



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 164 609**

⑫ Número de solicitud: 200001914

⑮ Int. Cl.⁷: C12N 9/16

C12N 15/55

C12N 15/82

A01H 1/00

G01N 33/50

⑫

SOLICITUD DE ADICION A LA PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **28.07.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2002**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.02.2002

⑯ Número de solicitud de la patente principal:
200000271

⑰ Solicitante/s:
UNIVERSIDAD PUBLICA DE NAVARRA
Campus Arrosadia, s/n Otri Edif. El Sario
31006 Pamplona, Navarra, ES

⑱ Inventor/es: **Pozueta Romero, Javier;**
Baroja Fernández, Eurne;
Zanduetta Criado, Aitor y
Rodríguez López, Milagros

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal n° 200000271, sobre: "ADPglucosa pirofosfatasa vegetal, alternativamente llamada ADPglucosa fosfodiesterasa, procedimiento de obtención y su uso en la fabricación de dispositivos de ensayo".**

㉑ Resumen:
Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal n° 200000271, sobre: "ADPglucosa pirofosfatasa vegetal, alternativamente llamada ADPglucosa fosfodiesterasa, procedimiento de obtención y su uso en la fabricación de dispositivos de ensayo".
Se introducen mejoras en la patente 200000271 que consisten en nuevos pasos de cromatografía de intercambio iónico y de afinidad en el proceso de purificación de la AGPPasa. Asimismo se describen secuencias parciales de aminoácidos del enzima (SEQ ID NO: 1 a 3) y su cDNA (SEQ ID NO:9). También se describen los pasos de purificación y la caracterización de una nueva isoforma de ADPglucosa pirofosfatasa que está asociada al gránulo de almidón de las plantas. Se describen secuencias parciales de aminoácidos de esta isoforma particulada (SEQ ID NO: 4 a 6).

ES 2 164 609 A1

DESCRIPCION

Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal N° 200000271, sobre: "ADPglucosa pirofosfatasa vegetal, alternativamente llamada ADPglucosa fosfodiesterasa, procedimiento de obtención y su uso en la fabricación de dispositivos de ensayo".

Sector de la técnica al que se refiere la invención

La invención descrita en ES 200000271 se refiere al sector de la obtención, purificación y caracterización de una isoforma soluble del enzima ADPglucosa pirofosfatasa (AGPPasa), también llamada ADPglucosa fosfodiesterasa, y a las aplicaciones de este enzima en la determinación de niveles de azúcares-nucleósidos. Se ha conseguido ahora la obtención de un cDNA que codifica para la AGPPasa soluble. También se describe la purificación y caracterización de una nueva isoforma de AGPPasa asociada al gránulo de almidón de las plantas,

Estado de la técnica anterior

El almidón constituye la forma principal de almacenamiento de carbohidratos en los vegetales. Se acumula en grandes cantidades en órganos tales como semillas (trigo, cebada, maíz, guisante, etc.) y tubérculos (patata y batata entre otros), y es un constituyente fundamental de la dieta del ser humano. Por otro lado, el almidón es un polímero utilizado frecuentemente en las industrias papelera, cosmética, farmacéutica y alimentaria, y también se utiliza como componente fundamental para la fabricación de plásticos biodegradables y pinturas de bajo impacto medioambiental. Consecuentemente, el estudio de los procesos implicados en la síntesis de este polímero de glucosa constituye un tema prioritario en diversos ámbitos de la producción industrial.

El ADPglucosa (ADPG) es el precursor universal de la biosíntesis del almidón en tejidos de reserva de la planta. Su concentración en la célula resulta determinante para la cantidad y calidad del almidón producido por la planta. Las reflexiones acerca de los factores que gobiernan los niveles endógenos de ADPG en la célula vegetal han girado fundamentalmente en torno a sus enzimas sintetizadores, tales como la ADPGpirofosforilasa (AGPasa) y la Sacarosa sintasa (**Preiss, 1988**. "Biosynthesis of starch and its regulation". *The Biochemistry of Plants*. Vol. 14, Academic Press, New York, pp.182-249; **Pozueta-Romero, J., Perata, P., Akazawa, T. 1999**. "Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues". *Crit. Rev. Plant. Sci.* 18, 489-525) Sin embargo, poco se ha investigado en relación con la maquinaria responsable de la degradación de este azúcar -nucleótido (**Feingold, D.S., Avigad, G. 1980**. "Sugar transformation in plants". *The Biochemistry of Plants*. Vol. 3, Stumpf, P.K. and Conn, E.E. eds. Academic Press, New York, pp. 101-170).

Existen indicios de que tanto bacterias como mamíferos disponen de una maquinaria enzimática capaz de hidrolizar azúcares-nucleótidos tales como el ADPG (**Melo, A., Glaser, L. 1966**. "Nucleotide diphosphate hexose pyrophosphatases". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 524-

531; **Bessman, M. J., Frick, D.N., O'Handley, S.F. 1996**. "The MutT proteins or Nudix hydrolases, a family of versatile, widely distributed housecleaning enzymes", *J. Biol. Chem.* 271, 25059-25062; **Rodríguez, P., Bass, S.T., Hansen, R.G. 1968**. "A pyrophosphatase from mammalian tissues specific for derivatives of ADP". *Biochim. Biophys. Acta.* 167, 199-201; **Gasmi, L., Cartwright, J.L., McLennan, A.G. 1999**. "Cloning, expression and characterization of YSA1H, a human adenosine 5'-diphosphosugar pyrophosphatase possessing a MutT motif". *Biochem. J.* 331-337). En plantas, tal tipo de actividad no ha sido descrito en la literatura y hasta el presente se desconoce totalmente la existencia de enzimas hidrolíticas del ADPG.

En ES 200000271, sin embargo, se describe la purificación y aplicaciones de un producto enzimático de origen vegetal que denominamos AGPPasa que cataliza la hidrólisis de pequeñas moléculas con enlaces fosfodiéster entre las que destaca el ADPG por ser el sustrato preferente.

