



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 315 076**

⑫ Número de solicitud: 200600388

⑬ Int. Cl.:

C12N 15/29 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **09.02.2006**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2009**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.03.2009

⑱ Solicitante/s: **ASAC COMPAÑÍA DE
BIOTECNOLOGÍA E INVESTIGACIÓN S.A.**
c/ Sagitario, 14
03006 Alicante, ES

⑲ Inventor/es: **Villalba Díaz, María Teresa;**
Rodríguez García, Rosalía y
Marco de la Calle, Francisco

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Hospedador transformado para la producción de alérgenos recombinantes.**

㉒ Resumen:

Hospedador transformado para la producción de alérgenos recombinantes.

Se describe un hospedador transformado, concretamente la cepa BL21 (DE3) de Escherichia coli, construido con el vector de expresión pET11b que contiene el clon SAL11 descrito en la SEQ N° 1 para la expresión del alérgeno Sal k3 que está caracterizado por la SEQ N°2. Se describe el uso de los polipéptidos para la fabricación de un kit para el diagnóstico de las alergias.

ES 2 315 076 A1

DESCRIPCIÓN

Hospedador transformado para la producción de alérgenos recombinantes.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención describe un hospedador transformado, concretamente la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli*, construido con el vector de expresión pET11b que contiene el clon SAL11 descrito en la SEQ N° 1 para la expresión del alérgeno Sal k 3 que está caracterizado por la SEQ n° 2.

Antecedentes de la invención

La alergia tipo I es una enfermedad ocasionada por los alérgenos presentes en diferentes productos biológicos - alimentos, venenos de insectos, ácaros o pólenes, como en productos sintéticos. En la mayor parte de las fuentes biológicas alérgicas, los alérgenos son proteínas de pesos moleculares entre 10 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 FcεI, 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 epítipo 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 de dosis adecuadas del propio alérgeno, o alérgoides relacionados. En la práctica totalidad de los casos se administra un extracto alérgico obtenido, generalmente, con la mínima manipulación: extracción de las proteínas, diálisis y liofilización, lo que implica una mezcla compleja de proteínas y otras sustancias, en la cual, el alérgeno - o alérgenos- están una parte ínfima del producto total utilizado. Los protocolos utilizados para la diagnosis de alergia y posterior inmunoterapia implica el uso de extractos que no están caracterizados, ni estandarizados respecto a los alérgenos más importantes que puedan contener.

De esta forma, las investigaciones en el campo de la inmunoterapia están siendo enfocadas hacia obtención de proteínas alérgicas mediante la tecnología recombinante en microorganismos hospedadores. A título de ejemplo, WO 02/070716 describe la producción en la levadura de *Pichia Pastoris* de los alérgenos recombinantes de *Olea europea* y su uso en el tratamiento y diagnosis de la alergia.

Por otra parte, es usual que los individuos que sufren alergia a un determinado polen sean alérgicos también a pólenes de otras especies, incluso sin estar relacionadas filogenéticamente dichas especies. Diversos estudios han mostrado que los individuos hipersensibles a *Salsola kali* son también alérgicos al polen de las *Oleaceae*, *Artemisia*, *Gramineae*, *Betulaceae*. Además, también existe una reactividad cruzada entre el polen de la *Salsola kali* y otros pólenes no relacionados como *Mercurialis annua*, el 60% de los individuos alérgicos al *Mercurialis annua* son alérgicos a la *Salsola kali* y al azafrán.

El documento más cercano a la invención, Carnes *et al.*: Immunochemical characterization of Russian thistle (*Salsola kali*) pollen extracts. Purification of the allergen Sal k 1. Allergy, 2003 Nov; 58(11):1152-6, identifica al alérgeno Sal k 1, que es reconocido por el 67% de los alérgicos a la *Salsola Kali*. La proteína Sal k 1 tiene un peso molecular de 43 KiloDaltons y en su secuencia no existe homología con otras proteínas.

