(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 352 775**

(21) Número de solicitud: 200900744

(51) Int. CI.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **18.03.2009**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2011**

Fecha de la concesión: **11.01.2012**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **23.01.2012**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **23.01.2012**

(73) Titular/es:
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
AVDA. SÉNECA, N. 2
28040 MADRID, ES

(72) Inventor/es:
VILLALBA DÍAZ, MARÍA TERESA;
RODRÍGUEZ GARCÍA, ROSALIA;
BATANERO CREMADES, EVA;
SIRVENT BERNAL, SOFÍA y
PALOMARES GRACIA, ÓSCAR

(74) Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

(54) Título: **DNA QUE CODIFICA EL ALÉRGENO DE MOSTAZA AMARILLA (SINAPIS ALBA) SIN A 3, Y SUS APLICACIONES.**

(57) Resumen:
DNA que codifica el alérgeno de mostaza amarilla (Sinapis alba) Sin a 3, y sus aplicaciones.
La invención incluye el DNA que codifica el alergeno Sin a 3 de semillas de mostaza amarilla (Sinapis alba), reconocido por más del 30% de los pacientes alérgicos a esta fuente biológica. Asimismo, incluye dicho DNA recombinante clonado y expresado a partir de células hospedadoras eucariotas obteniéndose la proteína recombinante correctamente plegada y que mantiene propiedades inmunológicas equivalentes a las del alergeno natural. Por otro lado, la invención se refiere a un método de aislamiento y purificación del alergeno natural y a un método de purificación del alergeno recombinante.
Tanto la proteína Sin a 3 purificada como la proteína recombinante, las proteínas homólogas, las formas modificadas, derivadas de ellas, los fragmentos derivados que contengan al menos un epítopo alergénico, pueden ser empleadas en la elaboración de métodos de diagnóstico de alergias así como en la elaboración de sistemas de inmunoterapia.

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

ES 2 352 775 B1

DESCRIPCIÓN

DNA que codifica el alérgeno de mostaza amarilla (*Sinapis alba*) Sin a 3, y sus aplicaciones.

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector de alergología, y especialmente de las alergias a pólenes de plantas. Más concretamente, se refiere a un DNA recombinante que codifica epítopos del alérgeno Sin a 3 de la mostaza amarilla (*Sinapis alba*), a la producción recombinante de los polipéptidos codificados por dicho DNA y al método de aislamiento del alérgeno recombinante. También se refiere a la aplicación de estas moléculas en sistemas de diagnóstico y en la elaboración de preparaciones para la terapia de esta afección inmunológica.

Estado de la técnica anterior a la invención

La alergia tipo I es una enfermedad que afecta a más del 20% de la población de los países industrializados (Kay, A.B. (1997) Allergy and allergic diseases, Blackwell Science, Oxford, UK). 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 alergénicas, 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 Fc□RI, 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 epítopo 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 alergoides relacionados. En la práctica totalidad de los casos se administra un extracto alergénico obtenido de la fuente biológica natural, lo que implica 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.

La mostaza amarilla (*Sinapis alba*) es una especie incluida en la familia Brassicaceae a la que también pertenecen la mostaza oriental (*Brassica juncea*), la colza (*Brassica napus*), la col (*Brassica oleracea*), entre otras. La mostaza es una de las especias más alergénicas de las que se tiene constancia hasta la fecha, tanto por su prevalencia como por su potencia alergénica. Como para otros alimentos alergénicos, la sensibilización depende de los hábitos alimentarios de la población. Existen varios tipos de mostazas: amarilla, negra (*Brassica nigra*) y oriental, y se utilizan con distinta asiduidad usando incluso mezclas de las mismas en diferentes ámbitos geográficos. Los países que más consumen la mostaza son USA, Francia y Japón. La mostaza es un condimento frecuente en salsas variadas y diferentes aliños, curry, mayonesa, vinagreta, en el mismo kétchup, o como aromatizante, y a menudo está oculta en alimentos en los que, hasta hace relativamente poco tiempo, ni siquiera se daba razón de su presencia en el etiquetado. Esto se ha regularizado en la actualidad y la mostaza figura oficialmente en un informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como uno de los alimentos cuya presencia ha de indicarse en la etiqueta de los envases. En general, su acceso al cuerpo humano es por ingestión, pero se han descrito casos de alergia a Brassicáceas por inhalación o contacto con la harina molturada o con piensos, sobre todo en personas cuyos puestos de trabajo estaban relacionados con la manipulación de estos alimentos (R.I. Monsalve, M.A. González de la Peña, López-Otín, C. Fiandor, C. Fernández, M. Villalba y R. Rodríguez. Clin. Exp. Allergy 27, 833-841 (1997)).

Los síntomas de los pacientes afectados por alergia a mostaza son típicos de las alergias alimentarias, tales como urticaria, eczema, asma bronquial, dolor gástrico, y puede llegar a ocasionar shock anafiláctico. La severidad de los síntomas ha llevado a algunos autores a desaconsejar el uso de los test de provocación oral para evitar la aparición de reacciones sistémicas indeseables (Monsalve, R.I., Villalba, M., Rico, M., Shewry, P.R., y Rodríguez, R. The 2S albumin proteins. En "Plant Food Allergens". Eds. C. Mills and P. R. Shewry. Blackwell Science Ltd. Cap. 3, pp 42-56, (2004)).

