectivos. También se incluye el uso de las esfingomielinasas D recombinantes como parte de un matriz antigénica útil en la inmunopurificación de anticuerpos y sus fragmentos o como parte de algún dispositivo diagnóstico para corroborar en clínica que el agente causal del estado de envenenamiento de un paciente sea una araña del género *Loxosceles*. Así mismo, la invención incluye los vectores moleculares para la expresión de los fragmentos de DNA, las cepas que los comprenden, capaces de expresar las SMD de *Loxosceles* y los métodos para su expresión.

WO 2006/025718 A3

95 F

WO 2006/025718 A3



(III) Fecha de publicación del Informe de Intinuenda
Internacional: 2 de Noviembre de 2006

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ MX 2005/000071

46

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, C12N, A61K.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EBI SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, MEDLINE, XP ESP, EPODOC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Barbaro KC et al. "Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus <i>Loxosceles</i> (Araneae)". J. Protein Chem. 1996 May; Vol. 15, N° 4, pages 337-43.	1-3,36-44
X	Tambourgi DV et al. "Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of phingomyelinases from <i>Loxosceles</i> venom". Molecular Immunology. Jul 2004; Vol. 41, N° 8, pages 831-840.	1-3,36-44

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition, or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

17-08-2006

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

J. Manso Torrico

Telephone No. + 34 91 349

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MX 2005/000071

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Pedrosa MD et al. "Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from <i>Loxosceles lacta</i> venom". Biochemical and biophysical research communications. 15 Nov. 2002. Vol. 298, N° 5, pages 638-645.	1-3,36-44
X	Kalapothakis E et al. "Molecular cloning, expression and immunological properties of LjD1, a protein from the dermonecrotic family of <i>Loxosceles intermedia</i> spider venom". Toxicon. Dec 2002. Vol. 40, N° 12, pages 1691-1699.	1-3,36-44
P.X	Ramos-Cerrillo B et al. "Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders <i>Loxosceles boneti</i> and <i>Loxosceles reclusa</i> ". TOXICON. Oct 2004; Vol. 44, pages 507-514	1-3,36-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MX 2005/000071

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

(claim 1-3), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 all in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

8
99

The International Searching Authority has found that the claims in the application cover 13 different inventions. These are as follows:

INVENTION 1 (claims 1-3), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, all in part). SMDr Lb

A recombinant protein of *L. bonelli* which exhibits sphingomyelinase D (SMD) activity and produces dermonecrosis, having SEQ ID NO. 11; a DNA fragment having SEQ ID NO. 10 which encodes it; an expression vector containing the DNA fragment; a bacterial strain which expresses said vector; an *E. coli* strain which expresses said vector; a method for producing the recombinant protein; and the use of the recombinant protein in the production of an antigenic composition.

INVENTION 2 (claims 4-11), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, all in part). SMDr Lb toxoids

A recombinant protein of *L. bonelli* which does not exhibit sphingomyelinase D (SMD) activity and does not produce dermonecrosis, having SEQ ID NO. 11 (with substitution of an amino acid selected from a group of five amino acids); a DNA fragment which encodes it; an expression vector containing the DNA fragment; a bacterial strain which expresses said vector; an *E. coli* strain which expresses said vector; a method for producing the recombinant protein; and the use of the recombinant protein in the production of an antigenic composition.

INVENTION 3 (claims 12-13), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, all in part). SMDr Lr1

A recombinant protein of *L. reclusa* which exhibits sphingomyelinase D (SMD) activity and produces dermonecrosis, having SEQ ID NO. 13; a DNA fragment having SEQ ID NO. 12 which encodes it; an expression vector containing the DNA fragment; a bacterial strain which expresses said vector; an *E. coli* strain which expresses said vector; a method for producing the recombinant protein; and the use of the recombinant protein in the production of an antigenic composition.

INVENTION 4 (claims 14-17), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, all in part). SMDr Lr1 toxoids

A recombinant protein of *L. reclusa* which does not exhibit sphingomyelinase D (SMD) activity and does not produce dermonecrosis, having SEQ ID NO. 13 (with substitution of an amino acid selected from a group of five amino acids); a DNA fragment which encodes it; an expression vector containing the DNA fragment; a bacterial strain which expresses said vector; an *E. coli* strain which expresses said vector; a method for producing the recombinant protein; and the use of the recombinant protein in the production of an antigenic composition.

