



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 241 383**

② Número de solicitud: 200200562

⑤ Int. Cl.:

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C07K 16/14 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

② Fecha de presentación: **08.03.2002**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2005**

Fecha de la concesión: **22.02.2008**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
07.02.2007

④ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2008**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

⑦ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Gavilanes Franco, José G.;
Oñaderra Sánchez, Mercedes y
Martínez del Pozo, Álvaro**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Método de producción de variantes de ribotoxina.**

⑤ Resumen:

Método de producción de variantes de ribotoxina.

Para la producción de variantes de ribotoxina se ha clonado y expresado el DNA recombinante que codifica una variante de delección de la ribonucleasa fúngica extracelular α -sarcina. Las proteínas recombinantes expresadas en el procarionta *Escherichia coli*, o en el eucariota *Pichia pastoris*, se aíslan y purifican con gran rendimiento, están correctamente plegadas, y exhiben propiedades inmunológicas, enzimáticas y citotóxicas similares a las de las proteínas fúngicas naturales por lo que pueden ser empleadas en protocolos de diagnóstico y terapia.

ES 2 241 383 B2

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

DESCRIPCIÓN

Método de producción de variantes de ribotoxina.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, se refiere a una variante de la ribotoxina α -sarcina en la que se ha sustituido el fragmento correspondiente a la secuencia que comprende los aminoácidos 7 a 22 por dos Gly. Asimismo comprende las variantes recombinantes cuyas secuencias muestran más de un 60% de identidad con ella.

La invención también hace referencia a los DNA recombinantes que codifican tanto las proteínas completas como los fragmentos que incluyen secuencias con un 60% de identidad, y a moléculas homólogas como otras ribotoxinas u otras ribonucleasas fúngicas, producidas en organismos heterólogos recurriendo a la tecnología del DNA recombinante. El objeto de la invención consiste, además, en la producción de estas moléculas mediante tecnología recombinante en la bacteria *Escherichia coli* y en la levadura *Pichia pastoris*, lo que implica el uso de la secuencia SEQ ID NO: 1, o de otras secuencias nucleotídicas obtenidas por mutagénesis de SEQ ID NO: 1.

La invención proporciona un eficaz método de producción, aislamiento y purificación para estas proteínas, con un alto rendimiento, a fin de utilizarlas con fines terapéuticos y de diagnóstico.

Estado de la técnica

Las ribonucleasas fúngicas extracelulares constituyen una familia de proteínas con muy variadas funciones y secuencias, aunque todas ellas presentan elementos homólogos de estructura secundaria y centros activos muy parecidos. Dentro de esta gran familia destaca el grupo de las denominadas ribotoxinas. Las ribotoxinas son ribonucleasas microbianas extracelulares con propiedades citotóxicas y antitumorales (Olson, 1963, patente US3104204; Olson y Goerner, 1965, *Applied Microbiol.* 13, 314-321; Martínez-Ruiz *et al.*, 2001, *Methods Enzymol.* 341, 335-351). Estas funciones biológicas se basan en su capacidad para atravesar membranas e inactivar los ribosomas. Esta inactivación bloquea la maquinaria de biosíntesis proteica celular y produce la muerte por apoptosis (Olmo *et al.*, 2001, *Eur. J. Biochem.* 268, 2113-2123). La secuencia donde se produce la ruptura está presente en todos los RNA ribosomales conocidos. Sin embargo, estas proteínas muestran una cierta selectividad, siendo su acción mucho más efectiva cuando se trata de células tumorales o infectadas por ciertos virus. Esta selectividad radica precisamente en su capacidad para interaccionar con membranas biológicas y entrar en ciertas células. Es por ello también, y por su gran poder inmunogénico y estabilidad, por lo que participan en el establecimiento de la mayoría de las alergias frente a *Aspergillus* spp. y otros hongos filamentosos (Cramer, 1998, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 115, 99-114). Se ha probado cómo estas proteínas son los principales alérgenos responsables de este tipo de enfermedades (Cramer, 1998, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 115, 99-114; Hemmann *et al.*, 1999, *J. Allergy. Clin. Immunol.* 104, 601-607; Kao *et al.*, 2001, *Methods Enzymol.* 341, 324-335) y se ha producido en forma recombinante el principal alérgeno de *A. fumigatus*, la proteína rAspfl, con la idea de utilizarlo con fines diagnósticos (Arruda *et al.*, 1990 *J. Experi. Med.* 172, 1529-1532).