Entre los alérgenos caracterizados en mostaza y otras especies relacionadas destacan Sin a 1, que es el alérgeno principal de la mostaza amarilla, identificado desde hace más de 17 años, y su homólogo de *Brassica juncea*, Bra j 1. Sin a 1 fue la primera albúmina 2S para la que se demostró de manera precisa su alergenicidad. Pero las semillas de mostaza poseen más alérgenos relevantes. Otro importante alérgeno es la globulina 11S a la que se le ha asignado el nombre de Sin a 2. (R.I. Monsalve, M.A. González de la Peña, L. Menéndez-Arias, C. López-Otín, M. Villalba, and R. Rodríguez. Biochem. J. 293, 625-632 (1993); Monsalve, R.I., Villalba, M., y Rodríguez, R. Intern. Symp. Food Allergens 3, 57-69 (2001)).

En la actualidad, los protocolos utilizados para la diagnosis de casos de alergia y su posterior inmunoterapia implican el uso de extractos alergénicos que frecuentemente no están caracterizados, ni siquiera estandarizados respecto a los alérgenos más importantes que pueden contener. En el caso concreto de los alimentos, el uso de los extractos para el diagnóstico puede suponer riesgos adicionales ya que, debido a la severidad de los síntomas asociados a estas alergias, es, en estos casos, en los que aparecen algunas reacciones adversas durante el diagnóstico de estos pacientes, bien mediante pruebas cutáneas o en provocación oral. A menudo, su administración no proporciona un diagnóstico eficaz, sobre todo cuando la hipersensibilidad del paciente se refiere a alérgenos presentes en baja concentración en

dichos extractos (Valenta, R.; Lidholm, J.; Niederberger, V.; Hayek, B.; Kraft, D. and Grondlund, H. (1999) Clin. Exp. Allergy 29, 896-904; Barber, D.; Moreno, C.; Ledesma, A.; Serrano, P.; Galán, A.; Villalba M.; Guerra, F.; Lombardero, M.; Rodríguez, R. (2007) J. Invest. Allergy Clin. Immunol. 17 (S1), 11-16). 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 (Rodríguez, R.; Villalba, M.; Monsalve, R.I. and Batanero, E. (2001) Int. Arch. Allergy Immunol. 125, 185-195). Sin embargo, esta vía presenta dos importantes barreras. Por un lado, implica un buen conocimiento de los componentes alergénicos 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 alergénico es el polen de una especie vegetal. La gran cantidad de pigmentos, carbohidratos, lípidos y componentes insolubles hacen muy difícil su manipulación. Ni qué 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.

Explicación de la invención

DNA que codifica el alérgeno de mostaza amarilla (*Sinapis alba*) Sin a 3, y sus aplicaciones.

Sin a 3, la molécula alergénica objeto de esta patente es un alérgeno de las semillas de la mostaza amarilla, al igual que los dos descritos anteriormente (Sin a 1 y Sin a 2), con una gran incidencia clínica potencial ya que, por estudios preliminares realizados por los inventores de esta patente, este alérgeno puede alcanzar una prevalencia superior al 30% en la población a alérgicos a mostaza estudiada.

Un aspecto de la presente invención se refiere a la molécula polinucleotídica de DNA, caracterizada por SEQ ID NO: 1, que codifica el alérgeno Sin a 3 de *Sinapis alba*. Por la homología encontrada en las bases de datos (GenBank) estaría incluida en la familia de genes de proteínas transferidoras de lípidos no específicas (nsLTP). Además, la invención comprende moléculas polinucleotídicas de DNA que codifican polipéptidos (isoformas) con las mismas o similares propiedades antigénicas y alergénicas (unión de IgEs equivalente a los distintos epítopos) que el alérgeno procedente de las semillas de mostaza amarilla, o bien polipéptidos que poseen al menos un epítopo del alérgeno Sin a 3. También comprende moléculas polinucleotídicas que por mutagénesis vean alteradas secuencias correspondientes a los residuos que constituyen los epítopos alergénicos y que por tanto den lugar a polipéptidos con propiedades alergénicas atenuadas (moléculas hipoalergénicas). La invención incluye también la secuencia completa de aminoácidos del alérgeno, deducida a partir del cDNA y caracterizada por la SEQ ID NO: 2.

Un epítopo es la parte más pequeña de un antígeno con actividad inmunológica que se une de forma directa y específica a receptores en linfocitos T o B o a los anticuerpos secretados. Cada célula inmune reconoce un único epítopo mientras que un antígeno puede estar formado por múltiples epítopos. La mayor parte de los epítopos son dependientes de la conformación de la proteína, estando formados por residuos aminoacídicos alejados en la estructura primaria de la molécula pero próximos espacialmente.

La invención dispone también de secuencias polinucleotídicas de DNA que hibridan, en condiciones fuertemente restrictivas, con las que codifican el alérgeno Sin a 3 de *Sinapis alba*. Con "condiciones fuertemente restrictivas" se hace referencia a la hibridación de dos moléculas en condiciones que implican un nivel de identidad de al menos un 70%, preferentemente del 80%, entre las secuencias de nucleótidos de ambas moléculas sometiéndolas a determinadas condiciones de temperatura (entre 60 y 68ºC, generalmente 65ºC) y/o baja salinidad (entre 10 y 30 mM NaCl, generalmente 20 nM, y entre 1 y 3 mM citrato sódico, generalmente 1,5 mM) y la presencia de SDS (0.1%).

Los polipéptidos derivados de las secuencias polinucleotídicas incluidas en esta invención 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.

Otro aspecto de la invención se refiere al clonaje de la secuencia caracterizada por SEQ ID NO: 1, que codifica Sin a 3, en vectores de clonación. Entre ellos, se puede utilizar el plásmido pPICZαA como vector de expresión. También se refiere a la inserción en dichos vectores de secuencias polinucleotídicas de DNA que hibridan con SEQ ID NO: 1 en las condiciones restrictivas que se han definido en el párrafo anterior o de secuencias derivadas de éstas por degeneración del código genético o mutagénesis siempre que su expresión dé lugar a proteínas homologas a Sin a 3 con al menos un 70% de identidad, y preferentemente con al menos el 80% de identidad, fragmentos suyos o polipéptidos con al menos un epítopo de Sin a 3.

