

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 259 251**

21 Número de solicitud: 200301352

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/56** (2006.01)  
**C12N 9/22** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**A61K 39/35** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **06.06.2003**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2006**

Fecha de la concesión: **30.04.2007**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.2007**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2007**

73 Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid  
Rectorado - Avenida de Séneca, 2  
28040 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Gavilanes Franco, José G.;  
Oñaderra Sánchez, Mercedes;  
Lacadena García-Gallo, Javier y  
Martínez del Pozo, Álvaro**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Variante hipoalergénica de Asp1 de "Aspergillus fumigatus", método de producción y aplicaciones.**

57 Resumen:

Variante hipoalergénica de Asp1 de "Aspergillus fumigatus", método de producción y aplicaciones.

Para la producción de una variante hipoalergénica de Asp1 se ha clonado y expresado el DNA recombinante que codifica una variante de delación de esta ribonucleasa fúngica. Las proteína mutante recombinante expresada en el procarionta *Escherichia coli*, o en el eucariota *Pichia pastoris*, se aísla y purifica con gran rendimiento, está correctamente plegada, y exhibe propiedades inmunológicas, enzimáticas y citotóxicas similares a las de las proteínas fúngicas naturales, pero es hipoalergénica y su citotoxicidad se encuentra significativamente atenuada, por lo que puede ser empleada en protocolos de diagnóstico y terapia.

ES 2 259 251 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Variante hipoadérgica de Aspfl de *Aspergillus fumigatus*, método de producción y aplicaciones.

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 Aspfl en la que se ha sustituido el fragmento correspondiente a la secuencia que comprende los aminoácidos 6 a 21 (según la numeración original de la secuencia de la proteína natural) por dos Gly y se ha añadido un residuo de valina en su extremo amino-terminal, entre sus dos primeros residuos (Ala-1 y Thr-2).

La invención también hace referencia al DNA recombinante que la codifica, 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.

20 **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 de ribonucleótidos donde se produce la ruptura está presente en todos los ribosomas conocidos hasta la fecha. 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 interactuar 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 muchas 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 unos de 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 interactuar 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 las ribotoxinas y la de la RNasa U2, se observa que la principal diferencia radica en la horquilla  $\beta$  amino-terminal de la primera. Como se ha probado que esta horquilla es determinante para el mantenimiento de las características citotóxicas e inmunogénicas de la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina (García-Ortega *et al.*, 2001, *Protein Sci.* 10, 1658-1668; García-Ortega *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.* 277, 18632-18639; Patente de Invención N° P200200562), se decidió preparar una variante de Aspfl en la que este elemento de estructura se sustituyó por las dos Gly que constituyen el giro  $\beta$  presente en la posición equivalente en la RNasa U2 y en la que también se añadió un residuo extra de valina en su extremo amino-terminal, entre sus dos primeros aminoácidos (Ala-1 y Thr-2).

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 una variante equivalente de la  $\alpha$ -sarcina (García-Ortega *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.* 277, 18632-18639; Patente de Invención N° P200200562) pero esta ribotoxina no es el alérgeno natural y tiene propiedades inmunológicas significativamente distintas de las de Aspfl (Kao *et al.*, 2001, *Methods Enzymol.* 341, 324-335; Patente de Invención N° P200200562). Se ha descrito también 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;

## ES 2 259 251 B1

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 diagnóstico y terapia, por las razones apuntadas más arriba.

### 5 Explicación de la invención

*Método de producción de una variante hipoadérgica del alérgeno principal de Aspergillus fumigatus Aspfl*

La presente invención se refiere a la producción de una variante de Aspfl que implica la sustitución del fragmento de secuencia que comprende los aminoácidos que ocupan las posiciones 6 a 21 por dos Gly, así como la adición de un residuo de valina entre sus dos primeros aminoácidos (Ala-1 y Thr-2), y de proteínas homólogas a ésta que se produzcan mediante la tecnología recombinante. Los organismos utilizados para su producción son el procarionta *Escherichia coli* y el eucariota *Pichia pastoris*. La invención también se refiere a los protocolos de aislamiento y purificación utilizados.

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 hipoadérgicas.

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.

El procedimiento de obtención de esta proteína recombinante,  $\Delta(6-21)$ Aspfl, incluye vectores de expresión y células huésped que contengan una secuencia de nucleótidos como la descrita en SEQ ID NO: 1 codificante de  $\Delta(6-21)$ Aspfl, proteínas homólogas o fragmentos suyos.

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.

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 procariontas 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.

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.

