



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 199 050**

⑫ Número de solicitud: 200200686

⑬ Int. Cl.⁷: C12N 15/29

C07K 14/415

G01N 33/68

A61K 39/36

A61P 37/08

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **22.03.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2004**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.02.2004

⑰ Solicitante/s: **UNIVERSIDAD COMPLETENSE
DE MADRID**
Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Rodríguez García, Rosalía y
Villalba Díaz, María Teresa**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Producción del alérgeno recombinante de "*Chenopodium album*" Che a 1, y sistema de aislamiento y purificación.**

㉑ Resumen:

Producción del alérgeno recombinante de "*Chenopodium album*" Che a 1, y sistema de aislamiento y purificación.

La invención consiste en la producción de la proteína Che a 1, mediante tecnología recombinante en la levadura "*Pichia pastoris*", que implica el uso de la secuencia nucleotídica caracterizada por SEQ ID NO:1 ó de otras secuencias nucleotídicas obtenidas por mutagénesis de la secuencia SEQ ID NO: 1. Para ello se ha aislado a partir de polen de "*Chenopodium album*", purificado y caracterizado un alérgeno principal que es reconocido por más del 60 % de los pacientes alérgicos a esta fuente biológica. Asimismo se ha clonado y expresado el DNA recombinante que codifica el alérgeno Che a 1 de polen de ceñigo (*Chenopodium album*). Este alérgeno tiene homología con proteínas de abedul y ballico. La proteína recombinante producida en la levadura (*Pichia pastoris*) se aísla con gran rendimiento, está correctamente plegada y exhibe propiedades inmunológicas equivalentes a las del alérgeno natural por lo que tanto ella como las proteínas homólogas, las formas modificadas derivadas de ellas, los fragmentos derivados que contengan al menos un epítipo alérgénico, pueden ser empleadas en protocolos de diagnóstico e inmunoterapia.

ES 2 199 050 A1

DESCRIPCION

Producción del alérgeno recombinante de "*Chenopodium album*" Che a 1, y sistema de aislamiento y purificación.

Objeto de la invención

La presente invención, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, se refiere a uno de los alérgenos del polen de ceñigo (*Chenopodium album*), la proteína Che a 1, y a epítomos alérgénicos presentes en la proteína. La invención también hace referencia a los DNAs recombinantes que codifican tanto proteínas completas como fragmentos que incluyen al menos un epítomo de la molécula, así como moléculas homólogas de Che a 1 con capacidad alérgica en otras especies relacionadas y no relacionadas. En concreto el objeto de la invención consiste en la producción de la proteína Che a 1, mediante tecnología recombinante en la levadura *Pichia pastoris*, que implica el uso de la secuencia nucleotídica caracterizada por SEQ ID NO:1 ó de otras secuencias nucleotídicas obtenidas por mutagénesis de la secuencia SEQ ID NO: 1.

La invención proporciona también un eficaz método de aislamiento tanto para el alérgeno recombinante como para el natural.

Estado de la técnica

La alergia tipo I es una enfermedad que afecta a más del 20 % de la población de los países industrializados. Esta afección es ocasionada por los alérgenos, presentes tanto en organismos y productos biológicos -alimentos, ácaros, venenos de insectos, pólenes, hongos, epitelios de mamíferos-, como en materiales de síntesis. En la mayor parte de las fuentes biológicas alérgicas, los alérgenos son proteínas de masas moleculares comprendidas entre 5 y 70 kDa. Los síntomas que se derivan de la alergia, tales como rinitis, conjuntivitis, o asma, son provocados por la liberación de mediadores celulares, como la histamina, desde basófilos y mastocitos, células del sistema inmune. Dicha liberación viene inducida por el entrecruzamiento de anticuerpos IgEs unidos a los receptores de alta afinidad FcεRI, los cuales se encuentran a su vez anclados a basófilos y mastocitos. El entrecruzamiento de las IgE es provocado por la unión del correspondiente alérgeno, o un fragmento suyo, a través de un epítomo IgE (contenido en dicho alérgeno, o en su fragmento). La terapia que actualmente se viene utilizando para tratar la alergia implica la hiposensibilización del paciente mediante la administración por vía parental u oral de dosis adecuadas del propio alérgeno, o alérgoides relacionados. En la práctica totalidad de los casos se administra un extracto alérgico obtenido, mediante una mínima manipulación de la fuente biológica natural, lo que implica a una mezcla muy compleja de proteínas y otras sustancias, en la cual, el alérgeno -o alérgenos- puede representar una parte ínfima del producto total utilizado.