En diversas industrias, el almidón constituye un agente viscosizante y gelificante de primera necesidad. La biosíntesis del almidón en la célula vegetal a partir del ADPG tiene lugar en el compartimento subcelular denominado plástido. Tanto la síntesis como la degradación del ADPG se producen en este compartimento y por tanto el control de los niveles de almidón producido en el plástido puede tener lugar mediante el control de los procesos reguladores de los niveles de ADPG. Las diferentes aplicaciones del almidón producido en una planta están basadas en el balance de amilosa y amilopectina, el cual determina la estructura del gránulo de almidón, así como su viscosidad en suspensiones acuosas. Tal proporción de amilosa y amilopectina depende de la concentración de ADPG en la célula vegetal. No se conoce hasta el momento ningún procedimiento para regular las características del almidón producido en una planta mediante el control de la degradación de ADPG, que el enzima descrito en la presente invención, puede proporcionar.

Las técnicas cromatográficas, por último, constituyen una poderosa herramienta de determinación de niveles de azúcares-nucleósido difosfato (tales como los derivados de glucosa, ribosa, manosa, galactosa, ácido glucurónico, fructosa y ácido galacturónico) en extractos crudos de origen animal, vegetal o microbiano. Aunque de uso muy generalizado, requieren una inversión importante en equipamientos y en la preparación de las muestras problema. Lamentablemente, se hace escaso uso de posibles métodos alternativos que permitan la detección y cuantificación de azúcares-nucleótidos de una manera simple y eficaz. El análisis de los niveles en sangre, músculo o hígado de algunos de los azúcares-nucleótidos mencionados son importantes en clínica. Así por ejemplo, dado que el UDPglucosa es el precursor del glucógeno en animales, el análisis de los niveles de esta molécula puede ser importante en el estudio y el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos como por ejemplo distintos tipos de diabetes. Evidentemente, la posibilidad de analizar de manera simple y poco costosa los niveles de estas sus-

tancias en una muestra constituye una alternativa ventajosa respecto a las técnicas cromatográficas. Estos problemas que se ponían de manifiesto en el estado de la técnica fueron parcialmente resueltos en ES 200000271. Ahora, con la mejoras introducidas a la invención en la presente adición a aquella patente, se ha conseguido secuenciar parcialmente dos isoformas de AGPPasa; una soluble y otra asociada al gránulo de almidón de las plantas. Tras comparar los fragmentos secuenciados de la isoforma soluble con las secuencias disponibles en los bancos de datos, se concluye que es una proteína perteneciente al grupo de las germin-like cuya función se desconocía hasta el momento (Vallelian-Bindschedler, L., Möisinger, E., Métraux, J-P., Schweizer, P. 1998. "Structure, expression and localization of a germin-like protein in barley that is insolubilized in stressed leaves". *Plant Mol. Biol.* 37, 297-308; Hurkman, W.J., Tao, H.P., Tanaka, C.K. 1991. "Germin-like polypeptides increase in barley roots during salt stress". *Plant Physiol.* 97, 366-374). El número de acceso de la proteína germin-like de cebada disponible en el banco de dato de la EMBL es: Y15962. La amplia distribución de la AGPPasa en el reino vegetal queda demostrada tras la constatación de la existencia de secuencias nucleotídicas similares a las del gen de la AGPPasa de cebada en especies tales como arroz (número de acceso AB010876) y *Arabidopsis thaliana* (número de acceso U95034) (Carter, C., Graham, R.A., Thornburg, R.W. 1998. "Arabidopsis thaliana contains a large family of germin-like proteins: characterization of cDNA and genomic sequences encoding 12 unique family members" *Plant Mol. Biol.* 38, 929-943).

Sumario de la invención

Un objeto de las mejoras introducidas en la invención cubierta por ES 200000271 es optimizar el método de obtención de la enzima, mediante nuevas etapas de purificación de la misma. Otro objeto es caracterizar la secuencia de aminoácidos del enzima y el cDNA que codifica para ella. También se describe la purificación y caracterización de otra isoforma de AGPPasa cuya particularidad es la de estar asociada al gránulo de almidón.

Descripción detallada de la invención

Un objeto de ES 200000271 era, en primer lugar, la obtención de una isoforma soluble de AGPPasa en forma sustancialmente pura, a partir de tejidos vegetales, y su caracterización. Se ha obtenido ahora la secuencia aminoacídica de la AGPPasa soluble de cebada (*Hordeum vulgare*, cv. *Scarlett*) y se ha contrastado con las disponibles en las bases de datos, identificándose el gen que la codifica y sintetizándose un cDNA completo que codifica para la misma. También se describe ahora la purificación y caracterización de una isoforma de AGPPasa asociada al gránulo de almidón de tomate (*Lycopersicon sculentum*).

Otro objeto de la invención descrita en ES 200000271 es el procedimiento seguido para la elaboración de dispositivos o kits de determinación de azúcares-nucleósido difosfatos basados en el empleo del producto enzimático con actividad AGPPasa. Tal y como se ha explicado en el Estado de la Técnica Anterior, el UDP-

glucosa es el precursor del glucógeno en animales, de modo que sus niveles en diversos tejidos y órganos (sangre, músculo, hígado) están relacionados con las diversas situaciones, patológicas o no, del metabolismo glucídico. Por este motivo, el disponer de kits para la determinación sencilla, rápida y económica de azúcares nucleósidos presenta un notable interés para la industria de productos biomédicos, tanto de diagnóstico como de investigación en fisiología.

La obtención y purificación del producto vegetal con actividad enzimática AGPPasa objeto de ES 200000271 puede hacerse a partir de cualquier tejido vegetal de cualquier especie, como puede ser cualquier Monocotiledónea o Dicotiledónea, como por ejemplo, cebada (*Hordeum vulgare*) trigo (*Triticum aestivum*), pimienta (*Capiscum annuum*) tomate (*Lycopersicon sculentum*), patata (*Solanum tuberosum*), *Arabidopsis thaliana*, o arce (*Acer pseudoplatanus* L.) por citar sólo algunos de los innumerables ejemplos representativos de diferentes familias y géneros.