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, además son hipoadérgicas. Por ello, se pueden utilizar para ser incorporadas para la fiel diagnóstico 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*.

En resumen, lo que la invención aporta es un método reproducible y estandarizado para la producción y aislamiento de una variante de delección de Aspfl carente de toxicidad y lo suficientemente hipoadérgica como para poder ser utilizadas en distintos procedimientos de terapia y diagnóstico.

### Modo de realización de la invención

En el procedimiento de obtención de la proteína recombinante  $\Delta(6-21)$ Aspfl se utilizan los conocimientos acumulados durante los procesos de clonación y producción de las proteínas naturales,  $\alpha$ -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 como la de una forma delecionada equivalente de la  $\alpha$ -sarcina (García-Ortega *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.* 277, 18632-18639; Patente de Invención N° P200200562). Así, a partir de las secuencias nucleotídicas conocidas de estas proteínas se diseñan los desoxiligonucleótidos necesarios para construir los mutantes mediante técnicas de mutagénesis dirigida clásica, ya utilizadas en la preparación de otros mutantes (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; Masip *et al.*, 2001, *European Journal of Biochemistry* 268, 6190-6196; García-Ortega *et al.*,

## ES 2 259 251 B1

2002, *J. Biol. Chem.* 277, 18632-18639; Solicitud de patente de Invención N° P200200562; Masip *et al.*, 2003, *Protein Science* 22 12, 161-169).

Un modo de realización preferente se ha llevado a cabo mediante las siguientes fases:

5

### - *Mutagénesis dirigida*

El método empleado es el que se conoce como Método de Kunkel (Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154, 367-382, 1987). Partiendo del DNA codificante de la secuencia original de la proteína Asp1 clonado en distintos vectores (Lacadena *et al.*, 1994, *Gene* 142, 147-151; Lacadena *et al.*, 1999, *Proteins* 37, 474-484), con un residuo de valina insertado en su extremo amino-terminal. 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 enriquecen en uridina, mediante el empleo de cepas de *E. coli* con un genotipo *ung<sup>-</sup> dut<sup>-</sup>*, se utilizan como molde para llevar a cabo la mutagénesis y construir los mutantes objeto de la invención. El desoxiionucleótido mutagénico empleado para la preparación de  $\Delta(6-21)$ Asp1 es 5'-GTCACCTGGACATGCGGCGGCCTTCTA TACAATCAA-3'. Tras la correspondiente elongación y ligación *in vitro*, se transforman células *E. coli ung<sup>+</sup> dut<sup>+</sup>* y se seleccionan las colonias que contenían las secuencias de DNA mutantes, cuya estructura se confirma mediante secuenciación.

### 20 - *Producción en Escherichia coli*

Para la producción recombinante de estas proteínas en *E. coli* la correspondiente secuencia codificante de DNA se liga a los plásmidos pINPG (Lacadena *et al.*, *Gene* 142, 147-151, 1994) o pET (Novagen). Se utilizan construcciones que implican la fusión de las secuencias codificantes a la del péptido señal de la proteína OmpA de *E. coli*, lo que permite su exportación al periplasma y su correcto procesamiento. Las células utilizadas son de la cepa BL21(DE3). La inducción se lleva 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 utilizan para llevar a cabo su purificación. Este proceso de fraccionamiento se 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 son pHILD2, pHILS1, pPIC9 y pPICZ $\alpha$  (Invitrogen). Células GS115 o KM71, convenientemente transformadas con las construcciones correspondientes, se cultivan 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 recogen mediante centrifugación y se vuelven a resuspender en el medio inductor, medio mínimo tamponado de metanol (BMM). Estas células se incuban a 30°C durante 2-4 días, con fuerte agitación añadiendo metanol cada 12 horas (concentración final del 0.5%) para que la producción de las proteínas recombinantes sea máxima. Una vez acabado el cultivo, se separa el medio extracelular mediante ultracentrifugación y se utiliza como punto de partida para llevar a cabo el aislamiento y la purificación de las proteínas.

### 45 *Purificación de $\Delta(6-21)$ Asp1*

Esta purificación se lleva a cabo mediante dos etapas, una cromatografía de intercambio iónico en Amberlita IRC 50 y una cromatografía de penetrabilidad en Biogel P10. Cuando es necesario concentrar las distintas fracciones de proteína se recurre a la liofilización o a la ultrafiltración. Los cambios de pH y/o de tampón se llevan a cabo mediante diálisis o cromatografía de penetrabilidad en Biogel P2. Este procedimiento rinde una preparación de proteína de 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  $\alpha$ -sarcina y la Asp1 fúngicas y naturales.