Objeto de la invención

El problema resuelto por la presente invención es la obtención de proteínas alérgicas con reactividad IgE a los sueros de los pacientes hipersensibles a *Salsola kali*, a los alérgicos a pólenes relacionados filogenéticamente, a saber, a los alérgicos a plantas de la familia *Chenopodiaceae* (*Chenopodium album*, *Atriplex*) y, también, a los alérgicos a pólenes no relacionados, tales como, *Oleaceae*, *Gramineae* y/o *Artemisia vulgaris* para su uso en la fabricación de un kit para la realización de pruebas de alergia.

La solución encontrada por los inventores es la obtención de alérgenos recombinantes mediante un hospedador, concretamente la cepa BL21(D3) de *Escherichia coli*, transformada con el vector de expresión pET11b que contiene una secuencia de nucleótidos, según SEQ n° 1, codificante de los polipéptidos según SEQ n° 2.

La proteína recombinante obtenida (Sal k 3), con una masa molecular de 9433 Da, con alto contenido en la conformación hélice alfa, con carácter ácido y con la secuencia de aminoácidos descrita en la secuencia SEQ n° 2, exhibió una prevalencia del 31.5% en los pacientes alérgicos a *Salsola kali* y una fuerte reactividad cruzada con los pólenes de los géneros ensayados: *Gramineae*, *Betulaceae*, *Oleaceae* y *Artemiseae*.

Ejemplo 1

Aislamiento y caracterización de Sal k 3

5 Los sueros de 89 pacientes alérgicos a la *Salsola kali* se analizaron mediante inmunoensayo frente a los extractos alérgénicos salino de los pólenes. Cuarenta y ocho (48) sueros exhibieron bandas detectables en el inmunoensayo frente al extracto crudo de *Salsola kali* y estos sueros estaban correlacionados con los sueros que mostraron valores del RAST mayores a 3. Treinta y tres (33) sueros mostraron reactividad IgE frente a proteínas con peso molecular comprendido entre 9 y 12 kDa. Esta fracción alérgénica de *Salsola kali* de bajo peso molecular posteriormente se
10 purificó e identificó con Sal k 3.

El polen de *Salsola kali* se cromatografió sobre una columna de Sephadex G-50 y las fracciones se analizó la capacidad de unión a las inmunoglobulinas IgE de los pacientes alérgicos a la *Salsola kali*. Las fracciones que dieron una respuesta positiva en torno a 10 KDa fueron reunidas, liofilizadas y separadas por HPLC usando un gradiente
15 de acetonitrilo en ácido trifluoroacético 0.1%. La proteína apareció como una cadena simple de polipéptidos con una masa molecular de 10.0 K Da según el SDS-PAGE. La proteína mostró capacidad para unirse a la IgE de los pacientes alérgicos al *Salsola kali*. El rendimiento obtenido fue de 120 microgramos de proteína por gramo de polen seco.

El análisis por espectrofotometría de masas de la proteína purificada dio un pico simple y homogéneo con una
20 masa molecular de 9433 Da.

El análisis de aminoácidos de la proteína se determinó por hidrólisis ácida y mostró gran similitud con los componentes de la familia de las proteínas con un sitio de unión de calcio.

Ejemplo 2

*Clonaje y secuencia del Sal k 3**Aislamiento del RNA total*

El RNA total del polen de *Salsola kali* se aisló por el método descrito por Ullrich *et al.* Science **196**:1313, 1980. El polen (1.0 g) se homogenizó en un Polytron con Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 con isotiocianato de guanidinio 4 M, N-laurilsarcosinato sódico 0.5% y 2-mercaptoetanol 140 mM. A continuación, la mezcla se centrifugó a 4500 rpm a
35 20°C durante 30 minutos. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se depositó sobre 3.1 ml de CsCl 5.7 M en EDTA 10 mM, y se centrifugó a 4000 rpm durante 12 horas a 4°C, con un rotor SW60 (Beckman). El sedimento se lavó 2 veces con etanol 70%, para eliminar el CsCl y facilitar su resuspensión. La muestra se disolvió en 100 µl de Tris-EDTA (TE) con SDS 0.1%, se añadieron 100 µl más de TE, y a continuación, se llevó a cabo una precipitación con etanol. El RNA se disolvió en 50 µl de agua estéril tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). La concentración de RNA se calculó en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7.
40

Síntesis de cDNA

El cDNA de cadena simple se sintetizó a partir de 2.5 µg de RNA total con la enzima transcriptasa inversa
45 *Superscript II* (Gibco) y siguiendo las instrucciones del kit SMART RACE cDNA amplification (Clontech).

