



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 155 768**

② Número de solicitud: 009900194

⑤ Int. Cl.⁷: C07K 14/47

C12N 15/12

G01N 33/68

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **25.01.1999**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2001**

Fecha de concesión: **02.11.2001**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.12.2001**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.12.2001

⑰ Titular/es:
**UNIVERSIDAD DE OVIEDO.
Plaza del Riego, 4 (Edificio Histórico)
33003 Oviedo, Asturias, ES**

⑱ Inventor/es: **Domínguez Luengo, Pedro y
Alvarez Alvarez, Javier**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Caracterización y clonación de la heteroglobina: una proteína de hámster Sirio que une inmunoglobulinas E humanas.**

㉑ Resumen:
Caracterización y clonación de la heteroglobina: una proteína de hámster Sirio que une inmunoglobulinas E humanas.

Un primer objeto de la invención es la purificación y caracterización de una nueva proteína de hámster Sirio, denominada heteroglobina por ser una glucoproteína heterodimérica con dos isoformas, cuya expresión en glándulas y saliva muestra heterogeneidad. El segundo objeto es la clonación de los dos cDNAs para la subunidad grande glicosada correspondientes a cada una de las dos isoformas. Además, la heteroglobina tiene la capacidad de unir IgE antígeno específicas presentes en los sueros de pacientes alérgicos al hámster, siendo el tercer objeto de la invención el uso de la proteína como material puro de fácil obtención en la fabricación de productos de diagnóstico y para la prevención y atenuación de los síntomas en procesos asociados a la alergia al hámster.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 155 768 B1

DESCRIPCION

Caracterización y clonación de la heteroglobina: una proteína de hámster sirio que une inmunoglobulinas E humanas.

5 **Antecedentes de la invención**

10 Durante un proceso de identificación de clones de cDNA correspondientes a mRNAs con expresión sexual específica (Domínguez et al., 1996, *Microsc Res Techniq*, 34: 111-117), obtuvimos y estudiamos el clon FHG22 a partir de una genoteca de glándula de Harder de hámster Sirio. El mRNA se observa también en las glándulas submaxilar y parótida, y presenta una pauta de lectura abierta para un polipéptido de 95 aminoácidos con un posible péptido señal (Domínguez, 1995, *FEBS Letters*, 376: 257-261). Mediante estudios de comparación de secuencias se observó que presenta homología con los polipéptidos de la familia de la uteroglobina (Miele et al., 1994, *J Endocrinol Invest*, 17: 679-692). Todos los miembros de esta familia son subunidades de proteínas oligoméricas de secreción, de las cuales la uteroglobina es la única homodimérica descrita, mientras que el resto son heterooligoméricas. En todos los casos se mantienen dos residuos de Cys cerca de los extremos amino y carboxilo del polipéptido maduro, que son responsables de la unión entre las subunidades mediante enlaces disulfuro (Miele et al., 1994, *J Endocrinol Invest*, 17: 679-692; Domínguez, 1995, *FEBS Letters*, 376: 257-261).

20 Con el objeto de estudiar la expresión de FHG22 a nivel de polipéptido (pFHG22), preparamos antiseros antipéptido dirigidos contra distintas zonas de la secuencia del polipéptido maduro. Uno de ellos, denominado AP3, es capaz de detectar pFHG22 mediante análisis Western tras electroforesis convencional (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, con un perfil de expresión tisular y sexual paralelo al que presenta el mRNA FHG22, y además en saliva y pelo. Sin embargo, en condiciones no reductoras detecta una proteína de 39 kDa que es un heterodímero formado por pFHG22 (subunidad A), unido mediante enlaces disulfuro a un segundo polipéptido glicosilado (subunidad B1 o B2), lo que causa la existencia de dos isoformas muy similares (tipo 1 ó 2). El nombre de Heteroglobina es reflejo de la heterogeneidad observada en su estructura (heterodímero), composición (dos isoformas) y expresión tisular (específica de algunos tejidos, con diferencias sexuales). Un primer objeto de la invención es la purificación de la proteína a partir de glándula parótida y su caracterización, incluyendo la determinación de la secuencia amino terminal de las subunidades B. Un segundo objeto de la invención es la clonación de los cDNAs de las subunidades B1 y B2, a partir de los datos previos de secuencia de aminoácidos. Mediante comparación de secuencias, se observó que las subunidades A y B muestran homología con Fel d I, el alérgeno mayoritario del gato (Griffith et al., 1992, *Gene*, 113: 263-268), la uteroglobina, de la que se ha descrito que interviene en el control de procesos inflamatorios (Miele et al., 1994, *J Endocrinol Invest*, 17: 679-692) y la prostateína, que actúa como autoantígeno (Liu et al., 1997, *J Immunol*, 159:472-480). Debido a su carácter de glicoproteína de secreción y a su presencia en saliva y pelo, estudiamos la posibilidad de que la Heteroglobina fuera un alérgeno de hámster. El tercer objeto de la invención consiste en la demostración de que la Heteroglobina es capaz de unir IgE presentes en sueros de pacientes alérgicos al hámster, en relación directa con los niveles de IgE específicas determinados mediante sistemas de diagnóstico clínico convencionales.