El enzima vegetal objeto de la invención descrita en ES 200000271 presenta diversas isoformas en los tejidos vegetales de los que puede obtenerse. La isoforma de extracción más sencilla es la que denominados soluble, mientras que otras isoformas, que podemos denominar particuladas, se encuentran íntimamente adheridas a los gránulos de almidón, de tal modo que para obtenerlas es preciso destruir el gránulo hidrolizando el almidón,

Obtención y purificación de una isoforma soluble de AGPPasa

El método general de obtención y purificación de la AGPPasa soluble vegetal descrito en ES 200000271 incluye los siguientes pasos, en los que pueden admitirse pequeñas variaciones que no modifiquen sustancialmente el esquema general del procedimiento de extracción y purificación, a partir de cualquier tejido vegetal:

1. Homogeneización del tejido vegetal con un tampón de extracción.
2. Filtración a través de cuatro capas de Miracloth® (tela filtrante para suero lácteo empleada en industrias queseras).
3. Ultracentrifugación del homogeneizado filtrado.
4. Precipitación en sulfato amónico de las proteínas del sobrenadante.
5. Resuspensión del precipitado en tampón de pH 4,2.
6. Calentamiento durante al menos 15 minutos a una temperatura entre 60 y 65°C.
7. Centrifugación.
8. Concentración del sobrenadante y purificación de la proteína por cromatografía de filtración en gel. La actividad enzimática de la AGPPasa se detecta mediante la detección de la producción de G1P y AMP en muestras incubadas con ADPG. Pues

bien, una de las mejoras introducidas en el método descrito en ES 200000271 consiste en la utilización adicional, en la etapa de purificación de la enzima, de una cromatografía de intercambio catiónico. Asimismo, otra de las mejoras consiste en la introducción de una nueva etapa de cromatografía en columnas de afinidad del tipo Concanavalina A.

9. Isoelectroenfoque. La posición de la AGPPasa puede determinarse fácilmente de alguna de las siguientes maneras:

- a) Elución de la proteína y posterior detección de la producción de G1P en presencia de ADPG.
- b) Incubación del gel en una solución con bis -paranitrofenilfosfato (bis-PNPP) y revelado en una solución básica según se describió por Nishimura y Beevers (Nishimura, M., Beevers, H. 1978. *Plant Physiol.* 62, 44-48).

10. Separación por electroforesis de la proteína en gel desnaturalizante en un sistema de tampones neutros o ligeramente ácidos tales como el, NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Novex, San Diego, California). La posición de la AGPPasa puede determinarse fácilmente de alguna de las siguientes maneras:

- a) Elución de la proteína y posterior detección de la producción de G1P en presencia de ADPG.
- b) Incubación del gel en una solución con bis-PNPP y revelado en una solución básica.

Obtención y purificación de una isoforma de AGPPasa adherida al gránulo de almidón

El método general de obtención y purificación de la AGPPasa particulada vegetal incluye los siguientes pasos, en los que pueden admitirse pequeñas variaciones que no modifiquen sustancialmente el esquema general del procedimiento de extracción y purificación, a partir de cualquier tejido vegetal:

- 1: Homogeneización del tejido vegetal con un tampón de extracción.
- 2: Filtración a través de cuatro capas de Miracloth®.
- 3: Centrifugación del homogeneizado filtrado a 20000 g.
- 4: Resuspensión del precipitado en un tampón con 3 % Triton X-100.
- 5: Centrifugación a 20.000 g.
- 6: Resuspensión del precipitado en un tampón con MgCl₂ 200 mM o bien con enzimas hidrolíticos del almidón tales como la α -amilasa, β -amilasa y amiloglucosidasa.

7: Concentración del sobrenadante obtenido tras centrifugación a 20000 g y purificación de la proteína por cromatografía de filtración en gel y por cromatografía de intercambio iónico. La actividad enzimática de la AGPPasa se detecta mediante la detección de la producción de G1P y AMP en muestras incubadas con ADPG.

8: Isoelectroenfoque. La posición de la AGPPasa puede determinarse fácilmente de alguna de las siguientes maneras:

- a) Elución de la proteína y posterior detección de la producción de G1P en presencia de ADPG.
- b) Incubación del gel en una solución con bis -paranitrofenilfosfato (bis-PNPP) y revelado en una solución básica según se describió por Nishimura y Beevers (Nishimura, M., Beevers, H. 1978. *Plant Physiol.* 62, 44-48).

9: Separación por electroforesis de la proteína en gel desnaturalizante en un sistema de tampones neutros o ligeramente ácidos tales como el NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Novex, San Diego, California). La posición de la AGPPasa puede determinarse fácilmente de alguna de las siguientes maneras:

- a) Elución de la proteína y posterior detección de la producción de G1P en presencia de ADPG.
- b) Incubación del gel en una solución con bis-PNPP y revelado en una solución básica.

Identificación del producto con actividad enzimática AGPPasa

El producto enzimático obtenido por los procedimientos arriba descritos, u otros equivalentes, se identifica mediante los siguientes patrones funcionales:

- Es una fosfodiesterasa (EC 3.1.4) que cataliza la hidrólisis del ADPG en cantidades equimolares de G1P y AMP.
- Además del ADPG, reconoce pequeñas moléculas que poseen enlaces fosfodiéster, tales como el UDP-glucosa, GDP-glucosa, GDP-manosa, ADP-manosa, bis-PNPP y otros de estructura similar, cuya hidrólisis tiene lugar con menor eficacia que con el ADPG.
- No hidroliza moléculas con enlaces fosfo-monoéster tales como la G1P, G6P, AMP, 3-fosfoglicerato, y otras similares. Tampoco hidroliza AMP cíclico ni ácidos nucleicos de larga cadena tales como ADN o ARN, que son substratos de otras fosfodiesterasas descritas en la literatura.
- A diferencia de pirofosfatasa de ADP-azúcares (EC 3.6.1.13, EC 3.6.1.21) descritos en bacterias y animales y a diferencia

de otras fosfodiesterasas (EC 3.1.4), sus requerimientos iónicos son reducidos, por lo que puede trabajar en ausencia de iones de Magnesio, Manganese, Cobalto, y otros cationes divalentes.