En efecto, en la actualidad, los protocolos utilizados para la diagnosis de casos de alergia y su posterior inmunoterapia implican el uso de extractos alérgicos que frecuentemente no están caracterizados, ni siquiera estandarizados respecto a los alérgenos más importantes que pue-

den contener. A menudo, su administración no proporciona una diagnosis completa, sobre todo cuando la hipersensibilidad del paciente se refiere a alérgenos presentes en baja concentración en dichos extractos. Por otro lado, la inmunoterapia realizada con estas preparaciones es frecuentemente ineficaz y origina en ocasiones efectos secundarios indeseables que pueden llegar a ser más graves que la propia afección alérgica que se pretende resolver. Una alternativa a la utilización de estos extractos es la preparación de mezclas de los alérgenos más significativos, obtenidos por aislamiento de su fuente natural. Sin embargo, esta vía presenta dos importantes barreras. Por un lado, implica un buen conocimiento de los componentes alérgicos del material que provoca la alergia, al menos de todos sus alérgenos principales, y este dato, frecuentemente, no está disponible. Por otro lado, el proceso de aislamiento de los alérgenos conocidos, a partir del material biológico, es a menudo difícil y no proporciona las cantidades necesarias o la calidad requerida para un posterior empleo, debido fundamentalmente a los bajos niveles en los cuales se encuentra. Todos estos problemas se acentúan cuando el material alérgico es el polen de una especie vegetal. La gran cantidad de pigmentos, carbohidratos, lípidos y componentes insolubles hacen muy difícil su manipulación. Ni que decir tiene que su disponibilidad es, además, muy reducida y de alto coste económico, debido a la dificultad de su recolección. Por todo lo expuesto, se hace necesario el diseño de procedimientos para la producción de alérgenos a utilizar en los protocolos de diagnosis e inmunoterapia de la alergia. La producción de DNA recombinante se prevé como la forma más reproducible y eficaz de obtención de polipéptidos alérgicos bien definidos, no sólo para uso clínico, sino incluso para investigación.

La polinosis a ceñigo está adquiriendo una cierta relevancia como responsable en la inducción de alergia en países del área mediterránea y zonas desérticas, donde este arbusto está ampliamente extendido (Galán C. et al (1989) Ann. Allergy 63, 435-437; Subiza J. et al (1998) Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clin. 13, 45-58; Suliman FA et al (1997) Ann. Allergy Asthma Immunol. 78, 415-418). En la actualidad, poco se conoce acerca de las moléculas alérgicas en esta fuente biológica, siendo este alérgeno el primero que se caracteriza.

Explicación de la invención

Producción del alérgeno recombinante de *Chenopodium album* Che a 1 en la levadura *Pichia pastoris*, y sistema de aislamiento y purificación.

La presente invención se refiere al método de aislamiento utilizado para la purificación del alérgeno Che a 1 -un alérgeno del polen de ceñigo de creciente importancia clínica, con una prevalencia del 60 % de los pacientes alérgicos al polen de ceñigo- a partir del polen de ceñigo (*Chenopodium album*). Más específicamente comprende la obtención, mediante clonación, de moléculas de DNA recombinante que codifican polipéptidos con las mismas o similares propiedades antigénicas que el alérgeno procedente del polen de *Chenopodium*, o bien polipéptidos que posean al menos un epítomo, antigénico o alérgico, del alérgeno Che a 1. La invención incluye también la

secuencia completa del cDNA del alérgeno Che a 1 y la secuencia completa deducida del alérgeno.

El procedimiento objeto de la invención, permite llevar a cabo la purificación del alérgeno Che a 1 del polen de ceñigo a partir de un extracto proteico de polen mediante una cromatografía de penetrabilidad y HPLC, según se describe detalladamente más adelante.