Pese a todo, su utilización en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades (principalmente procesos de carácter alérgico o cancerígeno) no ha sido posible hasta ahora debido a su extremada toxicidad. Las ribotoxinas son los inhibidores de la biosíntesis de proteínas más potentes que se conocen (Lamy *et al.*, 1992, *Genetically Engineered Toxins*, Ed. Marcel-Dekker, 237-257). Es, por tanto, del máximo interés poder disponer de formas suficientemente activas pero con su citotoxicidad y/o alergenidad atenuadas. La ribonucleasa U2 (RNasa U2) de *Ustilago sphaerogena* es la ribonucleasa fúngica extracelular no tóxica más próxima a las ribotoxinas, desde un punto de vista filogenético. Como todas las de la familia, comparte con ellas un núcleo estructural que comprende los elementos de estructura secundaria ordenada y el centro activo (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000, *J. Mol. Biol.* 299, 1061-1073). Sin embargo, la RNasa U2 presenta una especificidad enzimática completamente diferente y no parece ser capaz de interaccionar con membranas. Por ello, no es citotóxica. Disponer de formas recombinantes puras tanto de diversas ribotoxinas como de la RNasa U2, o de cualquier variante de las mismas obtenida por mutagénesis, permite el aislamiento de proteínas no naturales potencialmente aptas para su utilización en la diagnosis y el tratamiento terapéutico. Cuando se comparan las estructuras de ambas enzimas, α -sarcina y RNasa U2, se observa que la principal diferencia radica en la horquilla β amino-terminal de la primera. Como se ha probado que esta horquilla determina las características citotóxicas de la α -sarcina (García-Ortega *et al.*, 2001, *Protein Sci.* 10, 1658-1668), se decidió preparar una variante en la que este elemento de estructura se sustituyó por las dos Gly que constituyen el giro β presente en la posición equivalente en la RNasa U2.

Hasta la fecha, no se ha descrito la preparación de la variante objeto de la invención, pues se trata de una proteína no natural obtenida mediante la tecnología del DNA recombinante y distintas aproximaciones mutagénicas. Se ha descrito la producción de alguna de las proteínas naturales en forma recombinante (Arruda *et al.*, 1990, *J. Experi. Med.* 172, 1529-1532; Fitton, 1993, patente ZA9301832; Fitton, 1994, patente US5306626; Lacadena *et al.*, 1994, *Gene* 142, 147-151; Martínez-Ruiz *et al.*, 1998, *Protein Expression and Purification* 12, 315-322; Martínez-Ruiz *et al.*, 2000, *FEMS Microbiology Letters* 189, 165-169), pero éstas no reúnen las propiedades adecuadas para su utilización en diagnosis y terapia, por las razones apuntadas más arriba.

Explicación de la invención*Método de producción de variantes de ribotoxina*

5 La presente invención se refiere a la producción de una variante de α -sarcina que implica la sustitución del fragmento de secuencia que comprende los aminoácidos que ocupan las posiciones 7 a 22 por dos Gly, y de proteínas homólogas a ésta que se produzcan mediante la tecnología recombinante. Los organismos utilizados para su producción son el procariota *Escherichia coli* y el eucariota *Pichia pastoris*. La invención también se refiere a los protocolos de aislamiento y purificación utilizados.

10 Por medio del procedimiento objeto de la invención, se obtienen moléculas de DNA recombinante que codifican polipéptidos que exhiben la funcionalidad de las ribotoxinas y/o de la RNasa U2, y que, en muchos casos, son hipocitotóxicas y/o hipoalérgicas.

15 Además, la invención dispone de secuencias polinucleotídicas 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 derivan de ellas por degeneración del código genético, inserción, delección o mutagénesis.

20 El procedimiento de obtención de esta proteína recombinante, Δ (7-22)sarcina, incluye vectores de expresión y células huésped que contengan una secuencia de nucleótidos como la descrita en SEQ ID NO: 1 codificante de Δ (7-22)sarcina, proteínas homólogas o fragmentos suyos.

25 Mediante el procedimiento objeto de esta invención se obtienen polipéptidos con actividad enzimática endorribonucleolítica, con capacidad para interactuar con membranas lipídicas y/o propiedades antigénicas como las de las ribotoxinas y/o la RNasa U2. Estos polipéptidos pueden contener la secuencia caracterizada por SEQ ID NO: 1 y 2, o sus homólogas, unidas a otros polipéptidos (por ejemplo, como proteínas de fusión o como proteínas quiméricas), o haber sido modificados química o enzimáticamente.