- A diferencia de las pirofosfatasa de azúcar-nucleósidos difosfatos de bacterias y animales, la AGPPasa hidroliza bis-PNPP.
- Se inhibe por moléculas fosforiladas tales como el AMP, ADP, ATP, 3-fosfoglicerato, ortofosfato, pirofosfato inorgánico, y otras de características semejantes.
- Se inhibe fuertemente por molibdato y arsenato.
- Es resistente a detergentes iónicos tales como el SDS (dodecilsulfato sódico).
- Es resistente a la acción de una amplia gama de proteasas, como Proteinasa K y Pronasa (Boehringer).
- Su actividad no se ve afectada por la acción de inhibidores típicos de fosfodiesterasas tales como el β -mercaptoetanol, EDTA, cisteína reducida, ascorbato, y otros agentes reductores y quelantes.
- Es sensible a pH ligeramente básico y es muy estable a pH entre 4 y 7,5.

Obtención de un cDNA completo que codifica para la AGPPasa soluble

Conocida la secuencia aminoacídica de la AGPPasa se contrastó con otras existentes en los bancos de datos. Ello permitió identificar el gen que codifica para la AGPPasa. El conocimiento de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la AGPPasa permitió la creación de dos cebadores específicos del gen de la AGPPasa. Haciendo uso de estos cebadores se amplificó por métodos convencionales de RT-PCR un cDNA completo que se introdujo en un plásmido pSK Bluescript (Stratagene) el cual fue amplificado en la bacteria hospedadora XL1 Blue.

Elaboración de dispositivos (kits) de ensayo para determinación de azúcares-nucleósido difosfatos

Los kits diseñados para la determinación de azúcares-nucleósido difosfatos están basados en la acción del producto con actividad AGPPasa sobre enlaces fosfodiéster de pequeñas moléculas que, tras ser hidrolizadas, dan lugar a otras moléculas de fácil detección y cuantificación.

Las dos estrategias más convenientes para la elaboración de estos kits parten de la hidrólisis del azúcar-nucleósido difosfato mediante el enzima objeto de la presente invención, esto es, AGPPasa, produciendo cantidades equimolares de azúcar-1-fosfato y del correspondiente nucleósido monofosfato. A partir de aquí puede plantearse la determinación a partir del azúcar-1-fosfato, o bien a partir del nucleósido monofosfato producidos, según se especifica a continuación:

- En el caso de que el azúcar-1-fosfato sea glucosa-1-P (G1P), se somete dicho compuesto a la acción del enzima fosfoglucomutasa rindiendo glucosa-6-fosfato, que a

su vez puede hacerse reaccionar acoplada-mente con NAD^+ por acción del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, obteniéndose 6-fosfogluconato y NADH, fácilmente determinable.

- En el caso de que el azúcar-1-fosfato no sea G1P, la determinación del azúcar-1-fosfato y del nucleósido monofosfato tiene lugar mediante determinación colorimétrica del ortofosfato (Pi) producido tras la hidrólisis de estos compuestos con fosfatasa alcalina. Alternativamente, se puede utilizar como enzima acoplador la 5'nucleotidasa la cual hidrolizará el nucleósido monofosfato en cantidades equimolares del nucleósido correspondiente y Pi. El Pi liberado en cualquiera de los dos casos resulta fácilmente cuantificable por métodos colorimétricos conocidos.

Ejemplos de realización de la invención

Se describe a continuación un ejemplo en el que se muestra detalladamente el procedimiento de obtención y purificación de la AGPPasa, en su isoforma soluble, a partir de hojas de cebada. El mismo procedimiento, con mínimas variaciones adecuadas a cada caso, puede aplicarse a cualquier otro tejido vegetal, para obtener las correspondientes isoformas solubles con la actividad enzimática descrita. Una de las mejoras introducidas en la invención descrita en ES 200000271 es la utilización de la AGPPasa para la producción de kits (dispositivos de ensayo) de determinación de azúcares-nucleótidos y la obtención de un cDNA completo que codifica para la AGPPasa soluble.

Ejemplo 1

AGPPasa soluble obtenida a partir de hojas de cebada

Extracción y purificación de la AGPPasa

Todos los pasos se desarrollaron a 4°C, a no ser que se indique otra cosa. El tejido vegetal (200 g) se homogeneizó con 600 mL de tampón de extracción (Mes 50 mM pH 6, EDTA 1 mM, DTT 2 mM) empleando un Waring Blender. El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de Miracloth, se centrifugó a 100.000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se ajustó al 50 % de sulfato amónico. El precipitado obtenido tras 30 minutos de centrifugación a 30.000 g (20°C) fue resuspendido en 560 mL de Mes 50 mM pH 4,2, luego calentado en baño de agua a 62°C durante 20 minutos, enfriado en hielo, y centrifugado a 30.000 g durante 20 minutos. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron mediante sulfato amónico 50 %, y se resuspendieron en 5,7 mL de Mes 50 mM pH 6. La muestra se sometió a continuación a filtración en gel en columna Superdex 200 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) preequilibrada con Mes pH 6 y NaCl 150 mM. La elución se efectuó con el mismo tampón. La mejora opcional consiste en una purificación posterior en columna de intercambio catiónico tipo Mono S HR 5/5 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) y columna de afinidad tipo Con A Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Las fracciones con actividad AGPPasa se juntaron y concentraron. Las proteínas se separaron electroforéticamente

en un sistema de geles NuPAGE 4-12 % Bis-Tris (Novex, San Diego, California).

