



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 293 749**

② Número de solicitud: 200301353

⑤ Int. Cl.:

**C12N 15/29** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**A61K 39/36** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **06.06.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2008**

Fecha de la concesión: **26.02.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2009**

⑰ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid  
Rectorado - Avenida de Séneca, 2  
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Rodríguez García, Rosalía;  
Villalba Díaz, María Teresa y  
Batanero Cremadres, Eva**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Variante recombinante del alergeno Frae1 del polen de fresno "*Fraxinus excelsior*", producción en la levadura *Pichia pastoris* y aplicaciones.**

㉓ Resumen:

Variante recombinante del alergeno Frae1 del polen de fresno "*Fraxinus excelsior*", producción en la levadura *Pichia pastoris* y aplicaciones.

La invención consiste en la producción de la proteína Frae1, mediante tecnología recombinante en la levadura *Pichia pastoris*, que implica el uso de las secuencias nucleotídicas caracterizadas por SEQ ID NO: 1 y 2 o de otras secuencias nucleotídicas obtenidas por mutagénesis de la secuencia SEQ ID NO: 1 y 2. Para ello se ha aislado a partir de polen de *Fraxinus excelsior*, purificado y caracterizado un alergeno principal que es reconocido por más del 65% de los pacientes alérgicos a esta fuente biológica. Se ha clonado y expresado el DNA recombinante que codifica el alergeno Frae1 de polen de fresno (*Fraxinus excelsior*). La proteína recombinante producida en la levadura (*Pichia pastoris*) aísla con gran rendimiento, está correctamente plegada y exhibe propiedades inmunológicas equivalentes a las del alergeno natural por lo que tanto ella como las proteínas homólogas, las formas modificadas derivadas de ellas, los fragmentos derivados que contengan al menos un epítipo alergénico, pueden ser empleadas en protocolos de diagnóstico e inmunoterapia.

ES 2 293 749 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Variante recombinante del alérgeno Frae1 del polen de fresno "*Fraxinus excelsior*", producción en la levadura *Pichia pastoris* y aplicaciones.

### Objeto de la invención

La presente invención, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, se refiere a uno de los alérgenos del polen de fresno (*Fraxinus excelsior*), la proteína Frae1, y a epítomos alérgénicos presentes en la proteína. La invención también hace referencia a los DNAs recombinantes que codifican tanto para la proteína completa como para fragmentos que incluyen al menos un epítomo de la molécula. En concreto el objeto de la invención consiste en la producción de la proteína Frae1, mediante tecnología recombinante en la levadura *Pichia pastoris*, que implica el uso de la secuencia nucleotídica caracterizada por SEQ ID NO: 1 y 2 o de otras secuencias nucleotídicas obtenidas por mutagénesis de la secuencia SEQ ID NO: 1 y 2.

La invención proporciona también un eficaz método de aislamiento tanto para el alérgeno recombinante como para el natural obtenido a partir del polen de fresno.

### 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 masas moleculares comprendidas entre 5 y 70 kDa. Los síntomas que se derivan de la alergia, tales como rinitis, conjuntivitis, o asma, son provocados por la liberación de mediadores celulares, como la histamina, desde basófilos y mastocitos, células del sistema inmune. Dicha liberación viene inducida por el entrecruzamiento de anticuerpos IgEs unidos a los receptores de alta afinidad FcεRI, los cuales se encuentran a su vez anclados a basófilos y mastocitos. El entrecruzamiento de las IgE es provocado por la unión del correspondiente alérgeno, o un fragmento suyo, a través de un epítomo IgE (contenido en dicho alérgeno, o en su fragmento). La terapia que actualmente se viene utilizando para tratar la alergia implica la hiposensibilización del paciente mediante la administración por vía parental u oral de dosis adecuadas del propio alérgeno, o alérgoides relacionados. En la práctica totalidad de los casos se administra un extracto alérgénico obtenido, mediante una mínima manipulación, de la fuente biológica natural, lo que implica a una mezcla muy compleja de proteínas y otras sustancias, en la cual, el alérgeno -o alérgenos- puede representar una parte ínfima del producto total utilizado.