30 Los métodos de preparación de estos polipéptidos implican su producción recombinante a partir de las moléculas polinucleotídicas anteriormente mencionadas, en sistemas de cultivo de células procariotas y eucariotas que contienen como vehículo de esos DNA los vectores de expresión descritos. Una vez producida la molécula polipeptídica concreta, ésta es aislada en forma soluble mediante el adecuado fraccionamiento de las células y el medio extracelular, utilizando cromatografías de intercambio iónico y penetrabilidad, según se describe más adelante.

35 Los productos obtenidos mediante el procedimiento objeto de la invención presentan actividad ribonucleolítica y/o capacidad para interactuar con membranas lipídicas, así como reacción cruzada con anticuerpos IgG e IgE del suero de pacientes alérgicos a hongos filamentosos, como los de *Aspergillus* spp., sensibles a rAspfl (el alérgeno principal de la alergia frente a *Aspergillus*) (Arruda *et al.*, 1990 *J. Experi. Med.* 172, 1529-1532), o segmentos antigénicos suyos.

40 Finalmente, con el procedimiento objeto de la invención se dispone de moléculas homólogas a las ribotoxinas, pero con propiedades biológicas alteradas, tanto a nivel de su actividad y especificidad enzimática, como de su capacidad para atravesar membranas, y, en muchos casos, además son hipoalérgicas. Por ello, se pueden utilizar para ser incorporadas para la fiel diagnosis de la hipersensibilidad a *Aspergillus* spp. y a otros hongos filogenéticamente relacionados con ellos. Además, también se pueden emplear en las preparaciones de alérgenos que se utilizan para llevar a cabo la inmunoterapia correspondiente para el tratamiento de la alergia a *Aspergillus*. Asimismo, estas moléculas (o sus fragmentos, o las proteínas quiméricas y de fusión construidas con ellas) se pueden utilizar como agentes antitumorales y/o antivirales, pues retienen muchas de las propiedades de las ribotoxinas pero muestran una mayor selectividad frente a las células diana o una menor citotoxicidad general. En cuanto a su empleo en forma de proteínas de fusión, o de proteínas quiméricas, también se contempla su utilización formando parte de inmunotoxinas específicamente dirigidas contra células tumorales.

55 En resumen, lo que la invención aporta es un método reproducible y estandarizado para la producción y aislamiento de proteínas homólogas a las ribotoxinas que sean lo suficientemente tóxicas y/o alérgicas como para poder ser utilizadas en distintos procedimientos de terapia y diagnosis, pero que carezcan de las propiedades de toxicidad y alergenidad propias de las proteínas fúngicas naturales. Propiedades que, hasta ahora, han impedido su utilización clínica.

Modo de realización de la invención

60 En el procedimiento de obtención de la proteína recombinante Δ (7-22)sarcina se utilizaron los conocimientos acumulados durante los procesos de donación y producción de las proteínas naturales, Δ (7-22)sarcina y RNasa U2, también en forma recombinante (Lacadena *et al.*, *Gene* 142, 147-151, 1994; Martínez-Ruiz *et al.*, *Protein Expression and Purification* 12, 315-322, 1998; Martínez-Ruiz *et al.*, *FEMS Microbiology Letters* 189, 165-169, 2000). Así, a partir de las secuencias nucleotídicas conocidas de estas proteínas se diseñaron los desoxioligonucleótidos necesarios para construir los mutantes mediante técnicas de mutagénesis dirigida clásica, ya utilizadas en la preparación de otros mutantes puntuales (Lacadena *et al.* *Biochem. J.* 309, 581-586, 1995; Lacadena *et al.*, *Proteins* 37, 474-484, 1999; García-Ortega *et al.* *Prot. Sci.* 10, 1658-1668, 2001; Martínez-Ruiz *et al.*, *Methods Enzymol.* 341, 335-351, 2001).