Ejemplo 2

AGPPasa particulada obtenida a partir de pericarpo de frutos de tomate

Extracción y purificación de la AGPPasa

Todos los pasos se desarrollaron a 4°C, a no ser que se indique otra cosa. El tejido vegetal (30 Kg) se homogeneizó con 30 L de tampón de extracción (HEPES 50 mM pH 7, EDTA 1 mM, DTT 2 mM) empleando un Waring Blender. El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de Miracloth, se centrifugó a 20.000 g durante 30 min. El precipitado se resuspendió en 1.5 L de tampón de extracción con 3 % de Triton X-100. La suspensión se centrifugó a 20.000 g durante 30 min tras lo cual el sedimento se resuspendió en 0,54 L de tampón de extracción con MgCl₂ (200 mM) o bien con α -amilasa (100 unidades/mL), β -amilasa (100 unidades/mL) y amiloglucosidasa (15 unidades/mL). Tras una hora de agitación, la suspensión se centrifugó durante media hora a 20.000 g y el sobrenadante se dializó frente a HEPES 10 mM pH 7, y MgCl₂ 10 mM. La muestra dializada se liofilizó y se resuspendió con agua a un volumen final de 60 mL. La muestra se sometió a continuación a filtración en gel en columna Superdex 200 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) preequilibrada con HEPES pH 7 y NaCl 150 mM. La elución se efectuó con el mismo tampón. Las fracciones que mostraban actividad AGPPasa fueron sometidas a un posterior paso de purificación en columna de intercambio aniónico tipo Mono Q (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Las fracciones con actividad AGPPasa se juntaron y concentraron. Las proteínas se separaron electroforéticamente en un sistema de geles NuPAGE 4-12 % Bis-Tris (Novex, San Diego, California).

Ensayos enzimáticos

A no ser que se indique otra cosa, todas las reacciones enzimáticas se desarrollaron a 37°C. Las determinaciones de actividades AGPPasa se realizaron utilizando la determinación espectrofotométrica de G1P en dos pasos descrita por Sowokinos (1981) (Sowokinos, 1981, *Plant Physiol.* 68, 924-929). La mezcla de reacción contenía Hepes 50 mM pH 7, la cantidad especificada de ADPG y el extracto proteico en un volumen total de 50 microlitros. Todos los ensayos se realizaron frente a blanco de ADPG. Tras 20 minutos de incubación, la reacción se detenía mediante ebullición en baño seco durante 2 minutos. La mezcla se centrifugaba a 20.000 g durante 5 minutos y se recuperaba el sobrenadante. En el segundo paso, se determinaba G1P espectrofotométricamente en 300 microlitros de mezcla conteniendo Hepes 50 mM pH 7, EDTA 1 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 15 mM, NAD⁺ 0,6 mM, una unidad de fosfoglucomutasa y otra de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*, y 30 microlitros del sobrenadante resultante del paso uno. Tras 20 minutos de incubación, la producción de NADH se monitorizó a 340 nm utilizando un espectrofotómetro Multiskan EX (Labsystems). Fue despreciable la cantidad de NADH producida por cualquier extracto proteico en ausencia de ADPG en el paso uno.

La masa molecular nativa de L a AGPPasa se

determinó mediante filtración en gel, por medio de una representación del coeficiente de partición (Kav) frente al logaritmo de la masa molecular de las siguientes proteínas patrones: tiroglobulina bovina (670 kDa), gamma-globulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), mioglobina (17 kDa) y vitamina B-12 (1,3 kDa). El contenido en proteína se determinó por el método de Bradford utilizando el reactivo preparado por Bio-Rad y gamma-globulina como patrón.

Las tabla 1 y 2 presentadas a continuación reflejan la purificación de la AGPPasa soluble a partir de hojas de cebada y la AGPPasa particulada a partir de pericarpo de tomate, respectivamente. La unidad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 μ mol de producto por minuto.

TABLA 1

	Volu- men total (ml)	Pro- teína total (mg)	Acti- vidad total (mU)	Activi- dad es- pecífica (mU/mg proteína)	Puri- fica- ción (fac- tor)	Ren- di- mien- to (%)
Extracto crudo	560	5107,8	105000	20,6	-	100
Sobrena- dante 100000 x g	520	3436,7	100500	29,2	1,4	95,7
Sulfato amónico 50 %	520	748,6	97500	130,2	6,3	92,8
PH 4,2 / 62°C	520	24,9	90500	3634	176,4	86,2
Sulfato amónico 50 %	5,7	8,1	47300	5839	283,4	45,0
Superdex 200	1,7	1,3	30200	23230	1127,6	28,7
NuPAGE- SDS Electro- foresis	1,7	0,026	30000	1161500	56350	28

TABLA 2

	Volu- men total (L)	Pro- teína total (mg)	Acti- vidad total (mU)	Activi- dad es- pecífica (mU/mg proteína)	Puri- fica- ción (fac- tor)	Ren- di- mien- to (%)
Extracto crudo	45	6000	51000	2,8	1	100
Sedimento 20000 x g	1,5	1860	36000	19,3	6,9	70
Sedimento Triton	0,54	1680	36000	21,4	7,6	70
Sobrenad. MgCl ₂	0,54	750	30000	40	14,2	58
Superdex 200	0,13	36	8100	225	80,3	16
Mono-Q	0,057	1,5	100	66	23,6	0,2

Identificación del producto con actividad enzimática obtenido

El producto con actividad AGPPasa así obtenido cumple las siguientes características:

