

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 192**

21 Número de solicitud: 201630997

51 Int. Cl.:

**C07K 14/465** (2006.01)

**A61K 38/38** (2006.01)

**A61P 39/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**21.07.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**24.01.2018**

Fecha de concesión:

**26.07.2018**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**02.08.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ (100.0%)**  
**Avda. de la Universidad s/n**  
**03202 Elche (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**VILANOVA GISBERT, Eugenio;**  
**SOGORB SÁNCHEZ, Miguel Ángel y**  
**MONROY NOYOLA, Antonio**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **ALBÚMINAS Y PÉPTIDOS CAPACES DE HIDROLIZAR COMPUESTOS  
ORGANOFOSFORADOS Y CARBAMATOS, Y USOS DE LOS MISMOS**

57 Resumen:

Albúminas y péptidos capaces de hidrolizar compuestos organofosforados y carbamatos, y usos de los mismos.

La presente invención divulga la secuencia amino terminal de la albúmina de aves unida a cationes divalentes tales como cobre o zinc, así como cualquier proteína recombinante o de fusión que comprenda dicha secuencia para su uso como medicamento, específicamente para el tratamiento de intoxicaciones producidas por compuestos organofosforados. La presente invención también describe composiciones y métodos de tratamiento para dicho tipo de intoxicaciones. Por otro lado, la presente invención divulga el uso de dichas secuencias y péptidos que las comprenden para la descontaminación y/o biorremediación de zonas o superficies contaminadas por compuestos organofosforados y para el aislamiento de compuestos quirales.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP 11/1986.

ES 2 651 192 B2

**ALBÚMINAS Y PÉPTIDOS CAPACES DE HIDROLIZAR COMPUESTOS  
ORGANOFOSFORADOS Y CARBAMATOS, Y USOS DE LOS MISMOS.**

**DESCRIPCIÓN**

5

**CAMPO TÉCNICO**

La presente invención se refiere a un péptido aislado que se corresponde con la región amino terminal de la albúmina de aves y que es capaz de hidrolizar compuestos organofosforados y carbamatos. La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, proteínas de fusión, vectores, célula huésped y composiciones que comprenden los polinucleótidos o péptidos, así como métodos para producir y usar los polipéptidos.

15

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Los plaguicidas son productos de síntesis química que comprenden compuestos del tipo organoclorados, organofosforados y carbamatos, que ocasionaron fuertes problemas de contaminación al medio ambiente y resistencia de los insectos, además de efectos nocivos a los organismos no blanco. Los compuestos organofosforados (OPs) son ésteres, amidas o tioles derivados del ácido fosfórico o fosforotióico y los carbamatos son ésteres del ácido carbámico. El 30% de los compuestos organofosforados son mezclas racémicas que desarrollan una potente neurotoxicidad estereoselectiva en los seres vivos. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que las intoxicaciones humanas por compuestos organofosforados, afecta a una alta proporción de personas en la agricultura, considerándose, además un problema de salud pública y de salud ambiental. Los compuestos organofosforados son empleados para la elaboración de lubricantes, agentes nerviosos empleados en conflictos bélicos y sobre todo insecticidas y plaguicidas para el control de insectos (vectores) en salud pública y en las actividades agrícolas. Anualmente se sintetizan cientos de toneladas de estos compuestos entre los que se encuentran el malation, paration, clorpirifos, metamidofos, monocrotofos, tricloronato, metamidofos, acefato y diazinón, entre otros. A pesar del desarrollo de bioinsecticidas, la demanda de compuestos organofosforados de origen industrial es requerida por su alta eficacia para el mejor control de insectos sobre todo en países tropicales.