### 55 **Texto libre de la lista de secuencias**

SEQ ID NO: 1

La secuencia de DNA correspondiente a los residuos 6 a 21 de Asp1 fue delecionada. Esta secuencia de DNA corresponde a una horquilla  $\beta$  que sobresale del núcleo estructural principal de la  $\alpha$ -sarcina.

Se insertó una secuencia de DNA que codificaba la incorporación de dos Gly. Estas dos glicolinas aparecen en una posición equivalente en la RNasa U2 y permiten el establecimiento de un giro  $\beta$  necesario para que la proteína se pliegue correctamente.

65 La secuencia contiene además un codón correspondiente a un residuo de valina en su porción amino-terminal, situado entre los que serían los dos primeros residuos de la proteína fúngica natural Asp1 (Ala-1 y Thr-2).

## ES 2 259 251 B1

SEQ ID NO: 2

La secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 6 a 21 de la Asp1 ha sido delecionada. Esta secuencia de aminoácidos corresponde a una estructura de horquilla  $\beta$  presente en el extremo amino-terminal de la  $\alpha$ -sarcina.  
5 Esta estructura sobresale del núcleo estructural principal de la  $\alpha$ -sarcina.

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

10 La secuencia contiene además un residuo de valina en su porción amino-terminal, situado entre los que serían los dos primeros residuos de la proteína fúngica natural Asp1 (Ala-1 y Thr-2).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 259 251 B1

## 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 alérgeno 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  $\alpha$ -sarcina y Aspfl, para interactuar con membranas lipídicas.
- 20 4. Moléculas de DNA recombinante, según reivindicaciones anteriores, o modificaciones de dichas moléculas, que codifican polipéptidos unidos a un polipéptido adicional, o modificados química o enzimáticamente.
- 25 5. Polipéptidos recombinantes de  $\Delta(6-21)$ Aspfl, o fragmentos de dichos polipéptidos, según reivindicaciones anteriores, **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  $\Delta(6-21)$ Aspfl, o fragmentos de dichos polipéptidos, según reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, **caracterizados** por la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 y 2, que presentan actividad ribonucleolítica alterada con respecto a la  $\alpha$ -sarcina, las Aspfl y la RNasa U2.
- 35 7. Polipéptidos recombinantes de  $\Delta(6-21)$ Aspfl, o fragmentos de dichos polipéptidos, según reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, **caracterizados** por la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 y 2, que presentan actividad citotóxica alterada con respecto a la  $\alpha$ -sarcina, las Aspfl y la RNasa U2.
- 40 8. Polipéptidos recombinantes de  $\Delta(6-21)$ Aspfl, o fragmentos de dichos polipéptidos, según reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, **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  $\alpha$ -sarcina, la Aspfl 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 $\alpha$ , 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 polipéptidos recombinantes, según reivindicaciones 5, 6, 7, 8, 9 y 11, en el sistema procariota de bacteria *Escherichia coli* y preferentemente de la cepa BL21(DE3), **caracterizado** porque se realiza una purificación mediante una cromatografía de intercambio iónico en Amberlita IRC-50 y una de penetrabilidad en Biogel P10.
14. Un método para producir polipéptidos recombinantes, según reivindicaciones 5, 6, 7, 8, 10 y 12, en el sistema eucariota de levadura *Pichia pastoris* y preferentemente de las cepas GS115 y KM71, **caracterizado** porque se realiza una purificación mediante una cromatografía de intercambio iónico en Amberlita IRC-50 y una de penetrabilidad en Biogel P10.
15. Utilización de los polipéptidos, según reivindicaciones 5-8, en el diagnóstico *in vitro* de la alergia.
16. Aplicación de las moléculas recombinantes, según reivindicaciones 1-4, para el diseño de vacunas destinadas a la inmunoterapia de la alergia.
17. Aplicación de las moléculas recombinantes según reivindicaciones 1-4 para producir péptidos que contengan al menos un epítipo T del alérgeno Aspfl y sean capaces de actuar como vacunas.
18. Aplicación de las moléculas recombinantes, según reivindicaciones 1-4, para la producción de isoformas recombinantes hipoalergénicas que tengan disminuida o anulada su unión a IgE para el tratamiento de alergias.
19. Aplicación de las moléculas recombinantes, según reivindicaciones 1-4, para la producción de polipéptidos recombinantes con citotoxicidad modificada.