45 La alergia es un fenómeno inmunológico también conocido como hipersensibilidad tipo I o inmediata, que se desarrolla en individuos atópicos cuando una respuesta de IgE se dirige contra antígenos inocuos, y la liberación consiguiente de mediadores por parte de los mastocitos sensibilizados por esa IgE produce una reacción inflamatoria aguda, con síntomas como el asma o la rinitis. La atopia es una predisposición genética a desarrollar ese tipo de respuestas, y está basada en la capacidad de producir niveles de IgE superiores a los normales en respuesta al contacto con un antígeno, que pasa a denominarse alérgeno. Las respuestas alérgicas están provocadas por la exposición del paciente a un alérgeno con el que había tenido contacto previo. Ese contacto previo, en individuos atópicos, produce la formación de IgE específicas contra ese alérgeno, que se unen a receptores específicos de alta afinidad en la superficie de mastocitos y otras células. En un contacto posterior, el alérgeno se une a su IgE específica e induce activación celular, con la liberación y generación en el tejido de mediadores (histamina, leucotrienos) que producen síntomas inmediatos. La enfermedad clínica se manifiesta como una respuesta inflamatoria de las vías respiratorias de carácter variable, pero que siempre está mediada por reacciones a nivel de IgE. Los aumentos en IgE específicas son reflejados por respuestas positivas a los test cutáneos ante los alérgenos, o por ensayos "in vitro". (Howarth, 1998, *Brit Med J*, 316: 758-761).

60 El diagnóstico de las alergias se realiza principalmente mediante tres sistemas que utilizan los alérgenos como material de referencia: la prueba cutánea, la radioalergoabsorción (RAST) y sistemas relacionados, y la prueba de provocación nasal o bronquial. Las dos primeras son las más usadas, por la menor incidencia traumática sobre el paciente, y ambas se basan en la unión directa de las proteínas alérgicas a

sus IgE específicas. Las técnicas de RAST se usan para las cuantificaciones de la IgE total y específica, basadas en la reacción de los alergenios presentados en fase sólida con las IgE presentes en el suero del enfermo. Además, hay otras medidas "in vitro" relacionadas con el diagnóstico de las alergias, como la medida de los marcadores de la inflamación, el Immunoblotting, el ensayo de inhibición de RAST o la determinación de IgG/IgG4 (Diéguez Junquera, *Curso Práctico Sobre Asma Infantil*, Oviedo, 1997, pp. 21-26). En la mayor parte de los casos la respuesta alérgica está producida por varias proteínas; esto es frecuente en el caso de alergias a mamíferos pequeños, en los que la saliva, orina, heces y secreciones glandulares son fuentes de alergenios presentes en la piel, y sucede en el caso de la alergia al hámster. Para el estudio de la interacción de las IgE con mezclas alérgicas complejas de este tipo se usa el Immunoblotting o Western blot, en el que se detecta la unión de IgE a proteínas separadas electroforéticamente, lo que permite una valoración cualitativa y semicuantitativa de la reactividad de las IgE frente a cada proteína. Hemos usado este método para el estudio de la interacción entre las IgE y nuestra proteína, con el objeto de establecer comparaciones con las medidas de IgE establecidas por métodos convencionales, y verificar si es utilizable como material de diagnóstico, estudio y tratamiento.

15

Ventajas de la invención

- El uso de una proteína alérgica pura cuyo suministro biológico proceda de una fuente renovable (como la saliva de hámster) en combinación con un método de purificación eficaz, abarata y facilita la producción del material de diagnóstico y evita la variabilidad en su composición y la necesidad de esterilización. Además, usando alergenios purificados o recombinantes, se ha encontrado una concordancia perfecta entre reactividad ante las pruebas cutáneas y las medidas serológicas, sugiriendo que los alergenios puros no generan resultados falsos positivos ni falsos negativos.

- Como ya se ha demostrado para otras alergias, el uso de alergenios nativos o recombinantes (Bond et al., 1993, *Mol Immunol*, 30: 1529-1541), o de fragmentos específicos (Valenta et al., 1997, *Biol Chem*, 378: 745-749) permiten el estudio de las interacciones con las IgE humanas y facilita la elucidación de los mecanismos patofisiológicos que producen la alergia.

- Se ha demostrado que la inmunización con alergenios purificados o recombinantes puede suprimir su interacción con las IgE y por tanto la respuesta alérgica (Vrtala et al., 1998, *J Immunol*, 160: 6137-6144), lo que abre nuevas posibilidades de terapia (Romagnani, 1997, *Curr Opin Immunol*, 6: 835-837).

Breve descripción de la invención

35

Un primer objeto de la de la invención es la purificación conjunta de las dos isoformas de una proteína de hámster de 39 kDa que fue denominada Heteroglobina, mediante su identificación con el antisuero AP3, desarrollado para la detección del polipéptido pFHG22. Gracias a ello, se pudo realizar la caracterización de dicha proteína a nivel de estructura cuaternaria, observándose que está formada por una subunidad A (pFHG22) unida por enlaces disulfuro a subunidades B glicosiladas de las que hay dos isoformas (B1 y B2). Usando la proteína purificada, se obtuvo la secuencia de aminoácidos del extremo amino de las subunidades B, lo que permitió desarrollar el objeto siguiente.

Un segundo objeto de la invención es el aislamiento y secuenciación de clones de cDNA para las subunidades B1 y B2, observándose que son muy homólogas entre sí, y que pertenecen a la familia de polipéptidos de la uteroglobina y la prostateína, como la subunidad A (pFHG22).

Un tercer objeto de la invención es el uso de la proteína pura como material para procesos de diagnóstico, tratamiento o estudio de la respuesta alérgica al hámster. La capacidad de unir IgE específicas y sus homologías con proteínas relacionadas con procesos inflamatorios y de respuesta inmune, indican que la Heteroglobina es uno de los alergenios del hámster. El hecho ya mencionado de que la unión es mayor usando sueros con niveles de IgE específicas más altos, indica que debe de ser un alérgeno de respuesta mayoritaria.

Descripción de las figuras

55

Figura 1: Purificación de la Heteroglobina de glándula parótida.