Generalmente, en los ambientes de trabajo en los que existe presencia de compuestos OPs no existen sistemas de seguridad, tipo sensores, ni de degradación, tipo biocatalizadores, eficientes para la detección en aire y para el control de desechos  
5 líquidos de estos compuestos por falta de sistemas enzimáticos que los degraden *in situ*, evitando así la intoxicación y contaminación a la que dan lugar. Por estas razones, el control de las emisiones de OPs durante su producción, así como la eliminación de residuos industriales y de las cantidades almacenadas de estos compuestos por parte de la industria química representan un riesgo ocupacional y  
10 ambiental de toxicidad para los ecosistemas.

Otro campo en el que existe la necesidad de sistemas eficaces de eliminación de compuestos organofosforados, es a nivel mundial en la destrucción de las miles de toneladas de arsenales de armas químicas (gases de guerra). Los métodos químicos  
15 y de incineración representan un alto riesgo, por lo que aproximaciones biotecnológicas con biocatalizadores en medios con condiciones suaves de temperatura y pH, son una alternativa deseable y de importante potencial aplicación.

En la actualidad, se emplean en la clínica médica dos tipos estrategias farmacológicas para el tratamiento de intoxicaciones por OPs: a) antagonistas de acetilcolina (atropina) y, b) agentes nucleofílicos reactivadores de la acetilcolinesterasa acetilcolinesterasa (oximas). A pesar de estas alternativas farmacológicas en casos graves de intoxicación se presenta la muerte en lapsos cortos de tiempo (24-72 horas) debido a las altas concentraciones de dichos compuestos en el organismo. Por esta  
20 razón la búsqueda de alternativas biológicas que degraden o hidrolicen dichos compuestos son una necesidad urgente a nivel mundial.

En este sentido, existe en el estado de la técnica un contado número de proteínas que hidrolizan compuestos OPs llamadas fosfotriesterasas, entre las más estudiadas y  
30 utilizadas se encuentra la paraoxonasa-1 (PON1) de suero de mamíferos y la fosfotriesterasa de *Pseudomonas diminuta*. Ambas metaloproteínas dependen de cationes divalentes para su actividad, con la particularidad que en presencia del catión divalente cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) pierden su capacidad hidrolizante, es decir el  $\text{Cu}^{2+}$  es un inhibidor de enzimas fosfotriesterasas. A pesar de los esfuerzos realizados, no se han  
35 obtenido resultados satisfactorios con respecto al tratamiento y degradación de compuestos OPs por parte de dichas enzimas. Por ejemplo, la enzima PON1 es una

enzima muy limitada en cuanto al número de compuestos OPs que hidroliza, así como por su inactividad enzimática estereoselectiva frente a OPs quirales. En cuanto a las fosfotriesterasas bacterianas, a pesar de que hidrolizan compuestos OPs a mayor velocidad que la enzima PON1, generalmente son estereoselectivas a favor de los isómeros menos tóxicos, y muestran efectos adversos inmunológicos durante su aplicación *in vivo* en mamíferos incluyendo el ser humano. Por otro lado, también es conocido que la albúmina presenta la capacidad de hidrolizar compuestos organofosforados. Se ha identificado el sitio 411 (Tyr411) de la albúmina de pollo como el sitio responsable de la hidrólisis del compuesto organofosforado O-hexil,O-2,5 diclorofenilfosforamidato (HDGP) (Sogorb et al., Chem. Res. Toxicol. 1998; 11:1441-1446). De la misma manera, otros estudios habían sugerido la interacción de compuestos organofosforados con el sitio 411 de la albúmina de mamíferos empleando compuestos organofosforados de interés toxicológico como el diisopropilfluorofosfato (DFP) (Schuh, Arch. Toxicol. 1970; 26:262-72). Dicha actividad hidrolizante de compuestos organofosforados de las albúminas de pollo, conejo, gallina y humana es muy baja haciendo que dichas enzimas, en su estado original, no puedan ser utilizadas en los campos de la biomedicina y la biotecnología para la degradación de compuestos organofosforados.