La inserción de vectores de expresión que incluyen dichas secuencias en organismos hospedadores permite disponer de construcciones recombinantes que pueden utilizarse para la producción del alérgeno nativo en forma recombinante. En esta invención cuando se esté haciendo referencia al alérgeno nativo se estará haciendo alusión tanto al alérgeno natural, procedente de las semillas, como al recombinante, ya que la obtención de éste pretende conseguir una molécula recombinante con la conformación equivalente a la del alérgeno natural y por tanto ambos han de estar

plegados en su conformación nativa o más estable. Mediante la utilización del vector de expresión adecuado, se pueden utilizar como hospedadores distintos organismos eucariotas.

De esta manera se obtiene el alérgeno completo o aquellos polipéptidos que contienen, al menos, un determinante antigénico del alérgeno Sin a 3 de mostaza, o de alérgenos homólogos de Sin a 3 con, al menos, un 70% de identidad, preferentemente al menos un 80% -principalmente en especies relacionadas con la mostaza- que, dada la similitud estructural, presentan reactividad alergénica cruzada con Sin a 3 o con una parte de él.

La invención también se refiere al método de purificación de la proteína recombinante a partir de células hospedadoras, especialmente de la levadura *Pichia pastoris*, que forman parte del sistema utilizado para la producción del alérgeno recombinante. También se refiere al método de purificación de los demás polipéptidos de la invención. Una vez producida la molécula polipeptídica con actividad antigénica de Sin a 3 en el medio de crecimiento adecuado, ésta es aislada del medio extracelular del cultivo en forma soluble mediante un procedimiento de purificación que incluye cromatografías con fases estacionarias que permitan el fraccionamiento de las proteínas atendiendo a la carga, el tamaño y la hidrofobicidad.

Otro aspecto de la invención se refiere al método de aislamiento utilizado para la purificación del alérgeno natural Sin a 3 a partir de las semillas de mostaza que incluye la obtención de un extracto proteico de semillas de mostaza y la purificación de la proteína atendiendo a los mismos parámetros que los utilizados para la proteína recombinante.

Los productos recombinantes que incluye la invención presentan la capacidad de unión de anticuerpos IgE del suero de pacientes alérgicos a mostaza y sensibles a Sin a 3. Mediante estudios de caracterización inmunológica, se ha comprobado que las proteínas recombinantes son equivalentes al alérgeno natural. Entre los estudios realizados se ha comprobado el reconocimiento de la proteína Sin a 3 con sueros de pacientes alérgicos a la semilla de mostaza amarilla y con antisueros policlonales específicos.

Además, estructuralmente, la proteína recombinante es también equivalente al alérgeno natural. Para comprobarlo se han realizado estudios de caracterización estructural, como son: a) Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano, que dan idea del tipo de estructura secundaria que posee una proteína y constituye un indicio claro de que la proteína recombinante ha adoptado una conformación ordenada y bien plegada; b) Espectrometría de masas para comprobar que la proteína tiene la masa esperable para la secuencia deducida a partir del cDNA que se ha expresado; c) Análisis de la secuencia amino terminal por degradación de Edman para analizar la integridad de la secuencia de aminoácidos correspondiente al extremo N-terminal de la proteína y para comprobar que no existe un procesamiento erróneo a la hora de la expresión que haya alterado dicha secuencia.

Finalmente, se dispone de Sin a 3 inmunológicamente activo, además de fragmentos antigénicos y alergénicos de este alérgeno, y de proteínas homólogas a él, que sirven para ser incorporados en las pruebas "*in vivo*" e "*in vitro*" a realizar para la correcta diagnosis de la hipersensibilidad a este alimento, y a otros relacionados filogenéticamente con él. También podrán ser empleados en la preparación de los alérgenos que se utilicen para llevar a cabo la inmunoterapia correspondiente para el tratamiento de la alergia a la mostaza.

Para el diagnóstico y la terapia de la alergia a la mostaza se utilizan actualmente extractos proteicos obtenidos a partir de las semillas de esta especia. 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, rebajará considerablemente todos los inconvenientes citados. Esta invención permite disponer de esas moléculas y, además, de péptidos o formas modificadas de las mismas que contienen al menos uno de los epítopos alergénicos de Sin a 3 de *Sinapis alba*.

La invención, por lo tanto, también se refiere al uso de Sin a 3 recombinante en la elaboración de métodos de diagnóstico, "*in vivo*" mediante pruebas cutáneas o "*in vitro*" mediante técnicas de inmunodetección (ELISA, Inmunodetección en membranas de nitrocelulosa ("Immunoblotting")), 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 puede, por tanto, llevar a cabo una inmunoterapia personalizada. Para ello, la invención también incluye el uso de los polipéptidos con epítopos de Sin a 3 que se describen en esta memoria descriptiva en la elaboración de medicamentos útiles en el tratamiento de la alergia a Sin a 3 y a alérgenos homólogos y las composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de los polipéptidos indicados junto con los excipientes farmacéuticos necesarios para su correcta formulación.

Breve descripción de las figuras

Para facilitar la comprensión de las principales características de la invención y formando parte integrante de esta memoria descriptiva, se acompañan una serie de figuras. Con carácter ilustrativo y no limitativo se ha representado lo siguiente:

Figura 1.- Purificación de Sin a 3. A) Análisis por PAGE/SDS de la proteína recombinante en el medio extracelular de las células de levadura (1) y tras su purificación (2). B) Perfil de la última etapa de purificación de Sin a 3 recombinante mediante cromatografía de HPLC.