INVENTION 5 (claims 18-19), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, all in part). SMDr Lr2

A recombinant protein of *L. reclusa* which exhibits sphingomyelinase D (SMD) activity and produces dermonecrosis, having SEQ ID NO. 15; a DNA fragment having SEQ ID NO. 14 which encodes it; an expression vector containing the DNA fragment; a bacterial strain which expresses said vector; an *E. coli* strain which expresses said vector; a method for producing the recombinant protein; and the use of the recombinant protein in the production of an antigenic composition.

INVENTION 6 (claims 20-23), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, all in part). SMDr Lr2 toxoids

A recombinant protein of *L. reclusa* which does not exhibit sphingomyelinase D (SMD) activity and does not produce dermonecrosis, having SEQ ID NO. 15 (with substitution of an amino acid selected from a group of five amino acids); a DNA fragment which encodes it; an expression vector containing the DNA fragment; a bacterial strain which expresses said vector; an *E. coli* strain which expresses said vector; a method for producing the recombinant protein; and the use of the recombinant protein in the production of an antigenic composition.

5
100**INVENTION 7 (claims 24-28), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, all in part). SMDr LJ1**

A recombinant protein of *L. laeta* which exhibits sphingomyelinase D (SMD) activity and produces dermonecrosis, having SEQ ID NO. 19; a DNA fragment having SEQ ID NO. 18 which encodes it; an expression vector containing the DNA fragment; a bacterial strain which expresses said vector; an *E. coli* strain which expresses said vector; a method for producing the recombinant protein; and the use of the recombinant protein in the production of an antigenic composition.

INVENTION 8 (claims 26-28), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, all in part). SMDr LJ1 toxoids

A recombinant protein of *L. laeta* which does not exhibit sphingomyelinase D (SMD) activity and does not produce dermonecrosis, having SEQ ID NO. 19 (with substitution of an amino acid selected from a group of five amino acids); a DNA fragment which encodes it; an expression vector containing the DNA fragment; a bacterial strain which expresses said vector; an *E. coli* strain which expresses said vector; a method for producing the recombinant protein; and the use of the recombinant protein in the production of an antigenic composition.

INVENTION 9 (claims 30, 31), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, all in part). SMDr LJ2

A recombinant protein of *L. laeta* which exhibits sphingomyelinase D (SMD) activity and produces dermonecrosis, having SEQ ID NO. 21; a DNA fragment having SEQ ID NO. 20 which encodes it; an expression vector containing the DNA fragment; a bacterial strain which expresses said vector; an *E. coli* strain which expresses said vector; a method for producing the recombinant protein; and the use of the recombinant protein in the production of an antigenic composition.

INVENTION 10 (claims 32-35), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, all in part). SMDr LJ2 toxoids

A recombinant protein of *L. laeta* which does not exhibit sphingomyelinase D (SMD) activity and does not produce dermonecrosis, having SEQ ID NO. 21 (with substitution of an amino acid selected from a group of five amino acids); a DNA fragment which encodes it; an expression vector containing the DNA fragment; a bacterial strain which expresses said vector; an *E. coli* strain which expresses said vector; a method for producing the recombinant protein; and the use of the recombinant protein in the production of an antigenic composition.

INVENTION 11 (claims 45-50, 51-53)

A method for producing antibodies and a pharmaceutical composition containing said antibodies.

INVENTION 12 (claims 54, 55)

A diagnostic device and the use thereof.

INVENTION 13 (claim 56)

A method for treating poisoning from the bite of *Loxosceles* spiders.

88
101

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/435 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C07K, C12N, A61K.