En efecto, en la actualidad, los protocolos utilizados para la diagnosis de casos de alergia y su posterior inmunoterapia implican el uso de extractos alérgénicos que frecuentemente no están caracterizados, ni siquiera estandarizados respecto a los alérgenos más importantes que pueden contener. A menudo, su administración no proporciona una diagnosis completa, sobre todo cuando la hipersensibilidad del paciente se refiere a alérgenos presentes en baja concentración en dichos extractos (Valenta, R.; Lidholm, J.; Niederberger, V.; Hayek, B.; Kraft, D. and Grönlund, H. (1999) Clin. Exp. Allergy 29, 896-904). 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 alérgénicos 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 alérgénico es el polen de una especie vegetal. La gran cantidad de pigmentos, carbohidratos, lípidos y componentes insolubles hacen muy difícil su manipulación. Ni que decir tiene que su disponibilidad es, además, muy reducida y de alto coste económico, debido a la dificultad de su recolección. Por todo lo expuesto, se hace necesario el diseño de procedimientos para la producción de alérgenos a utilizar en los protocolos de diagnosis e inmunoterapia de la alergia. La producción de DNA recombinante se prevé como la forma más reproducible y eficaz de obtención de polipéptidos alérgénicos bien definidos, no sólo para uso clínico, sino incluso para investigación.

### Explicación de la invención

Producción del alérgeno recombinante de *Fraxinus excelsior* Frae1 en la levadura *Pichia pastoris*, y sistema de aislamiento y purificación.

La presente invención se refiere al método de aislamiento utilizado para la purificación, a partir del polen de fresno (*Fraxinus excelsior*), del alérgeno Frae1 -un alérgeno del polen de fresno de creciente importancia clínica sobre todo en determinadas áreas geográficas, alcanzando una prevalencia del 65% en los pacientes alérgicos al polen de fresno en algunas regiones en Centro Europa (Hemmer W, Focke M, Wantke F, Gotz M, Jarisch R, Jager S, Gotz M. Allergy (2000) 55 (10), 923-30-. Más específicamente comprende la obtención, mediante clonación, de moléculas de

## ES 2 293 749 B1

DNA recombinante que codifican polipéptidos con las mismas o similares propiedades antigénicas que el alérgeno procedente del polen de fresno, o bien polipéptidos que posean al menos un epítipo del alérgeno Frae1. La invención incluye también la secuencia completa del cDNA del alérgeno Frae1 y la secuencia completa deducida del alérgeno.

5 El procedimiento objeto de la invención, permite llevar a cabo la purificación del alérgeno Frae1 del polen de fresno a partir de un extracto proteico de polen de fresno mediante dos etapas cromatográficas, cromatografías de penetrabilidad y HPLC, según se describe detalladamente más adelante.

10 La invención dispone de secuencias polinucleotídicas de DNA que hibridan, en condiciones restrictivas, con las descritas antes, o bien son derivadas de ellas por degeneración del código genético o mutagénesis.

15 El procedimiento de clonación del alérgeno recombinante de *Fraxinus excelsior* Frae1, incluye vectores de clonación y células huésped que contienen una secuencia de nucleótidos como las descritas en SEQ ID NO: 1 y 2, codificante de Frae1 o fragmentos suyos.

De esta manera se obtiene la secuencia nucleotídica que codifica al alérgeno completo y aquellos fragmentos nucleotídicos que poseen, al menos, una secuencia que codifica un determinante antigénico del alérgeno Frae1 de fresno.

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

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

Una vez producida la molécula polipeptídica con actividad antigénica de Frae1 en medio de crecimiento mínimo, ésta es aislada del medio extracelular del cultivo en forma soluble mediante cromatografía de intercambio aniónico, de penetrabilidad y HPLC.

30 Los productos recombinantes obtenidos mediante el procedimiento objeto de la invención presentan la capacidad de unión de anticuerpos IgE del suero de pacientes alérgicos a fresno, sensibles a Frae1.

35 Finalmente, con el procedimiento objeto de la invención, se dispone de Frae1 inmunológicamente activo, además de fragmentos antigénicos y alérgicos de este alérgeno, que sirven para ser incorporados en las pruebas “*in vivo*” e “*in vitro*” a realizar para la fiel diagnosis de la hipersensibilidad a este polen, y a otros pólenes relacionados filogenéticamente con él. También podrán ser empleados en las preparaciones de alérgenos que se utilicen para llevar a cabo la inmunoterapia correspondiente para el tratamiento de la alergia al polen de fresno.