Modo de realización de la invención

Habiendo descrito la presente invención, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no son limitativos de su alcance, que viene definido exclusivamente por la nota reivindicatoria adjunta.

Ejemplo 1

• *Aislamiento de RNA total*

Se aisló el RNA total a partir de las semillas de mostaza siguiendo el protocolo publicado por Ullrich y col. [Science 196, 1313-1318, 1977]. En este aislamiento se partió de 1 g de semillas de mostaza que se homogeneizó en un tampón 0,1M de Tris-HCl, pH 7,5 que contenía tiocianato de guanidinio 4M, laurilsarcosinato sódico al 0,5% y 2-mercaptoetanol 0,14M, mediante un homogeneizador Polytron. Se centrifugó esta suspensión a 5000 xg a 20ºC en una centrífuga Sorvall. Posteriormente se sometió el sobrenadante a una centrifugación en gradiente de CsCl 5,7M en 0,01 M EDTA a 40.000 rpm en un rotor SW 60 (Beckman) durante 12 h. A partir de 5 μg de RNA total se llevó a cabo la síntesis del cDNA total (DNA complementario, correspondiente a un determinado RNA mensajero) utilizando el kit comercial SMART RACE (del inglés "Rapid Amplification of cDNA Ends") de síntesis de cDNA (Clontech) que permite el clonaje de la secuencia completa de un cDNA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 2

• *Clonación de Sin a 3 basada en técnicas de PCR*

En el procedimiento de clonación del DNA específico del alérgeno Sin a 3 de *Sinapis alba*, se llevó a cabo una digestión tríptica de la proteína para obtener secuencias aminoacídicas internas de la proteína.

Tras la secuenciación de alguno de los péptidos obtenidos (TTPDRQQACR; GCCTGVTNLNNMAR; ACGV NIPYKISK; STNCNSVR;), se seleccionaron dos secuencias (ACGVNIPY y GCCTGVT) para diseñar los oligonucleótidos degenerados ("antisense" y "sense"), SIN3-B: 5'-RTARGGDATRTTRACDCCRCANGC-3', caracterizado por SEQ ID NO: 3, y SIN3-A: 5'-GGNTGYTGYACNGGNGTNAC-3' caracterizado por SEQ ID NO: 4, que fueron utilizados, empleando el cDNA como molde, para amplificar por PCR la secuencia parcial del DNA específico de Sin a 3 que correspondió a una secuencia interna de la proteína deducida de 170 aminoácidos. La secuenciación de este fragmento permitió diseñar dos oligonucleótidos, "antisense" y "sense", SIN3-C: 5-CTGACGGTCCGGGGTTGTAC GAGC-3', caracterizado por SEQ ID NO: 5, y SIN3-D: 5'-GCTCGTACAACCCCGGACCGTCAG-3', caracterizado por SEQ ID NO: 6, dirigidos hacia las secuencias no codificantes 5' y 3'. Cada uno de estos dos cebadores se utilizó, junto con el cebador inespecífico UPM: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' del kit comercial SMART RACE de síntesis de cDNA (Clontech), según las instrucciones del fabricante, para obtener la secuencia codificante completa y las secuencias 5' y 3' no codificantes correspondientes al cDNA de Sin a 3, incluida la secuencia que codifica el péptido señal. Las secuencias obtenidas permitieron posteriormente identificar la secuencia N-terminal de la proteína, ALSCGT, que sirvió de base para el diseño de un oligonucleótido no degenerado, SIN3-E: 5-CGTCTCGAGAAAA GAGCTCTGAGCTGTGGAACC-3', caracterizado por SEQ ID NO: 7 (en el que se incluyeron el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Xho*I y la secuencia que codifica el prepropéptido α de *Saccharomyces cerevisiae*), que, utilizado junto a SIN3-F: 5'-CTGCGGCCGCTCATCTAACGCTGTTGCAGTT-3', caracterizado por SEQ ID NO: 8 (en el que se incluyó el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Not*I), en una reacción de PCR dio como resultado la secuencia codificante de la proteína madura.

Para realizar las reacciones de PCR, el DNA molde fue disuelto en una mezcla de PCR estándar (250 μM de dNTPs, tampón estándar y 50 pmoles de los cebadores correspondientes). Después de una primera etapa de desnaturalización a 95ºC durante 5 min, se llevaron a cabo 30 ciclos a temperatura de hibridación de 55ºC en presencia de *Advantage* DNA polimerasa (Clontech). La mezcla de 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 TOPIO según el protocolo del TOPO TA cloning kit (Invitrogen); a continuación se seleccionaron los recombinantes y se llevó a cabo la secuenciación de algunos de los clones seleccionados, obteniéndose secuencias del DNA que codifica para Sin a 3 y se registró con fecha 05/09/2007 en el banco de secuencias (GenBank) con el número de referencia EF626938, aunque no se ha dado permiso para su publicación.

Ejemplo 3

• *Producción recombinante*

Para la producción de la forma recombinante de esta proteína en *Pichia pastoris*, la secuencia codificante de DNA fue ligada al plásmido de expresión pPICZαA (Invitrogen Corp.). Las células utilizadas fueron de la cepa KM71 de *P. pastoris*. La inducción de la expresión del gen se llevó a cabo con metanol al 0,5% durante 5 días, creciendo las células a 30ºC en medio 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. Como se puede apreciar en la figura 1A, carril 1, mediante tinción de los geles con Azul de Coomassie se detectó una única banda de 10 kDa.