A. Análisis por SDS-PAGE de los precipitados con sulfato amónico. Calle 1: precipitado al 50%; calle 2: precipitado 80-50%; calle 3: extracto crudo. Como se observa en la figura, las muestras se analizan en condiciones reductoras y no reductoras. A la derecha se indica el tamaño de los marcadores de peso molecular.

60

B. Cromatograma de la purificación mediante intercambio iónico en DEAE-Sephacell. La presencia de la Heteroglobina se detectó mediante análisis Western con antisuero AP3, y se expresa en unidades arbitrarias de absorbancia que indican la intensidad de la señal, en cada fracción. También se muestra el gradiente de concentración de NaCl usado para la elución, y la concentración de proteína medida por absorbancia a 280 nm.

Figura 2: Análisis por SDS-PAGE de una preparación purificada de Heteroglobina.

10 Calle 1: condiciones no reductoras; calle 2: condiciones reductoras; calle 3: muestra reducida y desglicosilada. Cada una de las calles contiene 10 μ g de Heteroglobina.

Figura 3. Análisis Western (Immunoblotting) de la unión de IgE humanas a Heteroglobina purificada. La numeración de las calles se corresponde con la de los sueros de los pacientes indicados en la Tabla I.

15 TABLA I: Valores de IgE específicas y/o totales en sueros de pacientes alérgicos. Estos valores se determinaron mediante sistemas de diagnóstico hospitalario convencionales.

Descripción detallada de la invención

20 *Purificación y caracterización de la heteroglobina*

Como sistema de detección se usó el antisuero AP3, que es capaz de identificar un polipéptido de Pmol aparente de 5.600 (p5,6) en preparaciones biológicas de hámster, mediante análisis Western tras SDS-PAGE en condiciones reductoras. La secuenciación amino terminal de p5,6 demostró que se trata de la forma madura propuesta inicialmente para el polipéptido pFHG22 (Domínguez, 1995, *FEBS Letters*, 376: 257-261). Mediante análisis Western en condiciones no reductoras, el antisuero AP3 detecta una proteína de 39 kDa (p39) en las mismas preparaciones, lo que nos ha permitido seguir el proceso de purificación de esta proteína. Para la purificación a partir de un extracto crudo de glándula parótida, en la que p39 es mayoritaria, se siguen dos pasos sencillos: en la Figura 1A se muestran los preparados obtenidos por precipitación diferencial con sulfato amónico, y en la Figura 1B una cromatografía de intercambio iónico, en la que se usa AP3 para identificar las fracciones conteniendo p39. La combinación de ambos procesos de purificación permite obtener un producto que aparece como una única banda mediante su análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, como se observa en la calle 1 de la Figura 2. La proteína presenta dos isoformas de tamaño y características similares, que no se aprecian en la figura, ya que copurifican juntas. Este proceso de purificación se puede aplicar con ligeros ajustes a la saliva, que puede ser la fuente idónea para su obtención, por ser la Heteroglobina abundante en ella y tener carácter renovable.

40 Usando preparaciones purificadas de p39 y análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras, se observa que tiene una estructura heterodimérica (Figura 2). Este aspecto y otros, como se explica en los antecedentes, justifican su denominación de Heteroglobina. La estructura cuaternaria está mantenida mediante enlaces disulfuro, como lo demuestra la liberación del polipéptido p5.6 (pFHG22 o subunidad A) y un segundo polipéptido p34 (subunidad B) mediante reducción con un reactivo de tior (calle 2, Figura 2). Además, la subunidad B está altamente glicosilada en residuos de Asn, ya que la desglicosilación completa de p34 produce un polipéptido de un Pmol aparente de 13.000 (calle 3, Figura 2). La secuenciación de p34 mediante el sistema clásico de la degradación de Edman, ha permitido conocer la secuencia correspondiente a los 22 residuos del extremo amino de la subunidad B (SEQ ID NO: 1).

50 Es interesante señalar la diferencia entre los tamaños aparentes de las subunidades A (5,6 kDa) y B desglicosilada (13 kDa), cuando ambos son polipéptidos semejantes, cuyos tamaños calculados en base a sus secuencias (ver más adelante para la B) son de 8 kDa y 9 kDa, respectivamente. Este tipo de comportamiento no es infrecuente para proteínas pequeñas usando sistemas de SDS-PAGE convencionales.

55 *Aislamiento de cDNAs para la subunidad B*

Gracias a la secuencia de aminoácidos del extremo amino-terminal de la subunidad B (SEQ ID NO: 1), se diseñó una mezcla de oligonucleótidos, cuya combinación de secuencias cubre todos los posibles codones de una zona específica del polipéptido (residuos 11 a 17 de SEQ ID NO: 1). Para obtener su cDNA completo, se utilizó previamente un método de amplificación específica que permitiera el aislamiento de un fragmento parcial. Así, se realizó una amplificación por PCR usando como molde una preparación plasmídica correspondiente a una genoteca de cDNA de glándula de Harder de hámster

hembra (Domínguez, 1995, *FEBS Letters*, 376: 257-261), como cebador para el extremo 5' la mezcla de oligonucleótidos citada (SEQ ID NO: 2), y como cebador para el extremo 3' una secuencia correspondiente a la orientación opuesta en el plásmido (SEQ ID NO: 3). Esta amplificación produjo un fragmento de DNA de unos 300 pb, que le utilizó como sonda para la detección de clones de cDNA en la genoteca antes citada, aislándose ocho de ellos. La secuenciación de los mismos, así como la de la sonda original, demostró que existían dos tipos de cDNA altamente homólogos para la subunidad B, que se denominaron B1 (SEQ ID NO: 4) y B2 (SEQ ID NO: 6), y que presentan una homología del 92,6%.