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

### Breve descripción de las figuras

50 La invención se acompaña de 3 figuras que con carácter ilustrativo representan lo siguiente:

Figura 1.- Purificación de Frae1 natural (nFra). El extracto de polen de fresno obtenido como se describe a continuación fue aplicado a la primera columna de Sephadex G-75 y las fracciones correspondientes a moléculas de masa molecular aproximada de 20 kDa fueron reunidas, liofilizadas y aplicadas a la segunda columna de fase reversa C-18 (HPLC) usando un gradiente de acetonitrilo en 0.1% TFA. Las distintas fracciones de nFrae1 con distinto grado de glicosilación obtenidas en la cromatografía en HPLC aplicadas en PAGE-SDS e inmunoteñidas con sueros de pacientes alérgicos a fresno (A), con anticuerpo policlonal (B) y con la lectina Concanavalina A (C).

60 Figura 2.- PAGE-SDS de nFrae1 (1 µg/pocillo) e inmunotransferencia en membranas de nitrocelulosa teñidas con 17 sueros individuales alérgicos a fresno.

Figura 3.- PAGE-SDS de Frae1 recombinante (rFra) (1 µg/pocillo) e inmunotransferencia a membranas de nitrocelulosa incubadas con 11 sueros individuales alérgicos a fresno.

### 65 Modo de realización de la invención

La presente invención se refiere a un DNA recombinante que codifica epítipos del alérgeno de *Fraxinus excelsior* Fra e 1, a la producción recombinante, en la levadura *Pichia pastoris*, de los polipéptidos codificados por dicho DNA

## ES 2 293 749 B1

y al aislamiento del alérgeno natural procedente del polen de fresno. También se refiere a la aplicación de ambas moléculas al diagnóstico y terapia de este desorden inmunológico.

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

5

### • Aislamiento de RNA total

Se aisló el RNA total a partir del polen de fresno siguiendo el protocolo publicado por Ullrich y col. [Science 196, 1313-1318, 1977]. En este aislamiento se partió de 0.5 g de polen de fresno que se homogeneizó en un tampón 0.1 M de Tris-HCl, pH 7.5 que contenía tiocianato de guanidinio 4M, laurilsarcosinato sódico al 0.5 % y 2-mercaptoetanol 0.14 M, mediante un homogeneizador Polytron. Se centrifugó esta suspensión a 5000 xg a 20°C en una centrifuga Sorvall. Posteriormente se sometió al sobrenadante a una centrifugación en gradiente de CsCl 5.7 M en 0.01 M EDTA a 40.000 rpm en un rotor SW 60 (Beckman) durante 12 horas. Con estos últimos se introdujo una etapa inicial adicional en la que fueron macerados en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y homogéneo. A partir de 5  $\mu$ g de RNA total se llevó a cabo la síntesis del cDNA utilizando el “kit” SMART II de síntesis de cDNA (Clontech).

15

### • Clonación de *Frae1* basado en técnicas de PCR

En el procedimiento de clonación del alérgeno recombinante de *Fraxinus excelsior* *Frae1*, se llevó a cabo la obtención de la secuencia N-terminal mediante Degradación de Edman de la proteína para poder diseñar el oligonucleótido con el que llevar a cabo el clonaje de su DNA.

20

Tras la secuenciación, se utilizó la secuencia (EDVPQ) para diseñar el oligonucleótido degenerado (“sense”), 5'-GARGAYGTNCCNCAR-3' que fue utilizado, junto con el primer inespecífico UPM: 5'-CTAATACGACTCAC TATAGGGC-3' y utilizando el cDNA como molde, para amplificar por PCR la secuencia codificante (1-145) y no codificante 3' correspondientes al cDNA de *Frae1*. La clonación de su cDNA en el sistema TOPO TA cloning (Invitrogen) permitió la obtención de la secuencia de nucleótidos codificante completa y la secuencia 3' no codificante. El molde y los cebadores de las reacciones de PCR fueron disueltos en una mezcla de PCR estándar (2501  $\mu$ M de dNTPs, tampón estándar y 50 pmoles de los cebadores). Después de una primera etapa de desnaturalización a 95°C durante 5 min, se llevaron a cabo 30 ciclos a temperaturas de hibridación de 40°C en la primera etapa y 68°C en la segunda en presencia de Advantage DNA polimerasa II(Clontech). La reacción se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y los fragmentos de DNA fueron purificados usando el Magic PCR Prep kit (Promega) e insertados en el plásmido pCR2.1 linearizado y con una T terminal en los extremos 5'. Con esta construcción se transformaron células competentes TOP10 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 de este alérgeno como las caracterizadas por SEQ ID NO: 1 y 2.