De esta forma, se obtienen moléculas de DNA recombinante que codifican polipéptidos que exhiben la antigenicidad de Che a 1, así como polipéptidos que contienen, al menos, un epítipo de Che a 1 en su estructura. La invención dispone de secuencias polinucleotídicas de DNA que hibridan, en condiciones restrictivas, con las descritas antes -lo que implica un nivel de identidad de al menos un 60 % entre sus secuencias de nucleótidos-, o bien son derivadas de ellas por degeneración del código genético o mutagénesis.

El procedimiento de clonación del alérgeno recombinante de *Chenopodium album* Che a 1, incluye vectores de clonación y células huésped que contienen una secuencia de nucleótidos como la descrita en SEQ ID NO: 1, codificante de Che a 1, proteínas homólogas o fragmentos suyos.

Por lo tanto se obtienen fragmentos nucleotídicos que poseen, al menos, una secuencia que codifica un determinante antigénico del alérgeno Che a 1 de ceñigo o de fragmentos suyos, así como de alérgenos homólogos de Che a 1, principalmente en especies relacionadas con el ceñigo que, dada la similitud estructural, presentan reactividad alérgica cruzada con Che a 1 o con una parte de él. Entre las especies relacionadas con el ceñigo se encuentran: *Betula verrucosa* (abedul) y *Lolium perenne* (ballico) con una similitud de 70 % y 51 %, respectivamente.

Estos polipéptidos pueden contener la secuencia antigénica unida a otros polipéptidos (por ejemplo como proteínas de fusión), haber sido sintetizados químicamente o haber sido obtenidos mediante digestiones proteolíticas y modificados química o enzimáticamente.

La inserción de dicha secuencia en vectores de expresión en organismos hospedadores eucarióticos permite disponer de construcciones recombinantes que pueden utilizarse para la producción del alérgeno recombinante.

Una vez producida la molécula polipeptídica con actividad antigénica de Che a 1 o epítopos B y T suyos, ésta es aislada del medio rico extracelular del cultivo en forma soluble mediante cromatografía de intercambio amónico, penetrabilidad y HPLC o del medio mínimo mediante cromatografía de penetrabilidad y HPLC.

Los productos recombinantes obtenidos mediante el procedimiento objeto de la invención presentan la capacidad de unión de anticuerpos IgE del suero de pacientes alérgicos a ceñigo, sensibles a Che a 1.

Finalmente, con el procedimiento objeto de la invención, se dispone de Che a 1 inmunológicamente activo, además de fragmentos antigénicos y alérgicos de este alérgeno, y de proteínas homólogas de él, que sirven para ser incorporados en las pruebas "in vivo" e "in vitro" a realizar para la fiel diagnosis de la hipersensibilidad a este polen, y a otros pólenes relacionados filogenéticamente

con él. También podrán ser empleados en las preparaciones de alérgenos que se utilicen para llevar a cabo la inmunoterapia correspondiente para el tratamiento de la alergia al polen de ceñigo.

Para el diagnóstico y la terapia de la alergia al polen de ceñigo se utilizan actualmente extractos proteicos obtenidos a partir del polen. Esto implica una escasa reproducibilidad y un alto contenido en moléculas contaminantes, de origen proteico y no proteico, que pueden originar efectos secundarios adversos en los pacientes tratados. El disponer de moléculas homogéneas obtenidas por las técnicas del DNA recombinante, en cantidades ilimitadas, perfectamente cuantificables y estandarizadas, rebajaría considerablemente todos los inconvenientes citados. Esta tecnología permite disponer de esas moléculas y, además, de péptidos o formas modificadas de las mismas que contienen al menos uno de los epítopos alérgicos.

Modo de realización de la invención

La presente invención se refiere a un DNA recombinante que codifica epítopos del alérgeno de *Chenopodium album* Che a 1, a la producción recombinante, en la levadura *Pichia pastoris*, de los polipéptidos codificados por dicho DNA y al aislamiento del alérgeno natural procedente del polen de reñigo. También se refiere a la aplicación de ambas moléculas en el diagnóstico y terapia de este desorden inmunológico.