La homología es completa en las zonas 5' y 3' sin traducir, mientras que los cambios afectan a la zona codificante, causando diferencias entre las secuencias de aminoácidos. Así, en ambos existen pautas de lectura abiertas paralelas de 94 codones, correspondientes a las secuencias de aminoácidos de las isoformas polipeptídicas correspondientes B1 (SEQ ID NO: 5) y B2 (SEQ ID NO: 7), que presentan un grado de homología del 84%. La comparación de ambas secuencias con la SEQ ID NO: 1 demostró que ambos polipéptidos tienen un péptido señal con la misma secuencia de 16 aminoácidos, de forma que en la proteína aparecen en su versión madura. De acuerdo con esto, los pesos moleculares calculados son de 10.883 y 10.821 antes, y 9.048 y 8.986 después de la acción de la peptidasa señal, respectivamente. También se observó en ambos la presencia de tres residuos de Asn que son posibles sitios de glicosilación. Esto demuestra que existen dos isoformas glicosiladas de la subunidad B de la Heteroglobina, que causan la aparición de dos isoformas de la proteína mediante las asociaciones de la subunidad A con cada una de ellas, para formar los tipos A-B1 y A-B2.

Por comparación de secuencias, se detectó que ambas isoformas de la subunidad B, como la subunidad A (o pFHG22), pertenecen a la familia de la uteroglobina, la prostateína, Fel d I y otros (Domínguez, 1995, *FEBS Letters*, 376: 257-261). Como en todos los polipéptidos de esta familia, que forman parte de proteínas oligoméricas de secreción, se mantienen dos residuos de Cys cerca de los extremos amino y carboxilo de los polipéptidos maduros, que intervienen en la unión por enlaces disulfuro a los residuos de Cys correspondientes en la subunidad A.

Texto libre de la lista de secuencias: Se ha demostrado para la uteroglobina y la lipofilina, y se asume para el resto de la familia, que los residuos de Cys conservados cerca de los extremos amino y carboxilo de los polipéptidos maduros son los responsables de la unión por enlaces disulfuro para mantener la estructura dimérica.

Detección de la unión de IgE específicas a la Heteroglobina

Hemos observado que preparaciones purificadas de Heteroglobina son capaces de unir IgE procedentes de sueros de pacientes alérgicos al hámster (Tabla I), pero no cuando proceden de controles negativos con bajos niveles de IgE totales, ni de sueros de pacientes con otros tipos de alergia, aunque sea un paciente multialérgico con altos niveles de IgE totales, o incluso de un paciente con altos niveles de IgE específicas de gato, cuyo principal alérgeno Fel d I presenta homología con la Heteroglobina. Esta unión se detectó mediante análisis Western (o Immunoblotting) tras SDS-PAGE de la proteína purificada en condiciones no reductoras y posterior detección de IgE humanas, y el resultado se muestra en la Figura 3. En estas condiciones, se observa una correlación clara entre los niveles de IgE específicas detectadas en cada uno de los sueros de los pacientes alérgicos al hámster mediante un sistema convencional de diagnóstico (Tabla I), y la señal detectada por análisis Western usando el suero de cada paciente. Aunque no se refleja en la Figura 3, la capacidad de unir IgE es específica a nivel molecular, ya que la coincubación durante el análisis Western de la Heteroglobina purificada con uno de los sueros que producen señal intensa (Paciente 6) elimina esta señal.

Manera de realizar la invención

Inmunodetección del polipéptido FHG22 en tejidos y saliva del hámster

Se realizó mediante análisis Western-blot empleando el antisuero AP3. Antes de realizar la separación por SDS-PAGE, las muestras reducidas se incubaron con β -mercaptoetanol 1,4 M, a temperatura ambiente durante 30 min. Una vez realizada la separación electroforética, se procedió a la electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa, siguiendo el procedimiento descrito en Burnette (1981. *Anal. Biochem.* 112: 195-203). Para evitar la unión inespecífica de anticuerpos a las proteínas, las membranas se trataron durante 1 hora con solución de bloqueo: leche desnatada en polvo al 5% en PT (Tween 20 al 0,1% en PBS). A continuación, se incubaron durante 1 hora con el antisuero AP3 diluido 1/2.000 en solución de bloqueo. La detección de los anticuerpos específicos unidos a la membrana se realizó empleando el sistema ECL de la compañía Amersham, siguiendo el protocolo descrito por el

fabricante.

Purificación y desglicosilación de la Heteroglobina de hámster a partir de glándulas parótidas

5 Glándulas parótidas extraídas a hámsters hembra se homogeneizaron en 2 volúmenes de tampón de extracción de proteínas (NaCl 0,15 M; EDTA 10 mM; PMSF 0,1 μ M; aprotinina 1 μ g/ml y Tris-HCl 50 mM pH 8,0). El homogeneizado resultante se centrifugó a 15.000 g durante 1 hora y a 4 C, tras lo cual se recuperó el sobrenadante que denominamos extracto crudo. Como primer paso en la purificación de la Heteroglobina (HGL), se realizó una precipitación diferencial con sulfato amónico llevada a cabo en dos
10 pasos consecutivos: i) precipitación al 50 % de la concentración de saturación de dicha sal, desechándose el precipitado; ii) precipitación al 80 % mediante adición al sobrenadante del paso anterior de sulfato amónico hasta alcanzar dicha concentración de saturación. El precipitado obtenido en el segundo paso, enriquecido en HGL y denominado 80-50, una vez resuspendido en 1 volumen de tampón fosfato sódico 10 mM pH 7.5, fue objeto de separación cromatográfica por intercambio iónico empleando DEAE-Sephacel
15 (Pharmacia) en una columna 16/20. Tras la inyección de la muestra (0,5 ml) a la columna, se dejó un volumen de adsorción de 40 ml a un flujo de 0,3 ml/min de tampón fosfato sódico 10 mM pH 7.5. La elución de la HGL se realizó mediante la aplicación de un gradiente lineal de concentración de NaCl de 0 a 0,5 M, en un volumen de 100 ml. La presencia y pureza de la HGL en las fracciones recogidas se determinó respectivamente mediante análisis Western y SDS-PAGE (tinción Coomassie) de las mismas.
20 Las fracciones que contenían HGL pura se juntaron para proceder a su diálisis, frente a 500 volúmenes de H₂O, y posterior liofilización.