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

CIBEPAT, EBI SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, MEDLINE, XP ESP, EPODOC

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	Barharo KC et al. "Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus Loxosceles (Araneae)". J. Protein Chem. 1996 May; Vol. 15, N° 4, páginas 337-43.	1-3,36-44
X	Tambourgi DV et al. "Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of phingomyelinases from Loxosceles venom". Molecular Immunology. Jul 2004; Vol. 41, N° 8, páginas 831-840.	1-3,36-44

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	T	documento anterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no permanece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	X	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	Y	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	A	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
17 AGOSTO 2006 (17-08-2006)Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.Funcionario autorizado
J. Manso TorricoPaseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono + 34 91 349

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/MX 2005/000071

103

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	Pedrosa MD et al. "Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from <i>Loxosceles laeta</i> venom". Biochemical and biophysical research communications. 15 Nov. 2002. Vol. 298, N° 5, páginas 638-645.	1-3,36-44
X	Kalapothis E et al. "Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of <i>Loxosceles intermedia</i> spider venom". Toxicon. Dic 2002. Vol. 40, N° 12, páginas 1691-1699.	1-3,36-44
P,X	Ramos-Cerrillo B et al. "Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders <i>Loxosceles boneti</i> and <i>Loxosceles reclusa</i> ". TOXICON. Oct 2004; Vol. 44, páginas 507-514	1-3,36-44

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional n°

PCT/ MX 2005/000071

7
104

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones n°:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
Ver Hoja Adicional

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°:
4. ☒ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°: (reivindicación 1-3), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 todas parcialmente)

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

105

La presente ISA considera que la solicitud comprende 13 invenciones cubiertas por las reivindicaciones que a continuación se indican:

INVENCION 1 (reivindicación 1-3), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 todas parcialmente). SMDr lb

Una proteína recombinante de *L.bonetti* con actividad esfingomielinasa D (SMD) productora de dermonecrosis y de SEQIDN°11, un fragmento de ADN que lo codifica de SEQIDN°10, un vector de expresión que comprenda el fragmento de ADN, una cepa bacteriana que exprese ese vector, una cepa de *E.coli* que exprese ese vector, un método de producción de la proteína recombinante y el uso de la proteína recombinante para la producción de una composición antigénica.

INVENCION 2 (reivindicación 4-11), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 todas parcialmente). Toxóide SMDr Lb

Una proteína recombinante de *L.bonetti* sin actividad esfingomielinasa D (SMD) y que no es productora de dermonecrosis de SEQIDN°11 (con una sustitución de un aminoácido seleccionado de entre un grupo de 5), un fragmento de ADN que lo codifica, un vector de expresión que comprenda el fragmento de ADN, una cepa bacteriana que exprese ese vector, una cepa de *E.coli* que exprese ese vector, un método de producción de la proteína recombinante y el uso de la proteína recombinante para la producción de una composición antigénica.

INVENCION 3 (reivindicación 12-13), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 todas parcialmente). SMDr Lr1

Una proteína recombinante de *L. reclusa* con actividad esfingomielinasa D (SMD) productora de dermonecrosis y de SEQIDN°13, un fragmento de ADN que lo codifica de SEQIDN°12, un vector de expresión que comprenda el fragmento de ADN, una cepa bacteriana que exprese ese vector, una cepa de *E.coli* que exprese ese vector, un método de producción de la proteína recombinante y el uso de la proteína recombinante para la producción de una composición antigénica.

INVENCION 4 (reivindicación 14-17), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 todas parcialmente). Toxóide SMDr Lr1

Una proteína recombinante de *L.reclusa* sin actividad esfingomielinasa D (SMD) y que no es productora de dermonecrosis de SEQIDN°13 (con una sustitución de un aminoácido seleccionado de entre un grupo de 5), un fragmento de ADN que lo codifica, un vector de expresión que comprenda el fragmento de ADN, una cepa bacteriana que exprese ese vector, una cepa de *E.coli* que exprese ese vector, un método de producción de la proteína recombinante y el uso de la proteína recombinante para la producción de una composición antigénica.

INVENCION 5 (reivindicación 18-19), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 todas parcialmente). SMDr Lr2

Una proteína recombinante de *L. reclusa* con actividad esfingomielinasa D (SMD) productora de dermonecrosis y de SEQIDN°15, un fragmento de ADN que lo codifica de SEQIDN°14, un vector de expresión que comprenda el fragmento de ADN, una cepa bacteriana que exprese ese vector, una cepa de *E.coli* que exprese ese vector, un método de producción de la proteína recombinante y el uso de la proteína recombinante para la producción de una composición antigénica.