- Tanto la AGPPasa soluble como la particulada son fosfodiesterasas que catalizan la hidrólisis del ADPG produciendo cantidades equimolares de G1P y AMP.
- Además del ADPG, ambas isoenzimas reconocen otras moléculas de pequeño tamaño que poseen enlaces fosfodiéster, tales como el UDP-glucosa, GDP-glucosa, bis-PNPP y otros de estructura similar,
- No hidrolizan moléculas con enlaces fosfo-monoéster tales como la G1P, G6P, AMP, 3-fosfoglicerato, y otras similares. Tampoco hidrolizan AMP cíclico ni ácidos nucleicos tales como ADN y ARN, que son sustratos de otras fosfodiesterasas descritas en la literatura.
- Sus requerimientos iónicos son reducidos, por lo que pueden trabajar en ausencia de iones de Magnesio, Manganeso, Cobalto, y otros cationes divalentes, que son efectores fundamentales para el funcionamiento de otras fosfodiesterasas descritas en la literatura.
- A diferencia de las pirofosfatasa de azúcar-nucleósidos difosfatos de bacterias y animales, ambas isoformas de AGPPasa hidrolizan bis-PNPP.
- Se inhiben por moléculas fosforiladas tales como el AMP, ADP, ATP, 3-fosfoglicerato, ortofosfato, pirofosfato inorgánico, y otras de características semejantes.
- Se inhiben fuertemente por molibdato y arsenato.
- Son resistentes a detergentes iónicos tales como el SDS (dodecilsulfato sódico).
- Son resistentes a la acción de una amplia gama de proteasas, como Proteinasa K y Pronasa (Boehringer).
- Su actividad no se ve afectada por la acción de inhibidores típicos de fosfodiesterasas tales como el β -mercaptoetanol, EDTA, cisteína reducida, ascorbato, y otros agentes reductores y quelantes.
- Son sensible a pH ligeramente básico y son muy estables a pH entre 4 y 7, S. Esta característica es una de las que convierten a ambas isoformas de AGPPasa en enzimas totalmente diferentes a la mayoría de las fosfodiesterasas descritas en la literatura, dado que éstas últimas son estables y activas en pHs ligeramente básicos.
- Constante de Michaelis-Menten (K_m) para ADP-glucosa, de 0,5 mMolar, la cual es unas cuatro a cinco veces inferior a la

K_m correspondiente a otros sustratos azúcares-nucleótidos como por ejemplo ADP-ribosa, UDP-glucosa o similares.

Algunas de las características particulares de la AGPPasa soluble son:

- La AGPPasa soluble es resistente a una temperatura de 65°C durante 30 minutos, y puede ser caracterizada por los siguientes datos:
- Peso molecular aparente medido por filtración en gel, en torno a 35-55 kDa.
- K_{eq} de la reacción de 110.
- Incremento de Energía Libre estándar ($\Delta G'$) de -2,9 kcal/mol.
- En la presente adición a ES 200000271, la caracterización de la secuencia de aminoácidos nos permite conocer otra serie de características, como son:
- Es una glicoproteína.
- Peso molecular aparente de la proteína purificada en geles desnaturizantes, en torno a 20 kDa.
- Las secuencias aminoacídicas obtenidas mediante la degradación de Edman son:
 - Extremo N-terminal: SEQ ID NO: 1
 - Secuencias internas (obtenidas tras la hidrólisis parcial de la AGPPasa con tripsina): SEQ ID NO: 2 y 3

Algunas de las características particulares de la AGPPasa particulada son:

- Peso molecular medido por filtración en gel en torno a 400-500 kDa.
- Peso molecular aparente en gel. desnaturizante de los péptidos que componen la AGPPasa particulada: 40 kDa (péptido 1), 45 kDa (péptido 2) y 70 kDa (péptido 3).
- Las secuencias aminoacídicas obtenidas mediante la degradación de Edman son:
 - Extremo N-terminal:
 - Péptido 1: SEQ ID NO: 4
 - Péptido 2: SEQ ID NO: 5
 - Péptido S: SEQ ID NO: 6

Ejemplo 3

Obtención de un cDNA completo que codifica para la AGPPasa soluble

El conocimiento de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la AGPPasa de cebada permitió la creación de dos cebadores específicos del gen de la AGPPasa cuyas secuencias son, en sentido 5'- 3', SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. Haciendo uso de estos cebadores se amplificó por métodos convencionales de RT-PCR, un cDNA completo que se introdujo en un plásmido pSK Bluescript (Stratagene) el cual fue amplificado en

la bacteria hospedadora XL1 Blue. El peso molecular del péptido deducido del cDNA es de 19.5 kDa. La secuencia del cDNA es SEQ ID NO: 9.

Ejemplo 4

Productos con actividad AGPPasa a partir de diversos vegetales

El enzima AGPPasa muestra una muy amplia difusión entre los vegetales, de modo que el producto enzimático con actividad AGPPasa puede ser obtenido a partir de cualquier vegetal. Como ejemplo, se presenta la siguiente tabla II con las actividades específicas (mU/mg proteína) obtenidas en varias Monocotiledóneas y Dicotiledóneas.

TABLA II

	Actividad específica (mU/mg proteína)
	(+ADPG)
<i>Monocotiledóneas</i>	
Hoja de cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	113,7 ± 3,5
Hoja de trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	22,4 ± 2,5
<i>Dicotiledóneas</i>	
Hoja de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Wt)	5,2 ± 0,6
Hoja de pimiento (<i>Capsicum annuum</i>)	5,0 ± 0,6
Hoja de tomate (<i>Lycopersicon sculentum</i>)	5,6 ± 0,5
Cultivo celular de arce (<i>Acer pseudoplatanus</i>)	16,5 ± 7,2

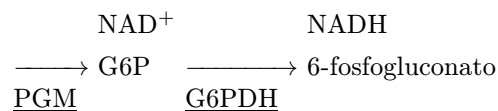
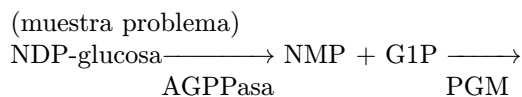
Ejemplo 5

Elaboración de kits enzimáticos de determinación de glucosa-nucleósido difosfatos

Para la determinación de glucosa-nucleósido difosfatos tales como ADPG, UDP-glucosa, CDP-glucosa, GDP-glucosa y TMP-glucosa, se elabora un kit que contiene los siguientes elementos:

- AGPPasa
- NAD
- Fosfoglucomutasa (PGM)
- G6P deshidrogenasa (G6PDH)
- Tampón

La determinación de la cantidad de glucosa-nucleósido difosfato presente en la muestra problema se basa en la determinación espectrofotométrica del NADH producido según la siguiente reacción acoplada:



La determinación de la cantidad de NDP-glucosa en una muestra problema tendría lugar mediante la elaboración de un cocktail cuya composición sería (para 1 ml):

- Muestra problema
- 1 U de AGPPasa
- 1 U de PGM
- 1 U de G6PDH
- 0.6 mM NAD
- Tampón Mes o Hepes 50 mM pH 7
- Agua (hasta completar 1 ml)

Se incuba a 37°C durante 20 minutos y se observa la variación de absorbancia de la muestra a 340 nm. Como control negativo se puede utilizar un cocktail en el que falte la AGPPasa.