La eliminación completa de los oligosacáridos unidos a residuos de Asn de la subunidad B de la HGL se realizó mediante tratamiento con PNGasa F o N-glicosidasa F (Boehringer Mannheim). Así,
25 la HGL (unos 10 μ g) se incubó en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 6.6, en condiciones reductoras (β -mercaptoetanol 1,4 M), con 1,2 U de PNGasa F a 37°C durante 18 horas y en un volumen de reacción de 50 μ l.

Detección de IgE humanas específicas para Heteroglobina mediante análisis Western-blot

30 Se realizó SDS-PAGE con muestras de HGL purificada a partir de glándula parótida, usando unos 10 μ g por pocillo. Como antisueros se emplearon sueros humanos pertenecientes a individuos alérgicos al hámster, a otras fuentes, o no alérgicos, según se explica en la Tabla I. En esta ocasión, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con dichos sueros diluidos 1/10, en solución de bloqueo, durante unas 14
35 horas y a 4°C. Como segundo anticuerpo se empleó anti-human IgE-HRP (Sigma), diluido 1/500, cuya actividad peroxidasa acoplada permite detectar la presencia de IgE específicas unidas a la membrana mediante el sistema ECL.

PCR con oligonucleótidos degenerados y escrutinio de la genoteca de cDNA de de glándula de Harder de hámster

40 Para la identificación del cDNA que codifica la subunidad B de la HGL se utilizó una mezcla de oligonucleótidos de secuencia derivada de la secuencia aminoterminal obtenida mediante el método de degradación de Edman en un secuenciador automático (SEQ ID NO: 1). En concreto, se seleccionó
45 el heptapéptido correspondiente a los aminoácidos 11-17 de dicha secuencia que mostraba un grado de degeneración de codones lo suficientemente bajo como para realizar el abordaje que se explicará más adelante. Así, se sintetizó una mezcla de 384 icosanucleótidos (SEQ ID NO: 2) que contenía todas las posibles secuencias codificantes de ese heptapéptido, excluyendo el tercer nucleótido del último codón. También se sintetizó un icosanucleótido (SEQ ID NO: 3) correspondiente a la secuencia complementaria
50 y en dirección opuesta de la región comprendida entre las posiciones 277-296 del plásmido pcDNA II (Invitrogen). Empleando como cebador 5' SEQ ID NO: 2 y como cebador 3' SEQ ID NO: 3 se realizó una amplificación por PCR usando como molde una preparación de DNA plasmídico, obtenida por métodos convencionales, conteniendo todos los clones de una genoteca de cDNAs de glándula de Harder de hámster hembra insertados en los sitios *Bst* XI del vector pcDNA II (Domínguez, 1995, *FEBS Letters*, 376: 257-
55 261). El producto único de amplificación fue clonado en el vector pGEM-T (Promega) y secuenciado en su totalidad mediante el método de terminadores de cadena descrito por Sanger (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 74: 5463. La secuencia obtenida estaba de acuerdo con SEQ ID NO: 1, por lo que se empleó en la identificación de clones completos de cDNA. Para ello, dicho producto se utilizó como molde en la síntesis de una sonda radiactiva por "random-priming" (Feimberg y Vogelstein, 1983, *Anal. Biochem.* 132: 6-
60 13), usando el preparado comercial Rediprime (Amersham) y 30 μ Ci de [α ³³ P]-dCTP. Esta sonda se empleó para realizar hibridación en colonia con filtros de nitrocelulosa que contenían réplicas de cultivos en placa de la genoteca de cDNA de glándula de Harder (clonada en *Escherichia coli*). Como resultado,

ES 2 155 768 B1

se aislaron 8 clones que presentaron hibridación específica con las sondas radiactivas, cuya secuenciación por el método mencionado permitió obtener las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6.

TABLA I

5

10

15

20

Paciente	Alergia	IgE hámster*	IgE gato*	IgE total*
1	Hámster	n.d.	-	-
2	Hámster	3,11	-	-
3	Hámster	n.d.	-	-
4	Hámster	0,4	-	-
5	Hámster	2,11	-	-
6	Hámster	25,4	-	-
7	Hámster	1,34	-	-
8	Hámster	59,4	-	-
9	Gato	-	>100	719
10	General	-	-	>2.000
11	No alérgico	-	-	15

25 (*) UI/ml

n.d.: no determinado

Texto libre de la Lista de Secuencias

30

Se ha demostrado para la uteroglobina y para la lipofilina, asumiéndose para el resto de esta familia de proteínas, que los enlaces disulfuro de la estructura dimérica se establecen entre los residuos conservados de Cys próximos a los extremos amino y carboxilo de los polipéptidos maduros.

35

40

45

50

55

60

ES 2 155 768 B1

LISTA DE SECUENCIAS

5

<110> Universidad de Oviedo.

10

<120> Heteroglobina: un alergen de hámter sirio.

15

<130> Referencia del expediente.