ES 2 241 383 B2

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

- *Mutagénesis dirigida*

5 El método empleado fue el que se conoce como Método de Kunkel (Kunkel *et al*, *Methods Enzymol.* 154, 367-382,1987). Se disponía del DNA codificante de la secuencia original de las proteínas nativas, donado en distintos vectores. Uno de ellos permite su biosíntesis en forma de DNA de una única hebra, mediante la utilización de *E. coli* con genotipo F⁺ y la utilización del fago filamentoso F1. Estas hebras de cadena sencilla, que además se enriquecieron en uridina, mediante el empleo de cepas de *E. coli* que también tuviesen un genotipo *ung⁻ dut⁻*, se utilizaron como molde
10 para llevar a cabo la mutagénesis y construir los mutantes objeto de la invención. El desoxioligonucleótido mutagénico empleado para la preparación de $\Delta(7-22)$ sarcina fue 5'-GTGACCTGGACCTGCGGGCGGCCTCCTCTACAACCAG-3'. Tras la correspondiente elongación y ligación *in vitro*, se transformaron células *E. coli ung⁺ dut⁺* y se seleccionaron las colonias que contenían las secuencias de DNA mutantes, cuya estructura se confirmó mediante secuenciación.

15 - *Producción en Escherichia coli*

Para la producción recombinante de estas proteínas en *E. coli* la correspondiente secuencia codificante de DNA fue ligada a los plásmidos pINPG (Lacadena *et al.*, *Gene* 142, 147-151,1994) o pET (Novagen). Se utilizaron construcciones que implicaban la fusión de las secuencias codificantes a la del péptido señal de la proteína OmpA de *E. coli*, lo
20 que permite su exportación al periplasma y su correcto procesamiento. Las células utilizadas fueron de la cepa BL21 (DE3). La inducción se llevó a cabo mediante la adición de distintas cantidades de IPTG durante la fase logarítmica de crecimiento de las bacterias. Tras la correspondiente incubación a 37°C durante 16-36 horas, las bacterias se trataron según protocolos estándar para obtener las distintas fracciones celulares que contenían las proteínas recombinantes en estado soluble y estas fracciones se utilizaron para llevar a cabo su purificación. Este proceso de fraccionamiento se
25 detalla en Martínez-Ruiz *et al.*, *Methods Enzymol* 341, 335-351, 2001.

- *Producción en Pichia pastoris*

En este caso, los vectores empleados para ligar las secuencias codificantes de las proteínas recombinantes fueron
30 pHILD2, pHILS1, pPIC9 y pPICZ α (Invitrogen). Células GS115 o KM71, convenientemente transformadas con las construcciones correspondientes, se cultivaron primero en medio mínimo tamponado de glicerol (BMY), no inductor, para conseguir buenos niveles de densidad celular. Una vez alcanzado este punto, las células se recogieron mediante centrifugación y se volvieron a resuspender en el medio inductor, medio mínimo tamponado de metanol (BMM). Estas células se incubaron a 30°C durante 2-4 días, con fuerte agitación añadiendo metanol cada 12 horas (concentración
35 final del 0.5%) para que la producción de las proteínas recombinantes fuese máxima. Una vez acabado el cultivo, se separó el medio extracelular mediante ultracentrifugación y se utilizó como punto de partida para llevar a cabo el aislamiento y la purificación de las proteínas.

Purificación de $\Delta(7-22)$ sarcina

40 Esta purificación se llevó a cabo mediante dos etapas, una cromatografía de intercambio iónico en Amberlita IRC 50 y una cromatografía de penetrabilidad en Biogel P10. Cuando fue necesario concentrar las distintas fracciones de proteína se recurrió a la liofilización o a la ultrafiltración. Los cambios de pH y/o de tampón se llevaron a cabo mediante diálisis o cromatografía de penetrabilidad en Biogel P2. Este procedimiento rinde una preparación de proteína de
45 una pureza superior al 99% de acuerdo con su comportamiento en HPLC y PAGE-SDS, con su composición de aminoácidos y con sus características espectroscópicas. Además, es reconocida por el anticuerpo policlonal específico de la α -sarcina fúngica natural.