En el procedimiento de clonación del alérgeno recombinante de *Chenopodium album* Che a 1, se llevó a cabo la obtención de la secuencia N-terminal mediante Degradación de Edman. Parte de esa secuencia (Cys Arg Val Gln Pro Met Thr) sirvió para diseñar el oligonucleótido degenerado, NCH3: 5'-TGTCGNGTNCARTTYATGAC-3' que fue utilizado para amplificar por PCR la secuencia parcial codificante (16-143) y no codificante 3' correspondientes al cDNA de Che a 1. Estas secuencias permitieron posteriormente obtener la secuencia C-terminal, (Asp Leu Tyr Asp Val Lys Ala Asn), con la que se diseñó el oligonucleótido no degenerado NCH4: cgtccgcggttaATTAGCTTTAACATCATAAAGATC. La clonación del producto de la amplificación con los oligonucleótidos no degenerados, NCH5: cgtctcgagaaaagaGCCGAGAACCATTTCAAAGTC (Ala Glu Asn His Phe Lys Val) y NCH4 permitió la obtención de la secuencia de nucleótidos codificante para la proteína madura completa, secuencia que se utilizó para llevar a cabo la expresión.

El procedimiento objeto de esta invención se realiza mediante las siguientes fases:

• Aislamiento de RNA total

Se aisló el RNA total a partir del polen de ceñigo siguiendo el protocolo publicado por Ullrich y col. [Science 196, 1313-1318, 1977]. En este aislamiento se partió de 0.5 g de polen que se homogeneizó en un tampón 0.1 M de Tris-HCl, pH 7.5 que contenía tiocianato de guanidinio 4 M, laurilsarcosinato sódico al 0.5 % y 2-mercaptoetanol 0.14 M, mediante un homogeneizador Polytron. Se centrifugó esta suspensión a 5000 xg a 20°C en una centrifuga Sorvall. Posteriormente se sometió el sobrenadante a una centrifugación en gradiente de CsCl 5.7 M en 0.01 M EDTA a 40.000 rpm en un rotor SW 60 (Beckman) durante 12 horas. A partir de 5 µg

de RNA total se llevó a cabo la síntesis del cDNA utilizando el "kit" SMART II de síntesis de cDNA (Clontech).

• *Clonación de Che a 1 basada en técnicas de PCR*

Como ya se ha mencionado anteriormente, los cebadores correspondientes a las secuencias N- y C-terminal utilizados fueron diseñados teniendo en cuenta la secuencia de la proteína obtenida por degradación de Edman y por secuenciación del fragmento de PCR, respectivamente. El método utilizado se basó en una reacción de PCR en varias etapas. En la primera de ellas, se obtiene la secuencia completa de Che a 1, incluyendo la secuencia 3' no codificante de este alérgeno. Para ello se utiliza como molde el cDNA específico de Che a 1 y como cebadores, el oligonucleótido degenerado NCH3, correspondiente a una secuencia contenida en la secuencia N-terminal de la proteína determinada por degradación de Edman, y el oligonucleótido inespecífico UPM: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'. El molde y los cebadores NCH3 y UPM fueron disueltos en una mezcla de PCR estándar (250 μ M de dNTPs, tampón estándar y 50 pmoles de los cebadores). Después de una primera etapa de desnaturalización a 95°C durante 15 min, se llevaron a cabo 25-35 ciclos a temperaturas de hibridación de 42-55°C en presencia de *Advantage* DNA polimerasa II (Clontech). La reacción se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y los fragmentos de DNA fueron purificados usando el Magic PCR Prep kit (Promega) e insertados en el plásmido pCR2.1 linearizado y con una T terminal en los extremos 5'. Con esta construcción se transformaron células competentes TOP10, a continuación se seleccionaron los recombinantes y se llevó a cabo la secuenciación de algunos de los clones seleccionados, obteniéndose secuencias de este alérgeno. En una segunda etapa de PCR utilizando los oligonucleótidos NCH4 y UPM se ha determinado la secuencia codificante incluyendo la correspondiente al péptido señal de la proteína. En la última etapa de PCR, y utilizándose los oligonucleótidos no degenerados NCH4 y NCH5 se obtuvieron los fragmentos de DNA que contenían la secuencia codificante correspondiente al alérgeno maduro.