La purificación de la proteína se llevó a cabo mediante la diálisis a través de membranas con un tamaño de poro de 10.000 Da, y posterior liofilización del medio extracelular de la levadura obtenido tras la sedimentación de las células y la aplicación de dos etapas cromatográficas: una de penetrabilidad o filtración en gel en una columna de Sephadex G-50 Superfine con unas dimensiones de 80 x 3,5 cm de la que se eluyó la proteína en bicarbonato amónico 0,2 M. Las fracciones que contenían la proteína tras la visualización de ésta con Azul de Coomassie R-250 se liofilizaron y se aplicaron en otra columna de Sephadex G-50 Superfine de dimensiones 60 x 2 cm, eluyéndose la proteína con un grado de pureza del 90%. Para llevar a cabo estudios en los que un grado de pureza superior al 95% fuera necesario, una tercera etapa cromatográfica de HPLC en una columna C-18 de fase reversa fue añadida al proceso de purificación. En ella la proteína fue eluida mediante un gradiente de ácido trifluoroacético al 0,1% y acetonitrilo conteniendo ácido trifluoroacético al 0,1% del 0 al 60%. En la figura 1B se muestra el perfil de elusión de la proteína en la última etapa cromatográfica (HPLC). Con trazo continuo se registra la Absorbancia de la proteína a una longitud de onda de 214 nm y en trazo gris claro la Absorbancia a 280 nm. En trazo discontinuo se dibuja el perfil del gradiente de acetonitrilo. En el eje de ordenadas izquierdo se representa la Absorbancia y el derecho el porcentaje de acetonitrilo. En abcisas el tiempo de elusión en minutos. Además, el análisis de esas fracciones, tras el PAGE-SDS y la trasferencia a membranas de nitrocelulosa, utilizando una mezcla de sueros alérgicos a Sin a 3 (dilución 1/10) permitió confirmar la presencia e integridad alergénica de la proteína purificada.

Ejemplo 4

• *Caracterización estructural de la proteína recombinante*

Se llevaron a cabo estudios de caracterización estructural con la proteína recombinante:

a) Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano. Los espectros de dicroismo circular (DC) se llevaron a cabo a T ambiente en el ultravioleta lejano registrando desde 195 a 250 nm; y en el próximo registrando desde 250 a 350 nm en un espectropolarímetro Jasco J-715. La concentración de proteína utilizada fue de 0,20-0,25 mg/ml para el UV lejano y 1 mg/ml para el UV próximo. Estos espectros dan idea del tipo de estructura secundaria que posee una proteína y los resultados obtenidos constituyeron un indicio claro de que la proteína recombinante adoptaba una conformación ordenada y bien plegada.

b) Espectrometría de masas. La digestión y posterior espectrometría de masas (MS) y análisis MS/MS de las bandas proteicas cortadas de los geles de poliacrilamida en presencia de SDS tras su tinción con Azul de Coomassie fueron llevadas a cabo en un espectrómetro de masas Broker Reflex II (Broker-Franzen Analytik, Bremen, Germany). El equipo fue calibrado externamente usando citocromo c (12.360 Da) o seroalbúmina bovina (66.430 Da). Este análisis permitió comprobar que la proteína tenía la masa esperable para la secuencia de aminoácidos deducida a partir del DNA que se había expresado.

c) Análisis de la secuencia amino terminal por degradación de Edman. El análisis de Edman se llevó a cabo utilizando un 477ª sequencer (Applied Biosystems-PE Corp) utilizando 100 pmoles de proteína. Permitió comprobar la integridad de la secuencia de aminoácidos correspondiente al extremo amino terminal de la proteína recombinante y comprobar que se correspondía con el de la proteína natural.

Ejemplo 5

• *Caracterización inmunológica de la proteína recombinante*

La proteína recombinante fue utilizada para comprobar y cuantificar su capacidad para unir IgE de los sueros de pacientes alérgicos a la mostaza mediante la técnica de ELISA (siglas de "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"). En este ensayo se tapizaron con 0,5 μg de proteína los pocillos de una placa de 96 pocillos de polipropileno y se incubaron con los sueros de los pacientes alérgicos sensibilizados a Sin a 3 con una dilución 1:10. Un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana hecho en ratón y un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa hecho en cabra fueron añadidos sucesivamente. Se obtuvo como resultado que la proteína recombinante era capaz de unir las IgE de forma equivalente a la proteína natural.

La proteína recombinante (0,2 μg) se separó de las demás proteínas del medio extracelular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 17% en presencia de SDS y se transfirió a membranas de nitrocelulosa en condiciones no reductoras. Las membranas fueron incubadas con los sueros de los pacientes (diluidos 1:5 en PBS/Tween 0,1%/leche desnatada 3%) a 4ºC, durante 12 horas. La unión de IgE a la banda correspondiente al alérgeno Sin a 3 se determinó incubando las membranas con los sueros de los pacientes alérgicos sensibilizados a Sin a 3 con una dilución 1:10. Un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana hecho en ratón y un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa hecho en cabra fueron añadidos sucesivamente. Se obtuvo un resultado equivalente al anterior es decir que la banda electroforética correspondiente a la proteína recombinante era capaz de unir las IgE de forma equivalente a la proteína natural.

Ejemplo 6

• *Aislamiento del alérgeno Sin a 3 a partir de las semillas de mostaza amarilla (Sinapis alba)*

El alérgeno Sin a 3 se purificó a partir de extracto proteico de semillas de mostaza, obtenido por homogeneización de 5 g de semillas en bicarbonato amónico 50 mM, pH 8.0 durante 3 horas a temperatura ambiente. Dicho extracto fue aplicado a una columna de Sephadex G-50 Superfine de dimensiones 60 x 2 cm de la que se eluyó la proteína en bicarbonato amónico 0,2 M. Las fracciones que contenían la proteína tras la visualización de ésta con Azul de Coomassie R-250 se liofilizaron y se aplicaron en otra columna de Sephadex G-50 Superfine de dimensiones 60 x 2 cm, eluyéndose la proteína con un grado de pureza del 90%. Por último se realizó una cromatografía en columna de fase reversa C-18 de HPLC con un gradiente de acetonitrilo (0-60%) en TFA al 0,1%. Además el análisis de esas fracciones tras el PAGE-SDS y la trasferencia a membranas de nitrocelulosa utilizando una mezcla de sueros alérgicos a Sin a 3 (dilución 1/10) permitió confirmar la presencia e integridad alergénica de la proteína purificada.