50

55

60

65

ES 2 241 383 B2

REIVINDICACIONES

- 5 1. Moléculas de DNA recombinante **caracterizadas** por SEQ ID NO: 1 que codifican péptidos con actividad ribonucleolítica y que poseen al menos un epítipo alergénico común con el alergeno principal de *Aspergillus spp.* denominado Aspfl.
- 10 2. Moléculas de DNA recombinante **caracterizadas** por SEQ ID NO: 1 que codifican péptidos con propiedades citotóxicas y/o alergénicas atenuadas.
- 15 3. Moléculas de DNA recombinante **caracterizadas** por SEQ ID NO: 1 que codifican péptidos con capacidad alterada, con respecto a la α -sarcina, para interactuar con membranas lipídicas.
- 20 4. Moléculas de DNA recombinante, según reivindicaciones anteriores, o modificaciones de las mismas, que codifican polipéptidos unidos a un polipéptido adicional, o modificados química o enzimáticamente.
- 25 5. Polipéptidos recombinantes de $\Delta(7-22)$ sarcina, o fragmentos de dichos polipéptidos, **caracterizados** por la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 y 2, que presentan la antigenicidad de, al menos, un epítipo de Aspfl.
- 30 6. Polipéptidos recombinantes de $\Delta(7-22)$ sarcina, o fragmentos de dichos polipéptidos, **caracterizados** por la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 y 2, que presentan actividad ribonucleolítica alterada con respecto a la α -sarcina y la RNasa U2.
- 35 7. Polipéptidos recombinantes de $\Delta(7-22)$ sarcina, o fragmentos de dichos polipéptidos, **caracterizados** por la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 y 2, que presentan actividad citotóxica alterada con respecto a la α -sarcina y la RNasa U2.
- 40 8. Polipéptidos recombinantes de $\Delta(7-22)$ sarcina, o fragmentos de dichos polipéptidos, **caracterizados** por la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 y 2, que presentan una capacidad alterada para interactuar con membranas con respecto a la α -sarcina y la RNasa U2.
- 45 9. Un vector de expresión procariota, y preferentemente pINPG o pET, que contenga cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas en las reivindicaciones 1 a 4, y que permita la producción recombinante de cualquiera de los polipéptidos según reivindicaciones 5 a 8.
- 50 10. Un vector de expresión eucariota, y preferentemente pHILD2, pHILS1, pPIC9 o pPICZ α , que contenga cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas en las reivindicaciones 1 a 4, y que permita la producción recombinante de cualquiera de los polipéptidos según reivindicaciones 5 a 8.
- 55 11. Un organismo hospedador procariota, transformado con un vector según reivindicación 9.
- 60 12. Un organismo hospedador eucariota, transformado con un vector según reivindicación 10.
- 65 13. Un método para producir los polipéptidos recombinantes descritos en las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8, utilizando un vector de expresión como el descrito en la reivindicación 9 en el sistema procariota de bacteria *Escherichia coli* y preferentemente de la cepa BL21(DE3), **caracterizado** por una cromatografía de intercambio fónico en Amberlita IRC-50 y una de penetrabilidad en Biogel P10.
- 70 14. Un método para producir los polipéptidos recombinantes descritos en las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8, utilizando un vector de expresión como el descrito en la reivindicación 10 en el sistema eucariota de levadura *Pichia pastoris* y preferentemente de las cepas GS115 y KM71, **caracterizado** por una cromatografía de intercambio iónico en Amberlita IRC-50 y una de penetrabilidad en Biogel P10.
- 75 15. Utilización de las moléculas, según reivindicaciones 1-8, en el diagnóstico *in vitro* de la alergia.
- 80 16. Aplicación de las moléculas recombinantes, según reivindicaciones 1-8, para el diseño de vacunas destinadas a la inmunoterapia de la alergia.
- 85 17. Aplicación de las moléculas recombinantes según reivindicaciones 1-8 para producir péptidos que contengan al menos un epítipo T del alergeno Aspfl y sean capaces de actuar como vacunas.
- 90 18. Aplicación de las moléculas recombinantes, según reivindicaciones 1-8, para la producción de isoformas recombinantes hipoalergénicas que tengan disminuida o anulada su unión a IgE para el tratamiento de alergias.
- 95 19. Aplicación de las moléculas recombinantes, según reivindicaciones 1-8, para la producción de polipéptidos recombinantes con citotoxicidad modificada.

ES 2 241 383 B2

Texto libre de la lista de secuencias

SEQ ID NO: 1

5 La secuencia de DNA correspondiente a los residuos 7 a 22 de la α -sarcina fue deletada. Esta secuencia de DNA corresponde a una horquilla β que sobresale del núcleo estructural principal de la α -sarcina.

10 La secuencia de DNA correspondiente a dos Gly fue insertada. Estas dos glicocolas aparecen en una posición equivalente en la RNasa U2 y permiten el establecimiento de un giro β necesario para que la proteína se pliegue correctamente.