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica una necesidad de encontrar alternativas biológicas a las descritas anteriormente que sean capaces de degradar eficazmente los compuestos OPs y carbamatos, sin dar lugar a efectos adversos inmunológicos.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un péptido aislado, a partir de aquí lo denominaremos "péptido de la invención", que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en una realización más preferida el péptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Dichas secuencias SEQ ID NOs: 1 o 2 se corresponden con las regiones N-terminal de las albúminas de aves, más preferentemente de las albúminas de pollo o pavo. Dichas secuencias peptídicas aisladas se demuestra en la presente invención que son

las regiones concretas dentro de los péptidos de las albúminas de aves, preferentemente de las albúminas de pollo y pavo, a las que se une al menos un cofactor de tipo catión metálico, permitiendo que dichas proteínas presenten actividad organofosfatasa, siendo por tanto capaces de hidrolizar compuestos organofosforados, esteres carbámicos y/o carboxílicos.

En la Tabla1 se muestra una comparativa de los aminoácidos presentes en la zona N-terminal de albúminas de diferentes especies, específicamente aquellos aminoácidos a los que se unen los cationes divalentes metálicos para posibilitar la función de hidrólisis de compuestos organofosforados y/o carbámicos por parte de las albúminas de aves. En dicha Tabla 1 se muestra la secuencia aminoacídica de la región N-terminal de albúminas tal y como se encuentran en suero tras las modificaciones postraduccionales de las proteínas precursoras. Tal y como se observa en dicha comparativa de la Tabla 1 la albúmina de las especie humana, conejo, bovina, cerdo, y perro, no tienen el glutámico (E) en la posición 3 y las regiones N-terminal de las albúminas de cobra y lamprea no presentan ninguna homología con la región N-terminal de la albúmina de pavo o pollo (SEQ ID NO: 2).

**Tabla 1.** Comparativa de los aminoácidos presentes en la zona N-terminal de albúminas de diferentes especies.

| Especie | Aminoácidos | SEQ ID NO: |
|---------|-------------|------------|
| Pollo   | DAEHK       | 2          |
| Pavo    | DAEHK       | 2          |
| Humano  | DA-HK       | 5          |
| Conejo  | EA-HK       | 6          |
| Oveja   | DT-HK       | 7          |
| Bovino  | DT-HK       | 8          |
| Cerdo   | DT-YK       | 9          |
| Perro   | EA-YK       | 10         |
| Rata    | EA-HK       | 11         |
| Cobra   | TSSTG       | 12         |
| Lamprea | EDESF       | 13         |

La zona N-terminal de las albúminas de pollo (SEQ ID NO: 14) y pavo (SEQ ID NO: 15), específicamente la región que va del aminoácido 1 al 40, es idéntica en ambas especies, excepto que el aminoácido localizado en la posición 24 de la región N-terminal de la albúmina de pollo (SEQ ID NO: 14) es F, mientras que en la misma región en la albúmina de pavo (SEQ ID NO: 15) es V (Ver Tabla 2), pero dichas posiciones de éstos aminoácidos están fuera de la región concreta de SEQ ID NO: 1 y más específicamente la SEQ ID NO: 2, a la que se une el catión metálico divalente y que proporciona la capacidad específica de hidrolizar compuestos organofosforados y/o carbámicos, por lo que no afecta a la capacidad hidrolítica de dichos compuestos.

10

En la **Tabla 2** se muestra la zona N-terminal de las albúminas y precursores de albúminas de diferentes especies. Subrayado se muestra la región de interés a la que se une el catión divalente metálico para dotar de la actividad de hidrólisis de compuestos organofosforados y/o esterres carbámicos descrita en la presente invención.