PCR

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *GeneAmp System 2400* (Applied BiosystemPE).
50 Como enzimas se utilizaron la *Advantage Polymerase 2* (Clontech) en la primera amplificación y la TaqGold polimerasa para añadir desoxiadenosina (a) en los extremos y poder clonar en pCR2.1. El resto de los componentes fueron los recomendados para la correcta reacción de las enzimas.

Para añadir desoxiadenosinas en los extremos de los productos de PCR se añadió la TaqGold polimerasa, se clonaron en el vector pCR2.1 suministrado en el kit TA Cloning (Clontech) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. El plásmido pCR2.1 de 3.9 kb tiene en sus extremos 3' un nucleótido extra de desoxitimidina (T), mientras que los extremos de los productos de PCR amplificados con la TaqGold polimerasa presentan desoxiadenosina (A) ya que esta enzima los añade siempre al final de la amplificación. Aprovechando ambos extremos se consigue la ligación siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.
55

La secuenciación del DNA de los diversos plásmidos se realizó automáticamente.
60

Resultados

65 A partir del RNA obtenido y purificado en gel de agarosa, se sintetizó el cDNA de cadena simple, 3'cDNA y 5'cDNA, que fueron utilizados como molde en las diferentes amplificaciones que condujeron a la obtención de la secuencia codificante de Sal k 3, realizando tres PCRs.

ES 2 315 076 A1

- 1 PCR. En la primera PCR se usó un oligonucleótido degenerado diseñado a partir de la secuencia de aminoácidos del sitio de unión a calcio obtenido de la digestión de la proteína con bromuro de cianógeno (OL3.1), y otro oligonucleótido que hibrida con zonas inespecíficas del DNA (UPM).

OL3.1 es antisense y corresponde a la siguiente secuencia: Cg g AATTC TC ggT rTC CTC rgC CAT CAT, que traducida corresponde a: MMAEIDTD; también introduce un sitio de restricción Eco RI y, previo al sitio, dos nucleótidos para favorecer el corte de la enzima. El otro nucleótido (UPM) se encuentra en el kit utilizado para la obtención del cDNA de Salsola, e hibrida con secuencias inespecíficas del cDNA. Como molde se empleó el 5'cDNA, siendo el programa utilizado en esta ampliación el siguiente:

94°C	1 min 30 segundos
94°C	30 segundos
60°C	30 segundos
72°C	1 minuto 30 segundos
30 ciclos	
72°C	5 minutos
10°C	indefinido

De la amplificación con ambos oligos se obtuvo una banda de aproximadamente 375 pb, que recortada y purificada se clonó en el vector pCR2.1 para su posterior secuenciación. Como resultado de este proceso se obtuvo una banda de aproximadamente 375 pb, que recortada y purificada se clonó en el vector pCR2.1 para su posterior secuenciación. Como resultado de este proceso se obtuvieron tres clones que correspondían a la secuencia codificante de Sal K3 desde el sitio de unión a calcio, que se había obtenido por degradación de Edman de la digestión con bromuro de cianógeno, hasta el amino-terminal de la molécula.

- 2 PCR. Con la secuencia obtenida se diseñó un oligonucleótido específico a partir del amino-terminal de la molécula. El oligo incorporaba un sitio de restricción NdeI (CATATG) necesario para su futura expresión en la cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli*.