30

35

### • Producción recombinante

Para la producción de la forma recombinante de esta proteína, la secuencia codificante de DNA fue amplificada mediante PCR utilizando cebadores no degenerados específicos del N-terminal (5' cgtctcgagaaaaGAGGATGTGCCA CAC 3') y C-terminal (5' cggaattcTCACATGTTGGGCGGGTA 3') y el fragmento obtenido fue ligado al plásmido de expresión pPICZ $\alpha$ -A (Invitrogen Corp.). Las células utilizadas fueron de la cepa KM71 de *Pichia pastoris*. La inducción se llevó a cabo por metanol al 0.5% durante tres días, creciendo las células a 30°C en medio mínimo de crecimiento de levadura. Las células se sedimentaron centrifugando a 5000 xg, se recogieron los sobrenadantes y una muestra de los mismos se aplicó en un gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS. Una banda glicosilada de 20 kDa, acompañada en ocasiones con una minoritaria de 18 kDa que corresponde con la forma no glicosilada de la proteína, fue detectada mediante tinción de los geles con Azul de Coomassie. La proteína es reconocida por sueros de pacientes alérgicos específicos de *Frae1* natural (dilución 1:10). La purificación de las proteínas se llevó a cabo mediante la liofilización del medio extracelular de la levadura y la aplicación de dos etapas cromatográficas, una de intercambio iónico en DEAE-celulosa y una de penetrabilidad en Sephadex G-75, obteniéndose tras esta última el alérgeno con un grado de pureza del 99%. Se llevaron a cabo con ellas estudios de caracterización estructural (espectros de dicroísmo en el UV lejano, espectrometría de masas) e inmunológica (con sueros individuales de pacientes alérgicos) y en todos los casos las proteínas recombinantes se comportaron de manera equivalente a la del alérgeno natural.

45

50

55

### • Aislamiento del alérgeno *Frae1* a partir del polen de fresno (*Fraxinus excelsior*)

El alérgeno *Frae1* ha sido purificado a partir de extracto proteico de polen de fresno, obtenido por homogeneización de 3 g de polen en bicarbonato amónico 50 mM pH 8.0 durante 3 horas a T ambiente. Dicho extracto fue aplicado a una columna de Sephadex G-75. Las fracciones que contenían la proteína fueron aplicadas a una columna de fase reversa C-18 en HPLC con un gradiente de acetonitrilo (0-60%) en TFA al 0.1%. En dicha cromatografía se aislaron cinco diferentes fracciones que contienen a n*Frae1* con distinto grado de glicosilación (figura 1).

60

65

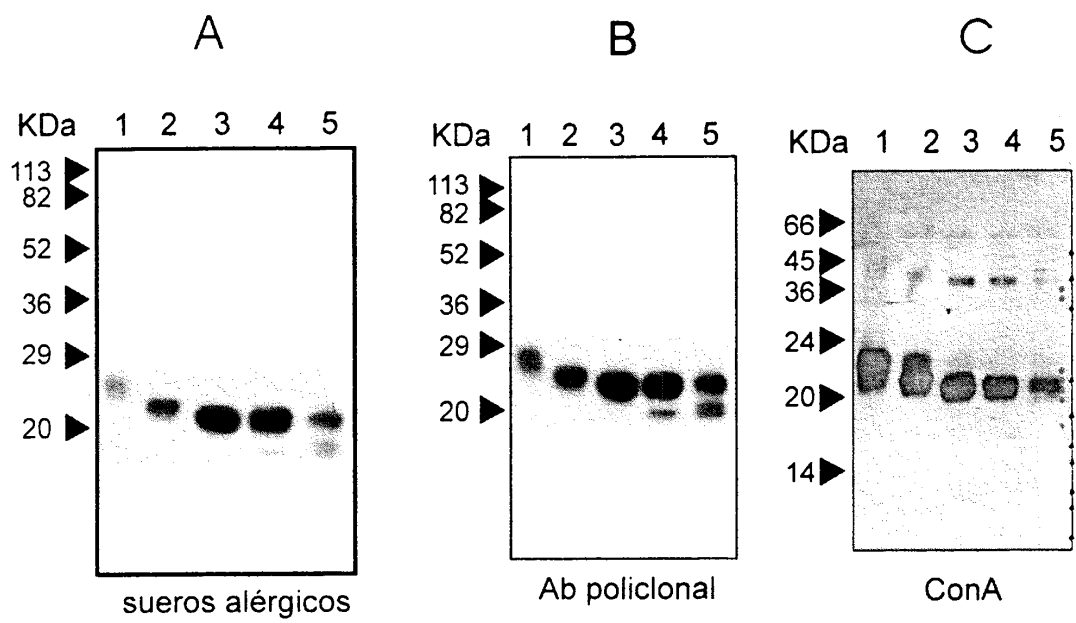
La invención cubre el uso de *Frae1* recombinante en diagnóstico, “*in vivo*” mediante pruebas cutáneas o “*in vitro*” mediante técnicas de inmunodetección (ELISA, RAST), permitiendo precisar qué alérgenos son los responsables de la sintomatología clínica de un individuo y reducir así el número de moléculas necesarias para su inmunoterapia. Se origina, por tanto, una inmunoterapia personalizada.