# ES 2 259 251 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Universidad Complutense de Madrid  
<120> Método de producción de una variante hipoalérgica del alérgeno principal de *Aspergillus fumigatus* Asp1.
- <160> 2
- 10 <210> 1  
<211> 424  
<212> DNA
- 15 <213> Artificial Sequence
- <220>  
<222> (19)...(24)
- 20 <223> The DNA sequence corresponding to Asp1 amino acid residues 6 to 21 has been deleted. This DNA corresponds to a  $\beta$ -hairpin structure which protrudes out of the Asp1 main structural core.
- <220>  
<222> (19)...(24)
- 25 <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  $\beta$ -turn required for the correct folding of the protein.
- <220>  
<222> (4)...(6)
- 30 <223> The DNA sequence corresponding to an additional valine residue located between Asp1 residues 1 and 2, and absent in the natural fungal protein, has been incorporated.
- 35 <400> 1
- |   |             |
|---|-------------|
| gcg gtc acc tgg aca tgc ggc ggc ctt cta tac aat caa gcc aaa gcc | 48          |
| Ala Val Thr Trp Thr Cys Gly Gly Leu Leu Tyr Asn Gln Ala Lys Ala |             |
|   | 5 10 15     |
| gaa agc aac tcc cac cac gca cct ctt tcc gac ggc aag acc ggt agc | 96          |
| Glu Ser Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser |             |
|   | 20 25 30    |
| agc tac ccg cac tgg ttc act aac ggt tac gac ggg aat ggc aag ctc | 144         |
| Ser Tyr Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asn Gly Lys Leu |             |
|   | 35 40 45    |
| atc aag ggt cgc acg ccc atc aaa ttc gga aaa gcc gac tgt gac cgt | 192         |
| Ile Lys Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ala Asp Cys Asp Arg |             |
|   | 50 55 60    |
| ccc ccg aag cac agc cag aac ggc atg ggc aag gat gac cac tac ctg | 240         |
| Pro Pro Lys His Ser Gln Asn Gly Met Gly Lys Asp Asp His Tyr Leu |             |
|   | 65 70 75 80 |

65

## ES 2 259 251 B1

```

ctg gag ttc cca act ttt cca gat ggc cac gac tat aag ttt gac tcg 288
Leu Glu Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser
5          85          90          95

aag aag ccc aag gaa gac ccg ggc cca gcg agg gtc atc tat act tat 328
Lys Lys Pro Lys Glu Asp Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr
10          100          105          110

ccc aac aag gtg ttt tgc ggc att gtg gcc cat cag cgg ggg aat cag 376
Pro Asn Lys Val Phe Cys Gly Ile Val Ala His Gln Arg Gly Asn Gln
15          115          120          125

gga gac ttg aga ctg tgt tct cat tag 424
Gly Asp Leu Arg Leu Cys Ser His
20          130          135

<210> 2
<211> 136
25 <212> PRT
   <213> Artificial Sequence

<220>
30 <222> (7)...(8)
   <223> The amino acid sequence corresponding to Aspfl amino acid residues 6 to 21 has been deleted. This amino
   acid sequence corresponds to the Aspfl amino-terminal  $\beta$ -hairpin. This structure protrudes out of the Aspfl
   main structural core.
35

<220>
   <222> (7)...(8)
   <223> Two Gly residues have been inserted. These two Gly are present in RNase U2 and allow the establishment of
40 a  $\beta$ -turn required for the correct folding of the protein.

<220>
   <222> (2)
45 <223> An additional valine residue located between Aspfl residues 1 and 2, and absent in the natural fungal protein,
   has been incorporated.

<400> 2
50 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
55          20          25          30

Ser Tyr Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asn Gly Lys Leu
60          35          40          45

```

65



# ES 2 259 251 B1

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



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 259 251

② Nº de solicitud: 200301352

③ Fecha de presentación de la solicitud: 06.06.2003

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	GARCÍA-ORTEGA, L. et al. "Deletion of the NH2-terminal beta-hairpin of the ribotoxin alpha-Sarcin produces a nontoxic but active ribonuclease". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 24.05.2002. Vol. 277, Nº 21, páginas 18632-18639, todo el documento.	1-19
Y	PROTEIN SEQUENCE DATABASE [en línea], NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. 19.07.2000. "Major allergen I 18 kDa antigen [Aspergillus fumigatus]. Número de acceso AAF86369, resumen & SARMA, P.V.G.K. et al. "Expression of an epitopic region of Aspfl, an allergen/antigen/cytotoxin of Aspergillus fumigatus". IMMUNOLOGY LETTERS. 1999. Vol. 70, páginas 151-155, 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

16.08.2006

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N 15/56** (2006.01)

**C12N 9/22** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**A61K 39/35** (2006.01)

**A61P 37/04** (2006.01)