El oligo utilizado fue: NCH3.1 ATA CATATg gCT gAg gAT ACA CCT, que traducida corresponde a: NdeI MAAEDTP, este oligo incluye tres bases previo al sitio de corte para favorecer el corte del plásmido. Como segundo oligonucleótido se utilizó nuevamente el UPM y como molde el 3'cDNA. El programa de PCR fue:

94°C	5 minutos
94°C	30 segundos
58°C	45 segundos
72°C	1 minuto 30 segundos
30 ciclos	
72°C	5 minutos
10°C	indefinido

La PCR produjo dos bandas de 600 y 750 pb. Ambos productos fueron clonados de forma separada en el vector pCR2.1 y secuenciados. En ambos casos se secuenció Sal K 3, la única diferencia entre ambas bandas era la longitud de la zona 3' no codificante correspondiente en su mayor parte a la cola de poliA. De esta secuenciación se obtuvo la secuencia completa que codifica para Sal K 3 desde el amino al carboxilo terminal.

- 3 PCR. A partir de los clones secuenciados (cuatro en total) se diseñó un oligo específico no degenerado correspondiente al carboxilo terminal de la molécula. En todos los clones el carboxilo terminal era idéntico en secuencia de nucleótidos por lo que se diseñó un oligonucleótido antisense para poder obtener, en esta última PCR, únicamente la secuencia codificante de Sal K 3, que tras clonarlo en el vector pET11b permitía expresar la proteína en su forma recombinante.

El oligonucleótido diseñado incorpora un sitio de restricción Eco RI (CTTAAg), necesario al igual que el sitio NdeI, para su clonaje en el vector de expresión pET11b: CTSAL gC CTTAAg CTA AAA gAT CTT AgC AAC ATC

ES 2 315 076 A1

que en su secuencia de aminoácidos corresponde a : Eco RI “Stop” F I K A V D, previo al sitio de corte también se incorporó un sitio de restricción para cortar correctamente el plásmido.

Se utilizó como molde en la PCR 3'cDNA y como cebadores los oligonucleótidos específicos diseñados a partir de la secuencia de nucleótidos amino y carboxílico terminal (NCH3.1 y CTSAL).

El programa de temperaturas que se utilizó fue:

94°C 5 minutos

94°C 30 segundos

50°C 45 segundos

72°C 1 minutos 30 segundos

30 ciclos

72°C 5 minutos

10°C indefinido

De la ampliación se obtuvieron dos bandas de 200 y alrededor de 300 pb, siendo la secuencia codificante de Sal K 3 la banda de 300 bp. La banda de 300 pb se clonó en el vector pCR2.1 y se obtuvo la secuencia de dos clones de Sal K 3, que se diferencian únicamente en un aminoácido.

La cepa BL21 (DE) de *E. coli* construida con el vector de expresión pET11b que contiene el clon SAL11 descrito en la SEQ N° 1 se utilizó para la fabricación recombinante del alergen Sal K 3 descrito en SEQ N° 2.

Ejemplo 3

Reactividad cruzada de Sal K 3

Los pólenes de los extractos de especies relacionadas filogénicamente y no relacionadas filogénicamente con *Sal-sola kali* se utilizaron como inhibidores para detectar la reactividad cruzada con Sal K3. Una serie de 6 sueros se utilizaron en *immunoblotting* y se preincubaron con dos diferentes cantidades (30 y 100 microgramos) de extractos protéicos salinos de diferentes pólenes. Los sueros se preincubaron con leche desnatada como control negativo. Los resultados muestran que los extractos proteicos de los pólenes relacionados botánicamente con *Chenopodium album* como también los pólenes de las *Oleaceae*, no relacionadas filogenéticamente, fueron capaces de inhibir completamente, incluso a bajas concentraciones, la unión IgE a Sal K 3. Los extractos de los pólenes de *Gramineae* y abedul mostraron gran capacidad de inhibición pero no alcanzaron el 100%. El polen de *Artemisia vulgaris* produjo una inhibición elevada cuando se usaron 100 microgramos de extracto.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un hospedador transformado construido con el vector de expresión pET11b que contiene el clon SAL11 descrito en la SEQ N° 1 para la expresión del alergen Sal k 3 que está **caracterizado** por la SEQ n° 2.
2. Moléculas de DNA recombinates **caracterizadas** por consistir la SEQ N° 1 que codifican polipéptidos con actividad alérgica que poseen al menos un epitopo alérgico común con Sal K 3 de *Salsola kali*.
- 10 3. Polipéptidos recombinates del alergen Sal k 3 de *Salsola kali* **caracterizados** por consistir la SEQ N° 2.
4. Uso de los polipéptidos según la reivindicación 3 para la fabricación de una vacuna destinada a inmunoterapia.
- 15 5. Uso de los polipéptidos según la reivindicación 3 para la fabricación de un kit para la realización de pruebas de alergia.
6. Hospedador transformado según la reivindicación 1 **caracterizado** porque es la cepa BL (DE3) de *Escherichia coli*.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 315 076 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ASAC COMPAÑÍA DE BIOTECNOLOGÍA E INVESTIGACIÓN SA