# ES 2 293 749 B1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Moléculas de DNA recombinante **caracterizadas** por SEQ ID NO: 1 que codifican un polipéptido con actividad alergénica y que poseen, al menos, un epítipo alergénico común con el alergeno Frae1 de *Fraxinus excelsior*.
2. Moléculas de DNA recombinante, o modificaciones de las mismas, según reivindicación 1, que codifican polipéptidos con, al menos, un epítipo de Frae1 en su estructura, unido a un polipéptido adicional, o modificado química o enzimáticamente.
- 10 3. Moléculas de DNA recombinante **caracterizadas** por hibridar en condiciones fuertemente restrictivas con la secuencia descrita en SEQ ID NO: 1.
- 15 4. Moléculas de DNA recombinante obtenidas a partir de la SEQ ID NO: 1 y 2, conteniendo una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad alergénica idéntica o reducida (hipoalergénica) con respecto a Frae1 de *Fraxinus excelsior*.
- 20 5. Polipéptido recombinante correspondiente al alergeno Frae1 de *Fraxinus excelsior*, o fragmentos de dicho polipéptido, según reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por la secuencia dada en SEQ ID NO: 3 y 4 que presentan la antigenicidad de, al menos, un epítipo de Frae1.
- 25 6. Polipéptidos que posean una secuencia de aminoácidos según reivindicación 5, y que presenten una alergenicidad atenuada.
7. Polipéptidos o fragmentos de dichos polipéptidos de polen de *Fraxinus excelsior* con, al menos, un epítipo de Frae1, según reivindicaciones anteriores, que se produzcan recombinantes unidos a un polipéptido adicional.
- 30 8. Polipéptidos de polen de *Fraxinus excelsior*, según reivindicaciones 5, 6, 7, que estén modificados química o enzimáticamente.
- 35 9. Un vector de expresión eucariota, y preferentemente pPICZ $\alpha$ -A, que contenga las secuencias **caracterizadas** por SEQ ID NO: 1 y 2 según reivindicaciones 1, 2, 3 y 4 cuya expresión dé lugar a la producción de los polipéptidos **caracterizados** por SEQ ID NO: 2 según reivindicaciones 5, 6, 7 y 8.
- 40 10. Un organismo hospedador eucariota, preferentemente la levadura *Pichia pastoris*, transformado con la construcción formada según reivindicación 9.
- 45 11. Un método para producir las formas recombinantes correspondientes a las secuencias polipeptídicas descritas en las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8, en el sistema eucariótico de levadura *Pichia pastoris*, y preferentemente de la cepa KM71, crecidas en medio rico, **caracterizado** por una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, una de penetrabilidad en Sephadex G-75.
- 50 12. Un método para producir formas recombinantes según reivindicación 11 en el que se adiciona una cromatografía en una columna C-18 de fase reversa de HPLC.
- 55 13. Un método para el aislamiento del alergeno Frae1 a partir del polen de *Fraxinus excelsior* utilizando una cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-75 y una columna de fase reversa nucleosil C-18 de HPLC.
- 60 14. Utilización de los péptidos de las reivindicaciones 5-8 para preparar un medicamento útil en el tratamiento de alergias.
15. Utilización de las moléculas según reivindicaciones 1-8 en el diagnóstico “*in vitro*” de la alergia.
- 65 16. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1-8 para el diseño de vacunas destinadas a la inmunoterapia de la alergia.
17. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1-4 para producir péptidos, según reivindicaciones 5-8, que contengan al menos un epítipo T alergénico, capaces de actuar como vacunas.
18. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1-4 en la producción de isoformas recombinantes hipoalergénicas que tengan disminuída o anulada su unión a IgE para el tratamiento de alergias.