Ejemplo 6

Elaboración de kits enzimáticos de determinación de nucleósido difosfatos de azúcares distintos a glucosa

Se preparan kits de determinación de los siguientes azúcares-nucleósido difosfatos:

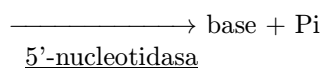
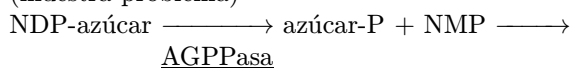
- ribosa-nucleósido difosfatos (ADP-ribosa, GDP-ribosa, UDP-ribosa, CDP- ribosa o TDP-ribosa)
- manosa-nucleósido difosfatos (ADP-manosa, GDP-manosa, TDP-manosa, UDP-manosa o CDP-manosa)
- galactosa-nucleósido difosfatos (ADP-galactosa, GDP-galactosa, UDP-galactosa o CDP-galactosa)
- glucurónico-nucleósido difosfatos (GDP-glucurónico, UDP-glucurónico, ADP-glucurónico, CDP-glucurónico o TDP-glucurónico)
- fructosa-nucleósido difosfatos (GDP-fructosa, ADP-fructosa, CDP-fructosa, UDP-fructosa, TDP-fructosa)
- galacturónico-nucleósido difosfatos (UDP-galacturónico, GDP-galacturónico, CDP-galacturónico, TDP-galacturónico o ADP-galacturónico)

En el kit intervienen los siguientes elementos:

- AGPPasa
- 5'-nucleotidasa (o, alternativamente, fosfatasa alcalina)
- tampón

La determinación de la cantidad de azúcar-nucleósido difosfato presente en La muestra problema se basa en la determinación colorimétrica del ortofosfato liberado según la siguiente reacción enzimática acoplada:

(muestra problema)



La determinación del Pi tiene Lugar según cualquiera de los múltiples métodos colorimétricos disponibles en la bibliografía y en el mercado.

La determinación de la cantidad de NDP-azúcar en una muestra problema tendría lugar mediante la elaboración de un cocktail (1 ml) compuesto por:

■ Muestra problema

■ 1 U de AGPPasa

■ 1 U de 5'-nucleotidasa (o, alternativamente, 1 U de fosfatasa alcalina)

■ Tampón Mes o Hepes 50 mM pH 7.5

■ Agua (hasta completar 1 ml).

Se incuba a 37°C durante 20 minutos y se determina la producción del Pi liberado según técnicas convencionales. Como control negativo se puede utilizar un cocktail en el que falte la AGPPasa.

REIVINDICACIONES

1. Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal N°. 200000271 sobre: "ADPglucosa pirofosfatasa vegetal, alternativamente llamada ADPglucosa fosfodiesterasa, procedimiento de obtención y su uso en la fabricación de dispositivos de ensayo"; **caracterizadas** por comprender dos isoformas del enzima, una soluble y otra asociada a los gránulos de almidón existentes en vegetales.

2. Mejoras según la reivindicación 1 **caracterizadas** porque la isoforma soluble contiene en su secuencia al menos uno de los fragmentos polipeptídicos representados en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

3. Mejoras según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizadas** por obtenerse un cDNA completo, representado por SEQ ID NO 9, mediante de dos cebadores obtenidos a su vez a partir de las regiones 5' y 3', representados por SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 respectivamente, del gen que codifica para la AGPPasa.

4. Mejoras según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque la isoforma asociada al almidón presenta un peso molecular nativo determinado por filtración en gel de 400-500 kDa, y tiene una K_m para ADPG en torno a 0,5 mM.

5. Mejoras según las reivindicaciones 1 y 4 **caracterizadas** porque la isoforma asociada a almidón contiene en su secuencia al menos uno de los fragmentos polipeptídicos representados en SEQ ID NO 4, SEQ ID NO: 5 y/o SEQ ID NO: 6.

6. Mejoras según las reivindicaciones 1, 4 y 5 **caracterizadas** porque la isoforma asociada a almidón se aísla mediante un procedimiento de obtención **caracterizado** por someter al material de origen vegetal a una extracción de la fracción proteica por un tampón, seguido de sucesivas centrifugaciones y precipitaciones, con ajustes tanto del pH como de la fuerza iónica del medio, isoelectroenfoque, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y electroforesis en gel desnaturante u otros medios equivalentes de purificación de proteínas extraídas a partir de tejidos vegetales.

7. Mejoras según La reivindicación 6 que comprende los siguientes pasos: (1) homogeneización del tejido vegetal con un tampón de extracción, por ejemplo HEPES 50 mM pH 7, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, (2) filtración a través de 4 capas de Miracloth, (3) centrifugación a 20.000 g, (4) resuspensión del sedimento en tampón de extracción con 3% Triton X-100, (5) centrifugación a 20.000 g, (6) tratamiento con 200 mM $MgCl_2$ o con enzimas hidrolíticas de almidón, (7) centrifugación a 20.000 g, (8) concentración de las proteínas, (9) purificación por cromatografía de filtración en gel, intercambio iónico, isoelectroenfoque y electroforesis en gel desnaturante.

8. Mejoras según las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizadas** por el uso de ambas o cualquiera de las isoformas en la elaboración de dispositivos de ensayo enzimático para determinar nucleósidos difosfatos de azúcares.