Para la producción de la forma recombinante de esta proteína, la secuencia codificante de DNA fue ligada al plásmido de expresión pPICZ α A (Invitrogen Corp.). Las células utilizadas fueron de

la cepa KM71 de *Pichia pastoris*. La inducción se llevó a cabo por metanol al 0.5% durante cinco días, creciendo las células a 30°C en medio rico o medio mínimo de crecimiento de levadura. Las células se sedimentaron centrifugando a 5000 xg, se recogieron los sobrenadantes y una muestra de los mismos se aplicó en un gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS. Una banda de 19.5 kDa, única, fue detectada mediante tinción de los geles con Azul de Coomassie. La proteína es reconocida por sueros de pacientes alérgicos específicos de Che a 1 natural (dilución 1:10). La purificación de las proteínas obtenidas en medio mínimo se realizó mediante la liofilización del medio extracelular de la levadura y la aplicación de dos etapas cromatográficas, una de penetrabilidad en Sephadex G-75 y otra en una columna de fase reversa C-18 en HPLC, obteniéndose tras esta última el alérgeno con un grado de pureza del 99%. Para la producción del alérgeno en medio rico se llevó a cabo una etapa adicional de intercambio iónico en DEAE-celulosa con el medio extracelular dializado y después se realizaron las dos etapas cromatográficas, penetrabilidad y HPLC, llevadas a cabo con la proteína producida en medio mínimo. Se hicieron con ellas estudios de caracterización estructural (espectros de dicroísmo en el W lejano, espectrometría de masas) e inmunológica (con sueros individuales de pacientes alérgicos) y en todos los casos las proteínas recombinantes se comportaron de manera equivalente a la del alérgeno natural.

• *Aislamiento del alérgeno Che a 1 a partir del polen de ceñigo (*Chenopodium album*)*

El alérgeno Che a 1 ha sido purificado a partir de extracto proteico de polen de ceñigo, obtenido por homogeneización de 3g de polen en bicarbonato amónico 50 mM pH 8.0. Dicho extracto fue aplicado a una columna de Sephadex G-75. Las fracciones que contenían la proteína fueron aplicadas a una columna de fase reversa C-18 en HPLC con un gradiente de acetonitrilo del 0-60% en TFA al 0.1%.

La invención comprende el uso de Che a 1 recombinante en diagnóstico, "*in vivo*" mediante pruebas cutáneas o "*in vitro*" mediante técnicas de inmunodetección (ELISA, RAST), permitiendo precisar qué alérgenos son los responsables de la sintomatología clínica de un individuo y reducir así el número de moléculas necesarias para su inmunoterapia. Se origina, por tanto, una inmunoterapia personalizada.

REIVINDICACIONES

1. Moléculas de DNA recombinante **caracterizadas** por SEQ ID NO: 1 que codifican polipéptidos con actividad alergénica y que poseen al menos un epítipo alergénico común con el alérgeno Che a 1 de *Chenopodium album*.

2. Moléculas de DNA recombinante, o modificaciones de las mismas, según reivindicación 1, que codifican polipéptidos con, al menos, un epítipo de Che a 1 en su estructura, unido a un polipéptido adicional, o modificado química o enzimáticamente.

3. Moléculas de DNA recombinante **caracterizadas** por hibridar en condiciones fuertemente restrictivas con la descrita en SEQ ID NO 1.

4. Moléculas de DNA recombinante **caracterizadas** por presentar, al menos, un 60 % de identidad con la descrita en SEQ ID NO: 1, conteniendo una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad alergénica idéntica o reducida (hipoalergénica) con respecto a Che a 1.

5. Polipéptido recombinante correspondiente al alérgeno Che a 1 de *Chenopodium album*, o fragmentos de dicho polipéptido, según reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por la secuencia dada en SEQ ID NO: 2 y que presentan la antigenicidad de, al menos, un epítipo de Che a 1.