Ejemplo 7

• *Diagnóstico "in vitro" de la alergia a Sin a 3*

La proteína nativa Sin a 3 (recombinante y natural) objeto de la invención fue utilizada para comprobar y cuantificar su capacidad para unir IgE de los sueros de pacientes alérgicos a la mostaza mediante la técnica de ELISA. En este ensayo se tapizaron alternativamente con 0,5 μg de proteína, natural y recombinante, en PBS pH 7.2, los pocillos de una placa de 96 pocillos de polipropileno y ambas proteínas se incubaron en paralelo con una población de 40 sueros de pacientes alérgicos a mostaza, cada uno utilizado de forma individual, y a una dilución 1:10 durante 2 horas. Un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana hecho en ratón (diluido 1:3000; incubación 1 h) y un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa hecho en cabra (diluido 1:3000; incubación 1 h) fueron añadidos sucesivamente y la obtención de color en la reacción de la peroxidasa con su sustrato 0-fenilendiamina (citrato sódico 0.1 M, pH 5.0, metanol 4% y H_2O_2 0.03%) se determinó midiendo la densidad óptica a 492 nm. El resultado reveló que aproximadamente un 40% de los sueros reconocían a la proteína, es decir daban valores positivos de densidad óptica a 492 nm y dichos valores eran equivalentes para ambas proteínas con cada uno de los sueros. Lo que demostraba que ambas proteínas se pueden utilizar indistintamente para diagnosticar a los pacientes.

REIVINDICACIONES

1. Molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1.

2. Molécula polinucleotídica que comprende una secuencia que híbrida con SEQ ID NO: 1 en condiciones fuertemente restrictivas.

3. Molécula polinucleotídica que comprende una secuencia con, al menos, un 70% de identidad con SEQ ID NO:1.

4. Molécula según la reivindicación 3 en que la identidad con SEQ ID NO: 1 es de, al menos, el 80%.

5. Molécula polinucleotídica que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2.

6. Molécula polinucleotídica que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un fragmento de SEQ ID NO: 2 con, al menos, un epítopo de Sin a 3 de *Sinapis alba*.

7. Molécula polinucleotídica que comprende una secuencia que codifica un polipéptido con las propiedades antigénicas y alergénicas de Sin a 3 de *Sinapis alba*.

8. Polipéptido aislado que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2.

9. Polipéptido aislado que comprende una secuencia con, al menos, un 70% de identidad con SEQ ID NO: 2 que conserva las características antigénicas de Sin a 3 de *Sinapis alba*.

10. Polipéptido según la reivindicación 9 en que la identidad con SEQ ID NO: 2 es de, al menos, el 80%.

11. Vector recombinante **caracterizado** porque comprende una secuencia de nucleótidos definida según las reivindicaciones 1 a 7.

12. Vector recombinante según la reivindicación 11 que comprende el plásmido pPICZαA.

13. Células eucariotas hospedadoras transfectadas con los vectores recombinantes de las reivindicaciones 11 ó 12.

14. Células eucariotas según la reivindicación 13 que pertenecen a la especie *Pichia pastoris*.

15. Células eucariotas según la reivindicación 14 que pertenecen a la cepa KM71.

16. Uso de cualquiera de las moléculas polinucleotídicas de las reivindicaciones 1-7 en el diagnóstico de la alergia a Sin a 3 de *Sinapis alba*.

17. Uso de cualquiera de los polipéptidos de las reivindicaciones 8-10 en el diagnóstico de la alergia a Sin a 3 de *Sinapis alba*.

18. Uso según la reivindicación 17 en el que el diagnóstico se realiza "*in vitro*" mediante técnicas inmunológicas.

19. Uso según la reivindicación 18 en el que la técnica inmunológica es el ELISA.

20. Uso de cualquiera de los polipéptidos de las reivindicaciones 8-10 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la alergia a Sin a 3 de *Sinapis alba*.

21. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 8-10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

22. Método para la purificación de cualquiera de los polipéptidos de las reivindicaciones 8-10 que comprende las siguientes etapas:

a) crecer en un medio de cultivo adecuado cualquiera de las células eucariotas definidas en las reivindicaciones 13-15;

b) separar las células del medio extracelular una vez finalizada la etapa a);

c) dializar el medio extracelular obtenido en la fase b)

d) utilizar el medio extracelular obtenido en la etapa c) en 2 etapas cromatográficas de penetrabilidad mediante resina de filtración en gel.

23. Método, según la reivindicación 22, en el que se añade una etapa e) de aplicación de una cromatografía de fase reversa de alta resolución (HPLC) al resultado de la etapa d).

24. Método para la purificación de Sin a 3 de *Sinapis alba* que comprende las siguientes etapas:

a) obtener el extracto proteico de las semillas de *Sinapis alba*;

b) utilizar el extracto proteico obtenido en 2 etapas cromatográficas de penetrabilidad mediante resina de filtración en gel.

25. Método, según la reivindicación 24, en el que se añade una etapa c) de aplicación de una cromatografía de fase reversa de alta resolución (HPLC) al resultado de la etapa b).