INVENCION 6 (reivindicación 20-23), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 todas parcialmente). Toxóide SMDr Lr2

Una proteína recombinante de *L.reclusa*, sin actividad esfingomielinasa D (SMD) y que no es productora de dermonecrosis, de SEQIDN°15 (con una sustitución de un aminoácido seleccionado de entre un grupo de 5), un fragmento de ADN que lo codifica, un vector de expresión que comprenda el fragmento de ADN, una cepa bacteriana que exprese ese vector, una cepa de *E.coli* que exprese ese vector, un método de producción de la proteína recombinante y el uso de la proteína recombinante para la producción de una composición antigénica.

INVENCION 7 (reivindicación 24-25), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 todas parcialmente). SMDr Lr1

Una proteína recombinante de *L. lactis* con actividad esfingomielinasa D (SMD) productora de dermonecrosis y de SEQIDN°19, un fragmento de ADN que lo codifica de SEQIDN°18, un vector de expresión que comprenda el fragmento de ADN, una cepa bacteriana que exprese ese vector, una cepa de *E. coli* que exprese ese vector, un método de producción de la proteína recombinante y el uso de la proteína recombinante para la producción de una composición antigénica.

INVENCION 8 (reivindicación 26-29), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 todas parcialmente). Toxoides SMDr L11

Una proteína recombinante de *L. lactis*, sin actividad esfingomielinasa D (SMD) y que no es productora de dermonecrosis, de SEQIDN°19 (con una sustitución de un aminoácido seleccionado de entre un grupo de 5), un fragmento de ADN que lo codifica, un vector de expresión que comprenda el fragmento de ADN, una cepa bacteriana que exprese ese vector, una cepa de *E. coli* que exprese ese vector, un método de producción de la proteína recombinante y el uso de la proteína recombinante para la producción de una composición antigénica.

INVENCION 9 (reivindicación 30,31), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 todas parcialmente). SMDr L12

Una proteína recombinante de *L. lactis* con actividad esfingomielinasa D (SMD) productora de dermonecrosis y de SEQIDN°21, un fragmento de ADN que lo codifica de SEQIDN°20, un vector de expresión que comprenda el fragmento de ADN, una cepa bacteriana que exprese ese vector, una cepa de *E. coli* que exprese ese vector y un método de producción de la proteína recombinante y el uso de la proteína recombinante para la producción de una composición antigénica.

INVENCION 10 (reivindicación 32-35), (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 todas parcialmente). Toxoides SMDr L12.

Una proteína recombinante de *L. lactis*, sin actividad esfingomielinasa D (SMD) y que no es productora de dermonecrosis, de SEQIDN°21 (con una sustitución de un aminoácido seleccionado de entre un grupo de 5), un fragmento de ADN que lo codifica, un vector de expresión que comprenda el fragmento de ADN, una cepa bacteriana que exprese ese vector, una cepa de *E. coli* que exprese ese vector y un método de producción de la proteína recombinante y el uso de la proteína recombinante para la producción de una composición antigénica.

INVENCION 11 (reivindicación 45-50, 51-53).

Un método para producir anticuerpos y una composición farmacéutica de los anticuerpos.

INVENCION 12 (reivindicación 54, 55).

Un dispositivo de diagnóstico y el uso de ese dispositivo de diagnóstico.

INVENCION 13 (reivindicación 56).

Un método para tratar el envenenamiento por mordedura de arañas *Loxosceles*.