Figura 1.-



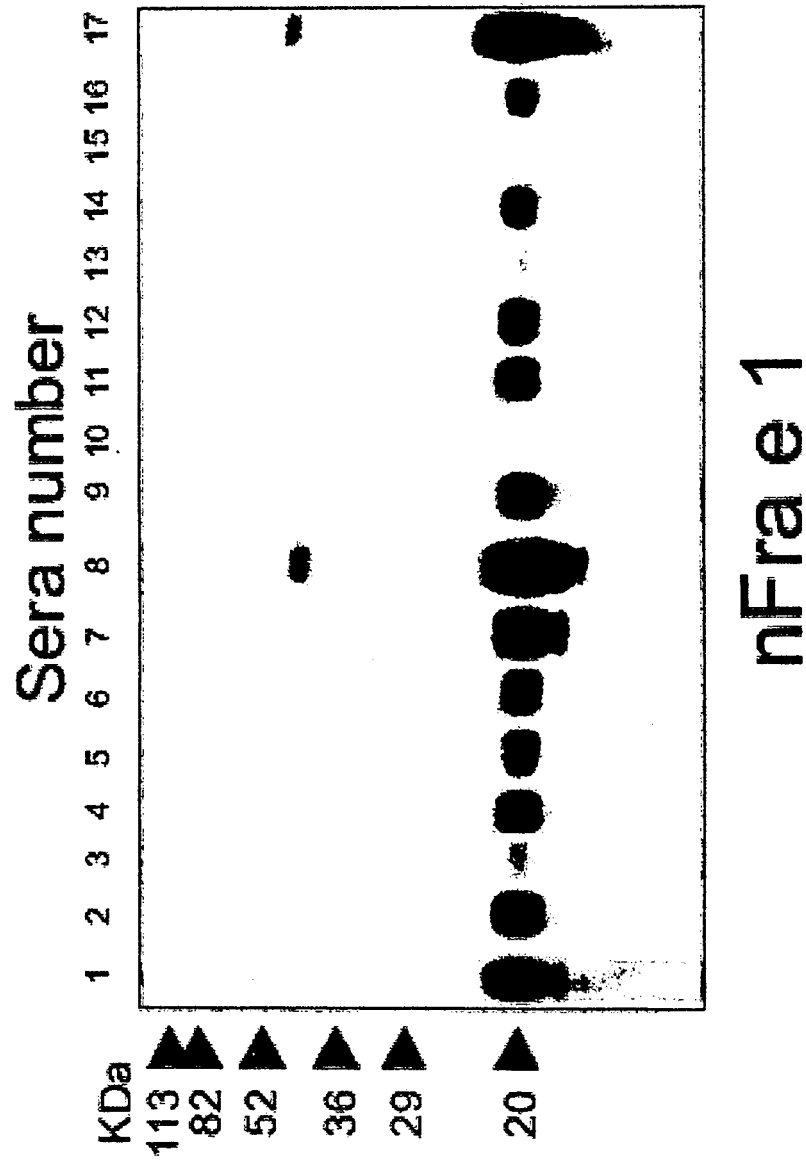


Figura 2

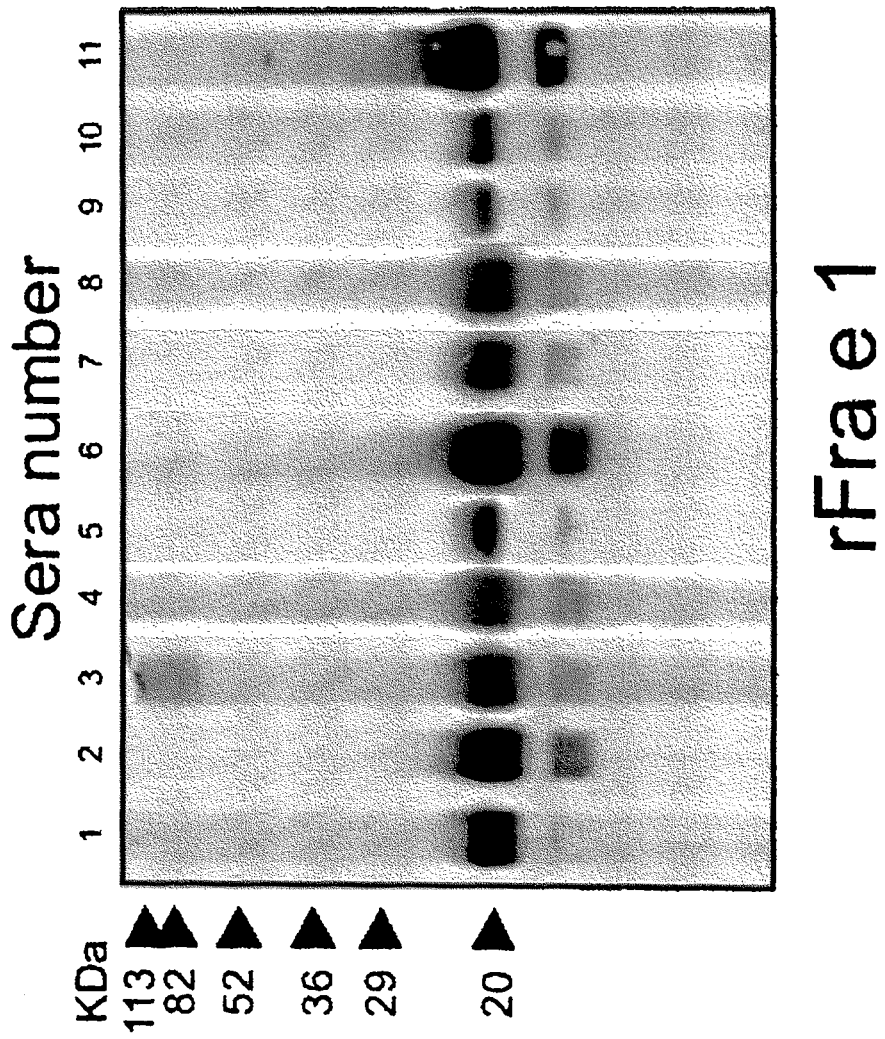


Figura 3



# ES 2 293 749 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Complutense de Madrid

5 <120> Variante recombinante del alergeno Frae1 del polen de fresno *Fraxinus excelsior*, producción en la levadura *Pichia pastoris* y aplicaciones.

<160> 4

10

<210> 1

<211> 435

<212> DNA

15

<213> *Fraxinus excelsior*

<220>

<221> CDS

20

<222> (1)...(435)

<300>

<308>

25

<309> 2002 07 1

<400> 1

30

gag gac gtc cca caa cca cca gtc tcc ctc ttc tac gtc caa gga caa 48  
Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Ser Leu Phe Tyr Val Gln Gly Gln

35

gtc tac tgc gac acc tgc cgt gcc gga ttc atc acc gag ctc tcc gag 96  
Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu

40

ttc atc caa gga gcc gga gtc cgt ctc caa tgc aag gac aag gag aac 144  
Phe Ile Gln Gly Ala Gly Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Lys Glu Asn

45

gga aag gtc acc ttc acc gag gtc gga tac acc cgt gcc gag gga ctc 192  
Gly Lys Val Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu

50

tac tcc atg gtc atc gag cgt gac cac aag aac gag ttc tgc gag atc 240  
Tyr Ser Met Val Ile Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile

55

gtc ctc ctc tcc tcc tcc cgt aag gac tgc gac gag atc cca acc gag 288  
Val Leu Leu Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile Pro Thr Glu

60

65

## ES 2 293 749 B1

gga tgg gtc aag cca tcc ctc aag ttc atc ctc aac acc gtc aac gga 336  
Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr Val Asn Gly

5

acc acc cgt acc atc aac cca ctc gga ttc ttc aag aag gag gtc ctc 384  
Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu Val Leu

10

cca aag tgc cca caa gtc tac aac aag ctc gga atg tac cca cca aac 432  
Pro Lys Cys Pro Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn

15

atg 435  
Met

20

<210> 2

<211> 435

<212> DNA

25

<213> *Fraxinus excelsior*

<220>

30

<221> CDS

<222> (1)...(435)

<400> 2

35

gag gat gtt ccg caa ccc cca gtt tct cta ttc tac gtt cag gga cag 48  
Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Ser Leu Phe Tyr Val Gln Gly Gln