Fig. 1A

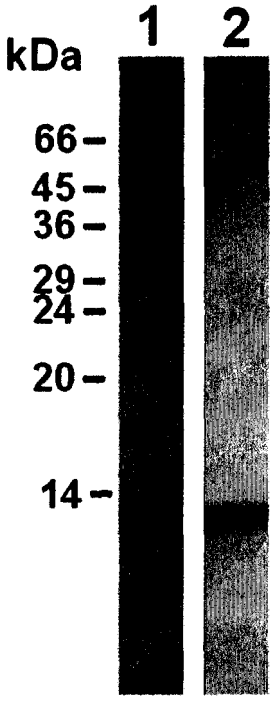
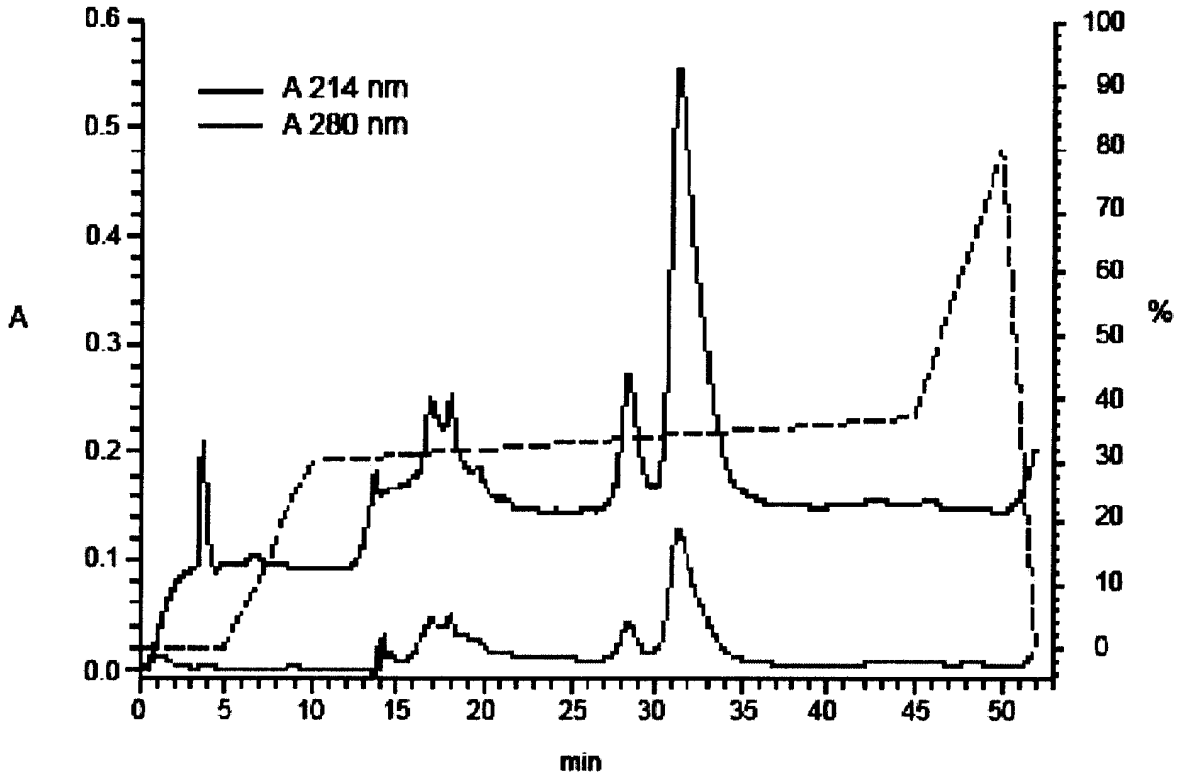


Fig. 1B


A 214 nm
A 280 nm
A
%
min
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Complutense de Madrid

<120> DNA que codifica el alérgeno de mostaza amarilla (*Sinapis alba*) Sin a 3, y sus aplicaciones.

<160> 8

<210> 1
<211> 279
<212> DNA
<213> *Sinapis alba*

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(279)

<400> 1

```
gct ctg agc tgt gga acc gtt aac agc aac ttg gca gca tgc att ggc   48
Ala Leu Ser Cys Gly Thr Val Asn Ser Asn Leu Ala Ala Cys Ile Gly
                 5                  10                  15

tac ttg acc caa aat gcg ccc ctc ccc aaa ggt tgc tgc acc ggc gtt   96
Tyr Leu Thr Gln Asn Ala Pro Leu Pro Lys Gly Cys Cys Thr Gly Val
            20                  25                  30

act aat ctg aac aac atg gct cgt aca acc ccg gac cgt cag caa gct  144
Thr Asn Leu Asn Asn Met Ala Arg Thr Thr Pro Asp Arg Gln Gln Ala
        35                  40                  45

tgt cgt tgc ctt gta gga gcc gct aac tcc ttc cct agt ctc aac gct  192
Cys Arg Cys Leu Val Gly Ala Ala Asn Ser Phe Pro Ser Leu Asn Ala
    50                  55                  60

gcc cgt gct gct gca ctt cct aag gca tgt gga gtc aat att cct tac  240
Ala Arg Ala Ala Ala Leu Pro Lys Ala Cys Gly Val Asn Ile Pro Tyr
65                  70                  75                  80

aaa atc agc aaa agc acc aac tgc aac agc gtt aga tga              279
Lys Ile Ser Lys Ser Thr Asn Cys Asn Ser Val Arg
                85                  90
```

<210> 2
<211> 92
<212> PRT
<213> *Sinapis alba*

<400> 2

```
Ala Leu Ser Cys Gly Thr Val Asn Ser Asn Leu Ala Ala Cys Ile Gly
 5                  10                  15

Tyr Leu Thr Gln Asn Ala Pro Leu Pro Lys Gly Cys Cys Thr Gly Val
            20                  25                  30

Thr Asn Leu Asn Asn Met Ala Arg Thr Thr Pro Asp Arg Gln Gln Ala
        35                  40                  45

Cys Arg Cys Leu Val Gly Ala Ala Asn Ser Phe Pro Ser Leu Asn Ala
    50                  55                  60

Ala Arg Ala Ala Ala Leu Pro Lys Ala Cys Gly Val Asn Ile Pro Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Ile Ser Lys Ser Thr Asn Cys Asn Ser Val Arg
                85                  90
```