88
107

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

Expediente No		07-03284	No de Folia
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA X	1	✓
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones:

CONTIENE ALTE FINAL



Industria y Comercio
PATENTE

Rec: 07-03-05
Fec: 2007-03-30 17:12:05 Dep. 2020-03-05
Tra. 11 PATENTE/II
Evs: 378 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION

Fotos: 107

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1)
SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2)
SOLICITANTE
(71)

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

Cual _____

NÚMERO _____

Teléfono: Fax: E. Mail: _____

3)
REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **DILIA MARÍA RODRIGUEZ D'ALEMAN**

Dirección: **Carrera 11 N°. 88-53 Piso 6 Bogotá D.C.**

Teléfono: **8181088** Fax: **8350824**
E. Mail: **info@clarkemodel.com.co**

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO: **41.654.882**
TP: **20824 CSJ**

4)
INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **1. OLVERA RODRIGUEZ, Alejandro; 2. STOCK SILBERMAN, Roberto Pablo; 3. RAMOS CERRILLO, Bianca Margarita; 4. SANCHEZ-LÓPEZ, Rosana; 5. ALAGÓN CANO, Alejandro**

Dirección: **1. Las fuentes N° 27, Colonia Las Águilas, CEP-62470 Cuernavaca, Morelos (MX); 2. Retorno Nueva Galicia N°. 7 Colonia Jardines de Reforma, 2ª sección, CEP-62280 Cuernavaca, Morelos (MX); 3. Fundidora De Monterrey Nr. 113, Colonia Industrial, CEP-07800 México D.F. (MX); 4. Morelos Nr. 130, Colonia López de Nava, CEP-62300 Cuernavaca, Morelos (MX); 5. Retorno Nueva Galicia N°. 6 Colonia Jardines de Reforma, 2ª Sección, CEP 62280 Cuernavaca, Morelos (MX).**

Nacionalidad o Domicilio: **Todos los anteriores México**

5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. **PCT/MX2005/0000071** Fecha: **Agosto. 29, 2005**
Publicación Internacional No. **WO2006/025718 A2** Fecha: **Marzo 9, 2006**

6) **Título (64) INMUNÓGENO Y ANTIVENENO CONTRA EL VENENO DE LA ARANA VIOLINISTA**

7) **Clasificación Internacional:**

8) PRIORIDAD	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	MEXICO	AGOSTO 31, 2004	PA/A/2004/008435

Ver reverso de esta página

110

25

Reivindicaciones.

Habiéndose descrito la presente invención se reivindica lo siguiente:

- 5 1. Una proteína aislada del veneno de la araña *Loxosceles boneti*, que presenta una actividad de esfingomielinasa y produce demonecrosis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que tiene la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 11.
- 10 2. Una proteína recombinante que presenta una actividad de esfingomielinasa D y produce demonecrosis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que comprende la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 11, o una mutación funcionalmente equivalente de la misma.
- 15 3. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 2, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 10, o una mutación silenciosa de la misma.
- 20 4. Una proteína recombinante que carece de actividad de esfingomielinasa D y que no produce demonecrosis en un mamífero inoculado con ella, caracterizada por que comprende la secuencia aminoácida SEQ. ID. NO: 11 con una sustitución de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31, Asp33, Asp81, His11 y His47.
- 25 5. La proteína recombinante de la reivindicación 4, caracterizada por que la sustitución es en un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31 y His11.
- 30 6. La proteína recombinante de la reivindicación 5, caracterizada por que tiene la secuencia SEQ.ID.No: 28.
7. La proteína recombinante de la reivindicación 6, caracterizada por que tiene la secuencia SEQ.ID.No: 30.
- 35 8. Un fragmento de DNA que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 4, caracterizado por que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 10 con una mutación consistente de una sustitución del codón codificante de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu31, Asp33, Asp81, His11 y His47.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad. 07-032811 - CCCCC CCCC
Reg. 2007-03-30 17.12.05 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTENYI
Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios 107
REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x]
- ◆ Descripción de la invención [x]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Claudia M Neiva Cortes
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

112

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ DILIA MARIA

912

REFERENCIA	Radicación No.	7 32811
	Solicitud internacional	PCT/MX2005/0000071
	Fecha inicio fase nacional	31/03/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	6562

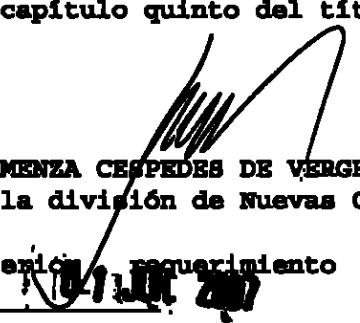
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 10/04/2020
adpall