20

<160> 7

<210> 1

25

<211> 33

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

30

<400>

Arg Thr Asn Ser Ser Gly Cys Asn Ala Leu Asp Asp Ala Ile Ala
1 5 10 15

35

Lys Thr Ile Asn Ser Ser Val
20

40

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

45

<213> Artificial Sequence

50

<400>2

gaygaygna thgcnaarac

20

55

<210> 3

<211> 20

<213> Artificial Sequence

60

ES 2 155 768 B1

5 <400> 3
tcaagctatg catcaagctt

10 <210> 4
<211> 477
<212> DNA
15 <213> *Mesocricetus auratus*

20 <220>
<221> CDS
<222> (42)...(326)

25 <221> mat_peptide
<222> (90)...(323)

30 <221> mRNA
<222> (1)...(477)

35 <221> polyA_signal
<222> (462)...(468)

40 <221> polyA_site
<222> (477)

45 <221> sig_peptide
<222> (42)...(89)

50 <221> 3'UTR

55

60

ES 2 155 768 B1

<220>
 5 <221> DISULFID
 <222> (7, 75)
 10 <223> It has been shown for uteroglobin and lipophyllin, and assumed for
 all the family, that the disulfide bonds holding the dimeric structure
 15 together are established between the Cys residues conserved near the
 amino and carboxy ends of the mature polypeptides.

20 <221> CARBOHYD
 <222> (3, 19, 56)

25 <221> SIGNAL
 <222> (-16)...(-1)

30
 <400> 5
 Met Arg Leu Val Ile Val Phe Met Leu Ala Ile Ile Pro Val Tyr
 -16 -15 -10 -5
 35 Cys Arg Thr Asn Ser Ser Gly Cys Asn Ala Leu Asp Asp Ala Ile
 -1 1 5 10
 40 Ala Lys Thr Ile Asn Ser Ser Val Ser Met Glu Glu Tyr His Glu
 15 20 25
 Thr Val Gln Lys Tyr Thr Phe Leu Pro Tyr Ile Lys Lys Thr Met
 30 35 40
 45 Glu Lys Phe Lys Glu Cys Phe Ala Lys Gln Ser Asn Glu Thr Gln
 45 50 55
 His Asn Val Phe Val Met Glu Phe Ala Ile Tyr Asn Ser Asp Lys
 50 60 65 70
 Cys Ser Gly Tyr
 75

55 <210> 6
 <211> 443
 60

ES 2 155 768 B1

```

5      <212> DNA
      <213> Mesocricetus auratus

10     <220>
      <221> CDS
      <222> (35)...(319)

15
      <221> mat_peptide
      <222> (83)...(316)

20
      <221> mRNA
      <222> (1)...(443)

25
      <221> sig_peptide
      <222> (35)...(82)

30
      <221> 3'UTR
      <222> (317)...(443)

35
      <221> 5'UTR
      <222> (1)...(34)

45
      <400> 6
          gtaccagaga ccgaccgaca agagctgcct caac atg aag ttg 43
          Met Arg Leu
          -16 -15

50
          gtc ata gtc ttc atg ctg gcc atc atc ccc gtt tac tgc cga acc 88
          Val Ile Val Phe Met Leu Ala Ile Ile Pro Val Tyr Cys Arg Thr
          -10 -5 -1 1

55
          aat agt tct ggc tgc aat cga atg gac gat gct att gca aag acc 133
          Asn Ser Ser Gly Cys Asn Arg Met Asp Asp Ala Ile Ala Lys Thr
          5 10 15

60
          att aac tca tct gtg cct atg gaa gaa tat cac gaa aca gtt aaa 178

```

ES 2 155 768 B1

```

5      Ile Asn Ser Ser Val Pro Met Glu Glu Tyr His Glu Thr Val Lys
          20                25                30

aaa tac aca act ctt cct tat atc cga agt act gtg gaa aag ttc 223
Lys Tyr Thr Thr Leu Pro Tyr Ile Lys Ser Thr Val Glu Lys Phe
          35                40                45

10     aag gaa tgt ttt gca aaa cag tct aat gat act cag cat aat att 268
Lys Glu Cys Phe Ala Lys Gln Ser Asn Asp Thr Gln His Asn Ile
          50                55                60

15     ttt gtg atg gtg tat gcg gtt tac aac agt gac aag tgt tca gga 313
Phe Val Met Val Tyr Ala Val Tyr Asn Ser Asp Lys Cys Ser Gly
          65                70                75

20     tat taaccttcca cgagaccttt ggatcataag ccagcagtga taccacaaat 366
Tyr

cataactttt ctttcgtgat tgtatcattc tgtctataag tgcaagatta 416

25     ttgttggaat ctcaaaggca tttctttt 443

30     <210> 7
        <211> 94
        <212> PRT
35     <213> Mesocricetus auratus

40     <220>
        <221> DISULFID
        <222> (7, 75)
45     <223> It has been shown for uteroglobin and lipophyllin, and assumed for
        all the family, that the disulfide bonds holding the dimeric structure
50     together are established between the Cys residues conserved near the
        amino and carboxy ends of the mature polypeptides.

55     <221> CARBOHYD
        <222> (3, 19, 56)

60

```

ES 2 155 768 B1

5 <221> SIGNAL

10 <222> (-16)...(-1)

10 <400> 7
 Met Arg Leu Val Ile Val Phe Met Leu Ala Ile Ile Pro Val Tyr
 -16 -15 -10 -5