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<222> (217)...(240)
<223> Cebador degenerado para PCR basado en secuencias internas de la proteína Sin a 3 de *Sinapis alba*

<400> 3

```
rtarggdatr ttracdccrc angc                                          24
```

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<222> (79)...(99)
<223> Cebador degenerado para PCR basado en secuencias internas de la proteína Sin a 3 de *Sinapis alba*

<400> 4

```
ggntgytgya cnggngtnac                                               20
```

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> *Sinapis alba*

<400> 5

ctgacggtcc ggggttgtac gagc 24

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> *Sinapis alba*

<400> 6

gctcgtacaa ccccggaccg tcag 24

<210> 7
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<222> (1)...(9)
<223> Sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Xho*I

<220>
<222> (10)...(15)
<223> Secuencia que codifica el prepropéptido α de *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
<222> (16)...(33)
<223> Cebador para PCR, basado en los nucleótidos 1 a 18 de SEQ ID NO: 1 de Sin a 3 de *Sinapis alba*

<400> 7

cgtctcgaga aaagagctct gagctgtgga acc 33

<210> 8
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<222> (1)...(10)
<223> Sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Not*I

<220>
<222> (11)...(31)
<223> Cebador para PCR, basado en los nucleótidos 279 a 259 de SEQ ID NO: 1 de Sin a 3 de *Sinapis alba*.

<400> 8

ctgcggccgc tcatctaacg ctgttgcagt t 31

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud:200900744

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 18.03.2009

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	2007 DATABASE EMBL “On line”. CONNER J.K et al. "Comparative cDNA sequencing in radish (Raphanus), a crop, weed, and model system in ecology and evolution". 05.12.2007. Nº Acceso EY909022. Esta secuencia muestra un 96.8% de identidad con respecto a SEQ.ID.Nº 1.	2-4
A	2007 PALOMARES O. et al. “Cloning, sequencing, and recombinant production of Sin a 2, an allergenic 11S globulin from yellow mustard seeds”. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 29. 04. 2007. Vol. 119, Nº. 5, páginas 1189–1196. ISSN 0091-6749.	1-25

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	Examinador	Página
15.12.2010	J. Manso Tomico	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/68 (01.01.2006)
C12N15/11 (01.01.2006)
G01N21/64 (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C12N, G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL, XPESP, EBI-SITE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1, 5-25	**SI**
	Reivindicaciones	2-4	**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1, 5-25	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DATABASE EMBL "On line". CONNER J.K et al. "Comparative cDNA sequencing in radish (Raphanus), a crop, weed, and modelsystem in ecology and evolution"". 05.12.2007. Nº Acceso EY909022. Esta secuencia muestra un 96.8% de identidad con respecto a SEQ.ID.Nº 1.	2007
D02	PALOMARES O. et al. "Cloning, sequencing, and recombinant production of Sin a 2, an allergenic 11S globulin from yellow mustard seeds". Journal of Allergy and Clinical Immunology. 29. 04. 2007. Vol. 119, Nº. 5, páginas 1189–1196. ISSN 0091-6749.	2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga el ADN que codifica el alérgeno Sin a 3, de semillas de mostaza amarilla (Sinapsis alba) . También divulga un método de aislamiento y purificación del alérgeno natural y a un método de purificación del alérgeno recombinante.

Las reivindicaciones 1-5 se refieren a una molécula polinucleotídica de secuencia SEQ.ID. Nº. 1, aquellas secuencias que hibridan con la misma en condiciones restrictivas y aquellas que comprenden al menos: 70 y 80% de identidad. D01 describe una secuencia polinucleotídica con una identidad del 96,8% con SEQ.ID.Nº.1. Por tanto, las reivindicaciones 2-4 no serían nuevas, según lo mencionado en el art. 6 de la LP. Sin embargo, de las búsqueda efectuada en las bases de datos de secuencias no se ha encontrado la secuencia de las reivindicaciones 1,5 (SEQ.ID.Nº 1), por lo que sí que serían nuevas respecto al estado de la técnica anterior.

Las secuencias recuperadas de las bases de datos de proteínas del sitio EBI, recuperadas de la búsqueda realizada sobre la materia reivindicada en las reivindicaciones 6-10 (SEQ.ID.Nº 2 y aquellos polipéptidos con distinto grado de identidad, pero que conservan las características antigénicas de Sin a 3) no anularían la novedad de la misma, por lo que las reivindicaciones 6-10 serían nuevas según lo mencionado en el art. 6 de la LP.

D02 se refiere a un método de producción, aislamiento y purificación recombinante del Sin a 2, otro alérgeno presente en las semillas de mostaza amarilla. A la luz de lo divulgado en este documento no se puede deducir, de una manera obvia para el experto en la materia, que la información contenida en el mismo se pudiera aplicar para la producción recombinante del alérgeno Sin a 3, por lo que las reivindicaciones 22-25 serían nuevas e inventivas, según lo mencionado en los arts. 6 y 8 de la LP.

También serían nuevas e inventivas las reivindicaciones referentes a los vectores y las células hospedadoras (reivindicaciones 11-15) utilizados para la expresión recombinante de la Sin a 3, así como los usos a los que se refieren las reivindicaciones 16-20 y la composición farmacéutica (reivindicación 21) que incluya los polipéptidos de las reivindicaciones 8-10.