ES 2 164 609 A1

<110> UNIVERSIDAD DE NAVARRA

<120> Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal N° 200000271, sobre: "ADPglucosa pirofosfatasa vegetal, alternativamente llamada ADPglucosa fosfodiesterasa, procedimiento de obtención y su uso en la fabricación de dispositivos de ensayo"

<130> P-99450

<160> 9

<210> 1

<211> 20

<212> Péptido

<213> Hordeum vulgare cv. Scarlett

<220>

<223> Extremo N-terminal de AGPPasa soluble

<400>

Leu	Thr	Gln	Asp	Phe	Cys	Val	Ala	Asp	Leu	Thr	Cys	Ser	Asp	Thr
				5					10					15
Pro	Ala	Gly	Tyr	Pro										
				20										

<210> 2

<211> 5

<212> Péptido

<213> Hordeum vulgare cv. Scarlett

<220>

<223> Secuencia triptica de AGPPasa soluble

<400>

Lys	Thr	Leu	Tyr	Lys
				5

<210> 3

<211> 8

<212> Péptido

<213> Hordeum vulgare cv. Scarlett

<220>

<223> Secuencia triptica de AGPPasa soluble

<400>

Lys	Ser	Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly
				5			

<210> 4

<211> 30

<212> Péptido

<213> Lycopersicon sculentum

<220>

<223> Fragmento del extremo N-terminal obtenido mediante degradación de Edman de la AGPPasa particulada

ES 2 164 609 A1

<400>

Lys	Cys	Leu	Glu	Gln	Cys	Phe	Cys	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Asp	Asp	Gly
				5				10						15
Ser	Lys	Asp	Asp	Tyr	Lys	Asp	Ile	Gln	Ala	Ser	Gly	Ala	Tyr	Val
				20				25						30

<210> 5

<211> 20

<212> Péptido

<213> Lycopersicon sculentum

<220>

<223> Fragmento del extremo N-terminal obtenido mediante degradación de Edman de la AGPPasa particulada

<400>

Lys	Val	Glu	Val	Cys	Glu	Ile	Asn	Leu	Lys	Leu	Leu	Tyr	Cys	Ala
				5				10						15
Asn	Gly	Ala	Lys	Phe										
				20										

<210> 6

<211> 20

<212> Péptido

<213> Lycopersicon sculentum

<220>

<223> Fragmento del extremo N-terminal obtenido mediante degradación de Edman de la AGPPasa particulada

<400>

Lys	Tyr	Met	Val	Tyr	Cys	Thr	Ser	Gln	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	Lys
				5				10						15
Leu	Asn	Val	His	Leu										
				20										

<210> 7

<211> 30

<212> ADN

<213> Hordeum vulgare cv. Scarlett

<220>

<223> Cebador de la región 5' de la AGPPasa soluble

<400>

gccatggccaacgcaatgttgctccctgtc 30

<210> 8

<211> 24

<212> ADN

<213> Hordeum vulgare cv. Scarlett

<220>

<223> Cebador de la región 3' de la AGPPasa soluble

ES 2 164 609 A1

<400>

ccgacacgctgacaccacgacgacc 24

<210> 9

<211> 233

<212> ADN

<213> Hordeum vulgare cv. Scarlett

<220>

<223> cDNA soluble

<400>

```

gta gca agc cat ggc caa cgc aat gtt gct 30
ccc tgt cct cat ctc ctt cct cgt cct gcc 60
ctt ctc cgc cat ggc cct gac cca gga ctt 90
ctg cgt cgc cga cct gtc ctg cag cga cac 120
gcc ggc ggg gta ccc gtg caa gac cgg cgt 150
cgg cgc ggg gga ctt cta cta cca cgg tct 180
cgc cgc cgc ggg caa cac cag caa cct cat 210
caa ggc ggt cgt aac ccc ggc ctt cgt cgg 240
cca gtt ccc cgg cgt gaa cgg gct cgg cat 270
ctc cgc ggc gag gct cga cat cgc cgt ggg 300
cgg cgt cgt gcc gat gca cac cca ccc ggc 330
cgc ctc tga gct cct ctt cgt cac cga ggg 360
cac cat ctt ggc ggg ctt cat cag ctc ctc 390
ctc caa cac cgt gta cac caa gac gct cta 420
caa ggg cga cat cat ggt gtt ccc cca ggg 450
cct gct cca cta cca gta caa cgg tgg cag 480
ctc cgc ggc ggt agc gct cgt tgc gtt cag 510
cgg ccc caa ccc agg cct cca gat cac tga 540
cta cgc gct ctt cgc caa caa cct gcc atc 570
cgc cgt cgt tga gaa ggt cac ctt ctt gga 600
cga cgc gca ggt gaa gaa gct caa gtc cgt 630
gct cgg cgg cag cgg cta att aag cag ttc 660
tca gca aag gtc gtc gtg gtg tca gcg tgt 690
cgg 693

```



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 164 609
⑫ N.º solicitud: 200001914
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 28.07.2000
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C12N 9/16, 15/55, 15/82, A01H 1/00, G01N 33/50

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VALLELIAN-BINDSSCHEDLER, L. et al. Structure, expression and localization of a germin-like protein in barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.) that is insolubilized in stressed leaves. 1998, Plant. Mol. Biol., 37:297-308. Citado en la solicitud.	1-7, 10-12, 19-23
X	RODRIGUEZ-LOPEZ, M. et al. Adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase: a plastidial phosphodiesterase that prevents starch biosynthesis. 2000, Proc. Natl. Acad. Sci., 97, 8705-8710. Citado en la solicitud.	13-18
A	EP 485044 A2 (INSTITUT FUR GENBIOLOGISCHE FORSSCHUNG BERLIN GMBH) 13.05.1992, todo el documento.	30-36
A	VAN DIJK, WILLEM et al. A universal and rapid spectrophometric assay of CMP-siatic acid hidrolase and nucleoside-diphosphosugar pyrophosphatase activities and detection in polyacrylamide gels. 1981, Anal. Biochem. 117 (2), 346-53.	13-18,26
A	PUHAKAINEN, E. et al. UDP glucuronic acid pyrophosphatase assay with the aid of alkaline phosphatase. 1977, Acta Chem. Scand., Ser. B, B31(2), 125-9.	13-18,26
A	JP 52-061286 A (JAPAN MONOPOLY CORP.) 20.05.1977 (resumen) World Patents Index [en línea]. Londres (Reino Unido): Derwent Publications Ltd. [recuperado en día 10.05.2001]. Recuperado de: EPOQUE, EPO, DW 197726, N° de acceso 1977-46195Y.	8-9, 24-25, 37-38

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

02.01.2002

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1