SEQ ID NO: 2

15 La secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 7 a 22 de la α -sarcina ha sido deletada. Esta secuencia de aminoácidos corresponde a una estructura de horquilla β presente en el extremo amino-terminal de la α -sarcina. Esta estructura sobresale del núcleo estructural principal de la α -sarcina

20 Se insertaron dos residuos de Gly. Estas dos glicocolas están presentes en la RNasa U2 y permiten el establecimiento de un giro β necesario para que la proteína se pliegue correctamente.

LISTA DE SECUENCIAS

25 <110> Universidad Complutense de Madrid

<120> Método de producción de variantes de ribotoxina

<160> 2

30 <210> 1

<211> 424

<212> DNA

35 <213> Artificial Sequence

<220>

<222> (19)...(24)

40 <223> The DNA sequence corresponding to α -sarcin amino acid residues 7 to 22 has been deleted. This DNA corresponds to a β -hairpin structure which protudes out of the α -sarcin main structural core.

<220>

45 <222> (19)...(24)

<223> The DNA sequence corresponding to two Gly residues has been inserted. These two Gly are present in RNase U2 and allow the establishment of a β -turn required for the correct folding of the protein.

50

55

60

65

ES 2 241 383 B2

<400> 1

```

5      gcg gtg acc tgg acc tgc ggc ggc ctc ctc tac aac cag aac aag gcc  48
      Ala Val Thr Trp Thr Cys Gly Gly Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala
           5                               10                               15

10     gag agc aac tcg cac cat gcg cct ctc tcc gac ggc aag acc ggg agc  96
      Glu Ser Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser
           20                               25                               30

15     agc tat cct cac tgg ttc acc aac ggt tat gat ggc gat gga aag ctc 144
      Ser Tyr Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu
           35                               40                               45

20     ccc aag ggc cgc acg ccc atc aag ttc gga aaa tcc gac tgt gac cgt 192
      Pro Lys Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg
           50                               55                               60

25     cct ccc aag cac agc aag gac gga aac ggc aag act gat cac tac ctg 240
      Pro Pro Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu
           65                               70                               75                               80

30     ctg gag ttc cca acc ttc cct gat ggc cat gac tac aag ttt gat tcg 288
      Leu Glu Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser
           85                               90                               95

35     aag aag ccc aag gaa aat cct ggc ccg gcg cgg gtc atc tac acc tat 328
      Lys Lys Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr
           100                               105                               110

40     cct aac aag gtg ttc tgt ggt atc att gct cat act aag gag aac cag 376
      Pro Asn Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Lys Glu Asn Gln Gly Glu
           115                               120                               125

45     ggc gaa ctt aag ctc tgc tct cat tag 424
      Lys Val Leu Lys Leu Cys Ser His
           130                               135

```

45 <210> 2

<211> 136

<212> PRT

50 <213> Artificial Sequence

<220>

<222> (7)...(8)

55 <223> The amino acid sequence corresponding to α -sarcin amino acid residues 7 to 22 has been deleted. This amino acid sequence corresponds to the α -sarcin amino-terminal β -hairpin. This structure protrudes out of the α -sarcin main structural core.

<220>

60 <222> (7)...(8)

<223> Two Gly residues have been inserted. These two Gly are present in RNase U2 and allow the establishment of β -turn required for the correct folding of the protein.

65

ES 2 241 383 B2

<400> 2

5 Ala Val Thr Trp Thr Cys Gly Gly Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala
 5 10 15
 Glu Ser Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser
 20 25 30
 10 Ser Tyr Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu
 35 40 45
 Pro Lys Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg
 50 55 60
 15 Pro Pro Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu
 65 70 75 80
 20 Leu Glu Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser
 85 90 95
 Lys Lys Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr
 100 105 110
 25 Pro Asn Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Lys Glu Asn Gln Gly Glu
 115 120 125
 30 Lys Val Leu Lys Leu Cys Ser His
 130 135

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 241 383

② Nº de solicitud: 200200562

③ Fecha de presentación de la solicitud: **08.03.2002**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.7:** C12N 15/56, 9/22, C07K 16/14, G01N 33/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 524768 A2 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 27.01.1993, todo el documento.	1-19
A	EP 1104768 A1 (COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH) 06.06.2001, todo el documento.	1-19
A	SACCO, G. et al. "The primary structure of the cytotoxin alpha-sarcin". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 10 de mayo de 1983. Vol. 258, nº 9, páginas 5811-5818, todo el documento.	1-19

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

31.08.2005

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1