15 Cys Arg Thr Asn Ser Ser Gly Cys Asn Arg Met Asp Asp Ala Ile
 -1 1 5 10

20 Ala Lys Thr Ile Asn Ser Ser Val Pro Met Glu Glu Tyr His Glu
 15 20 25

25 Thr Val Lys Lys Tyr Thr Thr Leu Pro Tyr Ile Lys Ser Thr Val
 30 35 40

30 Glu Lys Phe Lys Glu Cys Phe Ala Lys Gln Ser Asn Asp Thr Gln
 45 50 55

35 His Asn Ile Phe Val Met Val Tyr Ala Val Tyr Asn Ser Asp Lys
 60 65 70

40 Cys Ser Gly Tyr
 75

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Proteína de hámster Sirio llamada Heteroglobina, **caracterizada** por tener un peso molecular aparente de 39.000 y una estructura cuaternaria en la que el polipéptido maduro FHG22 está unido mediante enlaces disulfuro a un segundo polipéptido glicosilado, cuyo extremo amino terminal presenta la secuencia SEQ ID NO: 1.
2. cDNA obtenido de hámster Sirio, **caracterizado** por poseer la secuencia SEQ ID NO: 4, conteniendo una pauta de lectura abierta para la SEQ ID NO: 5, y estar clonado en un plásmido adecuado para su replicación y expresión.
3. Polipéptido maduro de hámster Sirio, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por poseer una secuencia definida por los residuos 1 a 78 de la SEQ ID NO: 5 y contener varias cadenas de oligosacárido unidas a residuos de asparagina.
4. cDNA obtenido de hámster Sirio, **caracterizado** por poseer la secuencia SEQ ID NO: 6, conteniendo una pauta de lectura abierta para la SEQ ID NO: 7, y estar clonado en un plásmido adecuado para su replicación y expresión.
5. Polipéptido maduro de hámster Sirio, según las reivindicaciones 1 y 4, **caracterizado** por poseer una secuencia definida por los residuos 1 a 78 de la SEQ ID NO: 7 y contener varias cadenas de oligosacando unidas a residuos de asparagina.
6. Proteína de hámster Sirio llamada Heteroglobina tipo 1, según las reivindicaciones 1, 2 y 3, en la que la forma madura del polipéptido FHG22 está unida mediante enlaces disulfuro al polipéptido maduro y glicosilado cuya secuencia está entre los residuos 1 y 78 de la SEQ ID NO: 5.
7. Proteína de hámster Sirio llamada Heteroglobina tipo 2, según las reivindicaciones 1, 4 y 5, en la que la forma madura del polipéptido FHG22 está unida mediante enlaces disulfuro al polipéptido maduro y glicosilado cuya secuencia está entre los residuos 1 y 78 de la SEQ ID NO: 7.
8. Proteína de hámster Sirio denominada Heteroglobina, según las reivindicaciones 1, 3, 5, 6 y 7, **caracterizada** por tener dos isoformas en las que la parte diferencial la constituye la subunidad glicosilada.
9. Utilización de la Heteroglobina, sola o en combinación, según las reivindicaciones 1, 6, 7 y 8, en la producción de sistemas de detección, diagnóstico o medida de parámetros relacionados con la alergia de mamíferos al hámster.
10. Utilización de la Heteroglobina, sola o en combinación, según la reivindicación anterior, donde los mamíferos son humanos.
11. Utilización de la Heteroglobina, sola o en combinación, según las reivindicaciones 1, 6, 7 y 8, en la producción de sistemas de prevención y atenuación del progreso de los síntomas en procesos asociados a la alergia de mamíferos al hámster.
12. Utilización de la Heteroglobina, sola o en combinación, según la reivindicación anterior, donde los mamíferos son humanos.
13. Utilización de la Heteroglobina, sola o en combinación, según las reivindicaciones 1, 6, 7 y 8, para el estudio de las bases moleculares de la alergia en mamíferos.
14. Utilización de moléculas biológicas derivadas de las secuencias definidas por SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, en su totalidad o parcialmente, en los procesos descritos en las reivindicaciones 9, 10, 11, 12, y 13.

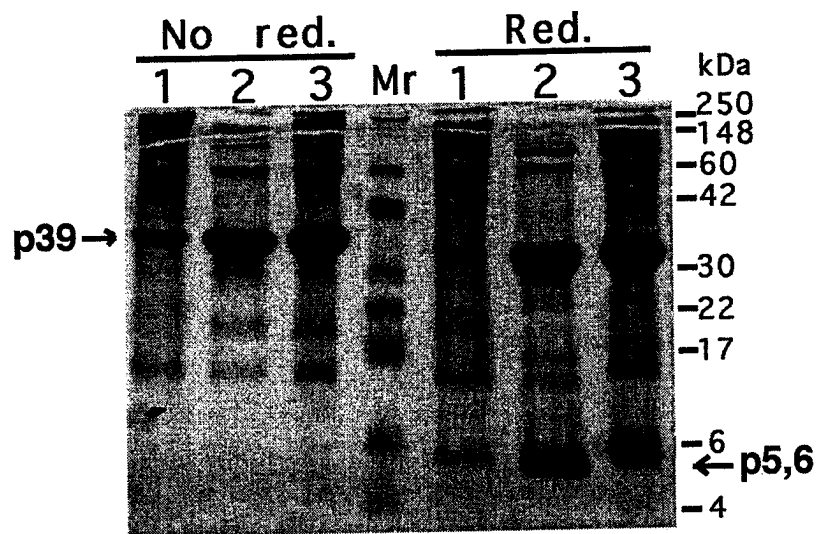


Figura 1.A.