40

gtt tat tgt gat aca tgt cgt gct gga ttc att act gaa ctt agc gaa 96  
Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu

45

ttc att caa ggc gcc ggt gta cgc ctc caa tgc aaa gag aag gag aat 144  
Phe Ile Gln Gly Ala Gly Val Arg Leu Gln Cys Lys Glu Lys Glu Asn

50

gga aaa gta aca ttt act gaa gta ggt tac acg aga gcg gaa gga ctc 192  
Gly Lys Val Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu

55

tat agc atg gtc att gaa cgc gat cac aag aac gag ttt tgc gaa att 240  
Tyr Ser Met Val Ile Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile

60

gta ctg ctt tca agc agc aga aaa gat tgt cat gaa att cct acc gaa 288  
Val Leu Leu Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys His Glu Ile Pro Thr Glu

65

## ES 2 293 749 B1

gga tgg gta aag cca tcg ttg aaa ttt ata ctc aac aca gta aat ggt 336  
 Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr Val Asn Gly

5

acc aca cgc acg ata aat cct ctt gga ttc ttc aag aaa gaa gct ctt 384  
 Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu Ala Leu

10

cca aaa tgt cca caa gtc tat aat aag ttg ggt atg tac ccg ccc aac 432  
 Pro Lys Cys Pro Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn

15

atg 435  
 Met

20 <210> 3  
 <211> 145  
 <212> PRT  
 <213> *Fraxinus excelsior*

25 <300>  
 <308>  
 <309> 2002 07 1

30 <400> 3

Glu Asp Val Pro Gln Pro Pro Val Ser Leu Phe Tyr Val Gln Gly Gln  
 1 5 10 15  
 35

Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu  
 20 25 30  
 40

Phe Ile Gln Gly Ala Gly Val Arg Leu Gln Cys Lys Asp Lys Glu Asn  
 35 40 45  
 45

Gly Lys Val Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu  
 50 55 60  
 45

Tyr Ser Met Val Ile Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile  
 65 70 75 80  
 50

Val Leu Leu Ser Ser Ser Arg Lys Asp Cys Asp Glu Ile Pro Thr Glu  
 85 90 95  
 55

Gly Trp Val Lys Pro Ser Leu Lys Phe Ile Leu Asn Thr Val Asn Gly  
 100 105 110  
 55

Thr Thr Arg Thr Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu Val Leu  
 115 120 125  
 60

Pro Lys Cys Pro Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn  
 130 135 140  
 65

Met  
 145

# ES 2 293 749 B1

<210> 4

<211> 145

<212> PRT

5 <213> *Fraxinus excelsior*

<400> 4

10	Glu	Asp	Val	Pro	Gln	Pro	Pro	Val	Ser	Leu	Phe	Tyr	Val	Gln	Gly	Gln
	1				5					10					15	
	Val	Tyr	Cys	Asp	Thr	Cys	Arg	Ala	Gly	Phe	Ile	Thr	Glu	Leu	Ser	Glu
15				20					25					30		
	Phe	Ile	Gln	Gly	Ala	Gly	Val	Arg	Leu	Gln	Cys	Lys	Glu	Lys	Glu	Asn
			35					40					45			
20	Gly	Lys	Val	Thr	Phe	Thr	Glu	Val	Gly	Tyr	Thr	Arg	Ala	Glu	Gly	Leu
		50					55					60				
	Tyr	Ser	Met	Val	Ile	Glu	Arg	Asp	His	Lys	Asn	Glu	Phe	Cys	Glu	Ile
25	65					70					75				80	
	Val	Leu	Leu	Ser	Ser	Ser	Arg	Lys	Asp	Cys	His	Glu	Ile	Pro	Thr	Glu
				85						90					95	
30	Gly	Trp	Val	Lys	Pro	Ser	Leu	Lys	Phe	Ile	Leu	Asn	Thr	Val	Asn	Gly
				100					105					110		
	Thr	Thr	Arg	Thr	Ile	Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Lys	Lys	Glu	Ala	Leu
35			115					120					125			
	Pro	Lys	Cys	Pro	Gln	Val	Tyr	Asn	Lys	Leu	Gly	Met	Tyr	Pro	Pro	Asn
		130					135					140				
40	Met															
	145															



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 293 749

② Nº de solicitud: 200301353

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
A	WO 0212503 A1 (UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID) 14.02.2002, todo el documento.	1-18

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

22.02.2008

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N 15/29** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**A61K 39/36** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)