6. Polipéptidos recombinantes del alérgeno homólogo de Che a 1 en otras especies relacionadas y no relacionadas filogenéticamente, o fragmentos de dichos polipéptidos, según reivindicaciones 3 y 4 que presentan la antigenicidad de, al menos, un epítipo de Che a 1.

7. Polipéptidos que posean una secuencia de aminoácidos según reivindicaciones 5 y 6, y que presenten una alergenidad atenuada.

8. Polipéptidos o fragmentos de dichos polipéptidos de polen de Chenopodiaceas con, al menos, un epítipo de Che a 1, según reivindicaciones anteriores, que se produzcan recombinantes unidos a un polipéptido adicional.

9. Polipéptidos de polen de *Chenopodium album*, según reivindicaciones anteriores, que estén modificados química o enzimáticamente.

10. Un vector de expresión eucariota, y preferentemente pPICZαA, que contenga las secuencias **caracterizadas** por SEQ ID NO: 1, según

reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, cuya expresión dé lugar a la producción de los polipéptidos caracterizados por SEQ ID NO: 1 y 2 según las reivindicaciones 5, 6, 7, 8 y 9.

11. Un organismo hospedador eucariota, preferentemente la levadura *Pichia pastoris*, transformado con la construcción formada según reivindicación 10.

12. Un método para producir las formas recombinantes correspondientes a las secuencias polipeptídicas descritas en las reivindicaciones 5, 6, 7, 8 y 9, en el sistema eucariótico de levadura *Pichia pastoris*, y preferentemente de la cepa KM71, crecidas en medio rico, **caracterizado** por una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, una de penetrabilidad en Sephadex G-75 y una en una columna C-18 de fase reversa de HPLC.

13. Un método para producir las formas recombinantes correspondientes a las secuencias polipeptídicas mencionadas en las reivindicaciones 5, 6, 7, 8 y 9, en el sistema eucariótico de levadura *Pichia pastoris* y preferentemente de la cepa KM71 crecidas en medio mínimo, **caracterizado** por una cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-75 y una en una columna C-18 de fase reversa de HPLC.

14. Un método para el aislamiento del alérgeno Che a 1 a partir del polen de *Chenopodium album* utilizando una cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-75 y otra en nucleosil C-18 de fase reversa de HPLC.

15. Utilización de las moléculas, según reivindicaciones 1-9, en el diagnóstico "in vitro" de la alergia.

16. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1-9 para el diseño de vacunas destinadas a la inmunoterapia de la alergia.

17. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1-4 para producir péptidos, según reivindicaciones 5-9, que contengan al menos un epítipo T alergénico, capaces de actuar como vacunas.

18. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1-4 en la producción de isoformas recombinantes hipoalergénicas que tengan disminuida o anulada su unión a IgE para el tratamiento de alergias.

LISTAS DE SECUENCIAS

5

<110> Universidad Complutense de Madrid

<120> Producción del alérgeno recombinante de *Chenopodium album* Che

10

a 1, y sistema de aislamiento y purificación.

<160> 2

<210> 1

15

<211> 567

<212> DNA

<213> *Chenopodium album*

<220>

20

<221> CDS

<222> (1)...(504)

<300>

25

<308> AY049012

<309> 2001 10 19

<400> 1

30

atg gcg aag tgt caa gct gtt ttt ctt ttg gtt ggc gct ctc tgc gtc 48
Met Ala Lys Cys Gln Ala Val Phe Leu Leu Val Gly Ala Leu Cys Val
1 5 10 15

35

ctg tcc ttg gcc ggt gta gcc aat gcc gcc gag aac cat ttc aaa gtc 96
Leu Ser Leu Ala Gly Val Ala Asn Ala Ala Glu Asn His Phe Lys Val
20 25 30

40

cag ggc atg gtg tac tgt gac act tgc cgt atc caa ttt atg acc cgc 144
Gln Gly Met Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ile Gln Phe Met Thr Arg
35 40 45

45

att agt aca ata atg gaa ggg gca act gtg aaa ttg gaa tgc aga aac 192
Ile Ser Thr Ile Met Glu Gly Ala Thr Val Lys Leu Glu Cys Arg Asn
50 55 60