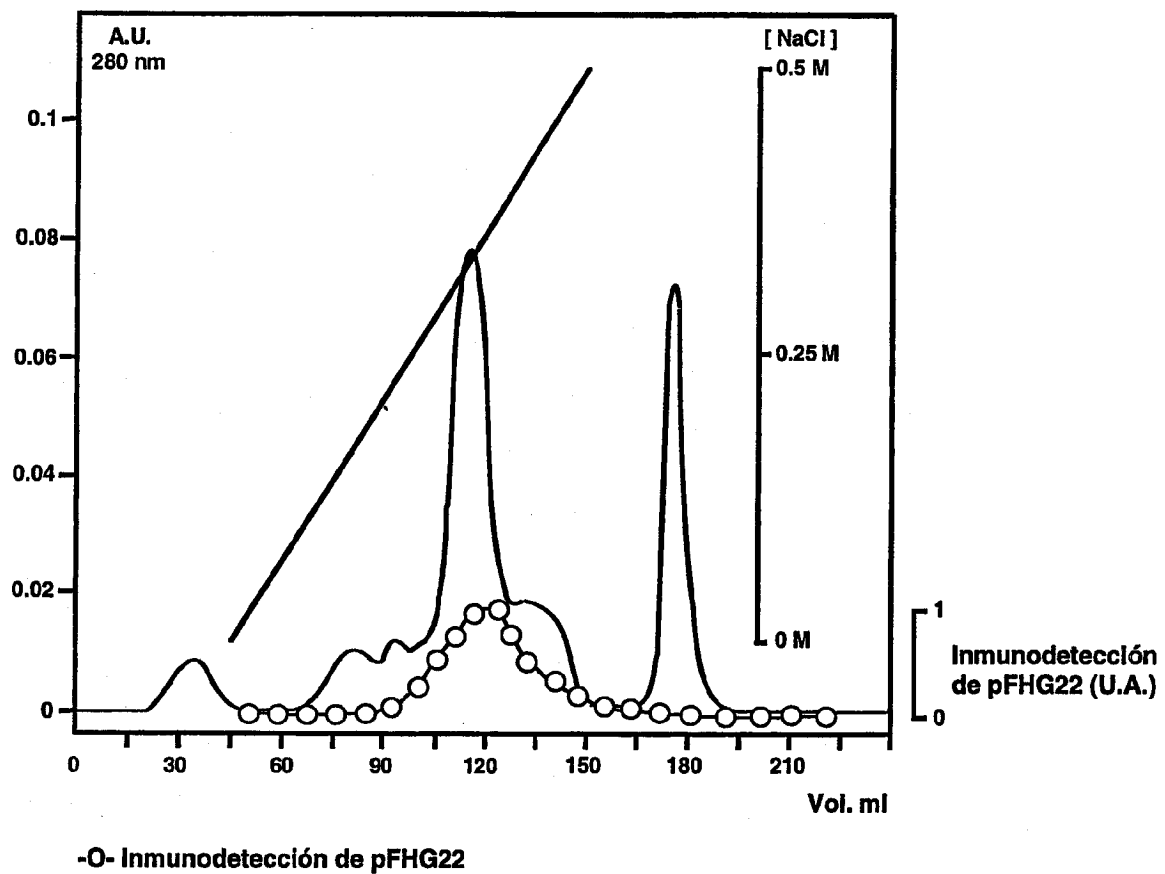


Figura 1.B.

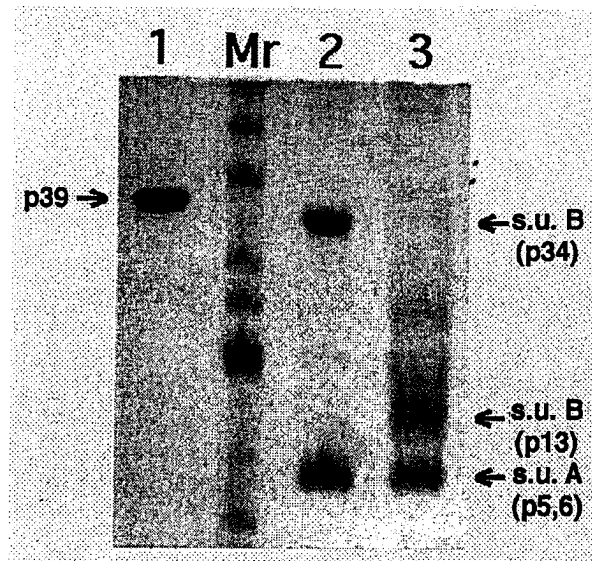


Figura 2

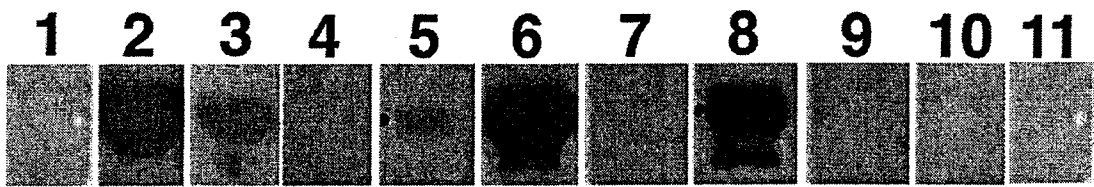


Figura 3



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C07K 14/47, C12N 15/12, G01N 33/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DOMINGUEZ, P. "Cloning of a Syrian hamster cDNA related to sexual dimorphism: establishment of a new family of proteins", FEBS LETTERS, 1995, Vol. 376, páginas 257-261. Todo el documento.	1-14
A	GUTIERREZ SAGAL, R. et al. "Molecular cloning of the cDNA and the promoter of the hamster uteroglobin/clara cell 10-kDa gene (ug/cc10): Tissue-specific and hormonal regulation", ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, 1998, Vol. 350, N° 2, páginas 214-222. Todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

19.04.2001

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1