5 <120> Hospedador transformado para la producción de alergen recombinantes

<130> Sal k3

10 <140> ES200600388/7

<141> 2006-09-02

<160> 2

15 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

20 <211> 275

<212> DNA

<213> Artificial

25 <220>

<223> El clon SAL 11 codificante de sal K 3 que se clona en el vector de expresión pET11b. El plásmido obtenido pET11b/SAL 11 se transforma en la cepa B12(D3) de *E. coli*.

30 <400> 1

35	ataactaatgg ctgctgagga tacacctcaa gaccttgctg atagggagag aatcttcaag	60
	cgtttcgaca cgaatggcga tggcaaaata tcatcctctg agcttggtga tgctctgaaa	120
	actcttggct ctgtgacctc agatgaaatt gtgaggatga tggccgagat cgatacggat	180
40	ggatgatgggtt tcatttcatt tgaggagtgc actgagtttg ctcaagctaa tcgtggcttg	240
	attaaagatg ttgctaagat cttttagctt aaggc	275

45

<210> 2

50 <211> 86

<212> PRT

<213> Sal K3

55

60

65

ES 2 315 076 A1

<400> 2

5	Met	Ala	Ala	Glu	Asp	Thr	Pro	Gln	Asp	Leu	Ala	Asp	Arg	Glu	Arg	Ile
	1				5					10					15	
10	Phe	Lys	Arg	Phe	Asp	Thr	Asn	Gly	Asp	Gly	Lys	Ile	Ser	Ser	Ser	Glu
				20					25					30		
15	Leu	Gly	Asp	Ala	Leu	Lys	Thr	Leu	Gly	Ser	Val	Thr	Ser	Asp	Glu	Ile
			35					40					45			
20	Val	Arg	Met	Met	Ala	Glu	Ile	Asp	Thr	Asp	Gly	Asp	Gly	Phe	Ile	Ser
	50						55					60				
25	Phe	Glu	Glu	Phe	Thr	Glu	Phe	Ala	Gln	Ala	Asn	Arg	Gly	Leu	Ile	Lys
	65					70					75					80
30	Asp	Val	Ala	Lys	Ile	Phe										
					85											
35																
40																
45																
50																
55																
60																
65																



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 315 076

⑫ Nº de solicitud: 200600388

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 09.02.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 03080837 A1 (UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, RECTORADO) 02.10.2003, todo el documento.	1-6
A	WO 02070716 A1 (UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, RECTORADO) 12.09.2002, todo el documento.	1-6
A	DE 4313966 A1 (FALK PHARMA GMBH) 03.11.1994, todo el documento.	1-6
A	CARNES J. et al., "Immunochemical characterization of Russian thistle (Salsola kali) pollen extracts. Purification of the allergen Sal k 1", Allergy (2003), Vol. 58, páginas 1152-1156; ISSN: 0105-4538. Todo el documento.	1-6
A	WÜRTZEN P.A. et al., "Characterization of Chenopodiales (Amaranthus retroflexus, Chenopodium album, Kochia scoparia, Salsola pestifer) pollen allergens", Allergy (1995), Vol. 50, páginas 489-497; ISSN: 0105-4538. Todo el documento.	1-6
A	CARNES J. et al., "Immunochemical characterization of Salsola kali pollen extracts", Allergy (2001), Vol. 56, suplemento nº 68, página 274, resumen nº 881. ISSN: 0105-4538. Todo el documento.	1-6

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 nº:

Fecha de realización del informe

20.02.2009

Examinador

A. García Coca

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/29 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)