50

att act gca gga act cag acc ttc aaa gct gaa gct gta act gat aag 240
Ile Thr Ala Gly Thr Gln Thr phe Lys Ala Glu Ala Val Thr Asp Lys
65 70 75 80

gta gga cag tac agc atc cct gtt aat ggt gat ttc gaa gac gat atc 288
Val Gly Gln Tyr Ser Ile Pro Val Asn Gly Asp Phe Glu Asp Asp Ile
85 90 95

55

tgt gaa atc gag ttg gtt aag agc ccc aac agc gaa tgc tct gag gtt 336
Cys Glu Ile Glu Leu Val Lys Ser Pro Asn Ser Glu Cys Ser Glu Val
100 105 110

60

tca cat gat gtt tat gcc aag caa tct gct aag gtt agc cta aca tcc 384
Ser His Asp Val Tyr Ala Lys Gln Ser Ala Lys Val Ser Leu Thr Ser
115 120 125

ES 2 199 050 A1

```

5      aac aat ggt gaa gct tca gac att cgc agc gcc aat gct ctc gga ttc 432
      Asn Asn Gly Glu Ala Ser Asp Ile Arg Ser Ala Asn Ala Leu Gly Phe
      130                      135                      140

10     atg agg aag gag ccc ctt aaa gag tgc cct gag gtt ctc aag gag ttg 480
      Met Arg Lys Glu Pro Leu Lys Glu Cys Pro Glu Val Leu Lys Glu Leu
      145                      150                      155                      160

      gat ctt tat gat gtt aaa gct aat taa aaaaaacaaa ttatttttcgt 527
      Asp Leu Tyr Asp Val Lys Ala Asn
      165

15     tttccaactt attcttaacc taaagcagat agccatacag 567

20     <210> 2
      <211> 168
      <212> PRT
      <213> Chenopodium album

25     <220>
      <221> sig_peptide
      <222> (1)...(26)

30     <300>
      <308> AY049012
      <309> 2001 10 19

35     <400> 2
      Met Ala Lys Cys Gln Ala Val Phe Leu Leu Val Gly Ala Leu Cys Val
      1                      5                      10                      15
      Leu Ser Leu Ala Gly Val Ala Asn Ala Ala Glu Asn His Phe Lys Val
      20                      25                      30
      Gln Gly Met Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ile Gln Phe Met Thr Arg
      35                      40                      45
      Ile Ser Thr Ile Met Glu Gly Ala Thr Val Lys Leu Glu Cys Arg Asn
      50                      55                      60
      Ile Thr Ala Gly Thr Gln Thr phe Lys Ala Glu Ala Val Thr Asp Lys
      65                      70                      75                      80
      Val Gly Gln Tyr Ser Ile Pro Val Asn Gly Asp Phe Glu Asp Asp Ile
      85                      90                      95
      Cys Glu Ile Glu Leu Val Lys Ser Pro Asn Ser Glu Cys Ser Glu Val
      100                      105                      110
      Ser His Asp Val Tyr Ala Lys Gln Ser Ala Lys Val Ser Leu Thr Ser
      115                      120                      125
60

```

ES 2 199 050 A1

	Asn	Asn	Gly	Glu	Ala	Ser	Asp	Ile	Arg	Ser	Ala	Asn	Ala	Leu	Gly	Phe
	130						135					140				
5	Met	Arg	Lys	Glu	Pro	Leu	Lys	Glu	Cys	Pro	Glu	Val	Leu	Lys	Glu	Leu
	145					150					155					160
	Asp	Leu	Tyr	Asp	Val	Lys	Ala	Asn								
10					165											
15																
20																
25																
30																
35																
40																
45																
50																
55																
60																



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 199 050
⑫ N.º solicitud: 200200686
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 22.03.2002
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C12N 15/29, C07K 14/415, G01N 33/68, A61K 39/36, A61P 37/08

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 0212503 A (UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID) 14.02.2002, todo el documento.	1-18

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.º:

Fecha de realización del informe 29.05.2003	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/1
--	---------------------------------	---------------