15

**Tabla 2.** Zona N-terminal de las albúminas y precursores de albúminas de diferentes especies.

| Especie                                            | Región N-terminal                                | SEQ ID NO: |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------|
| Precursor albúmina sérica de pollo [Gallus gallus] | MKWVTLISFIFLFSSATSRNLQRF <u>ARDAEHK</u><br>S     | 14         |
| Albúmina de pavo [Meleagris gallopavo]             | MKWVTLISFIFLFSSATSRNLQR <u>V</u> ARDAEHK<br>SEIA | 15         |
| Albumina humana [Homo sapiens]                     | MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRD <u>AHK</u> SEV         | 16         |
| Precursor de la albúmina de conejo                 | MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRE <u>AHK</u> SEI<br>AHR  | 17         |
| Albumina perro [Canis lupus familiaris]            | <u>EAYK</u> SEIAHR                               | 18         |
| Albumina de rata [Rattus norvegicus]               | MKWVTFLLLLFISGSAFSRGVFRRE <u>AHK</u> SEI<br>AHR  | 19         |

Como se observa en las Tablas 1 y 2 la secuencia (SEQ ID NO: 2) de la región N-terminal de las albúminas de aves, más en particular de las albúminas de pavo y pollo, es una región diferente a la que presentan las albúminas del resto de vertebrados. Dicha región de SEQ ID NO: 2 unida a cationes divalentes metálicos, preferentemente a cationes tales como zinc ( $Zn^{2+}$ ) y/o cobre ( $Cu^{2+}$ ), configuran un centro catalítico en la secuencia proteica de las albúminas de aves capaz de hidrolizar de manera efectiva y sin efectos inmunológicos adversos, compuestos organofosforados y/o carbamatos, que son compuestos tóxicos tanto para animales, incluido el hombre, como para el medio ambiente. Además, dadas las propiedades y relación estructura-actividad que presentan los compuestos organofosforados y/o carbamatos con otros compuestos del tipo ésteres o amidas, la secuencia SEQ ID NO: 2, así como cualquier proteína recombinante o albúmina de ave que comprenda dicha secuencia SEQ ID NO: 2, se puede utilizar para realizar modificaciones químicas en compuestos candidatos a su uso como medicamento, por ejemplo, fosforamidatos derivados de (-)-beta-D-(2T,4R)-diolano-timina (DOT) que se han propuesto como antivirales, o fármacos derivados de esteres cíclicos tales como lactonas.

La capacidad catalítica de degradar y/o hidrolizar compuestos organofosforados (actividad organofosfatasa) y/o esteres carbámicos de la secuencia SEQ ID NO: 2, viene dada por la presencia en dicha secuencia SEQ ID NO: 2 del aminoácido ácido el glutámico (E) y el aminoácido histidina (H), en posiciones 3 y 4, respectivamente. Por lo tanto, los aminoácidos identificados como Xaa en las posiciones 1, 2 y 5 de la SEQ ID NO: 1 podría ser cualquier aminoácido.

A efectos de la presente invención el término "actividad organofosfatasa" se define aquí como la actividad dirigida a catalizar la hidrólisis de los compuestos OPs. Los péptidos y/o enzimas que presentan dicha actividad, actúan sobre los compuestos OPs tales como malation, paration, clorpirifos, metamidofos, monocrotofos, tricloronato, acetafo, diaxinón, diazinón, paraoxin, entre otros, incluyendo ésteres de ácidos fosfónicos y fosfínicos y ésteres de ácidos carbámicos y ésteres carboxílicos. En la Tabla 3 se muestra un listado de compuestos organofosforados y carbamatos.

**Tabla 3.** Listado de plaguicidas organofosforados y carbamatos.

| <b>ORGANOFOSFORADOS</b> | <b>CARBAMATOS</b> |
|-------------------------|-------------------|
| Metamidofos             | Metomilo          |
| Acefato                 | Carbarilo         |
| Diazinon                | Pirimicarb        |
| Clorpirifos             | Carbofurano       |
| Fenamifos               | Oxamilo           |
| Profenofos              | Esfenvalerato     |
| Metidación              | Carbarilo         |
| Dimetoato               | Fenpiroximato     |
| Etoprofos               | Metomilo          |
| Azinfos metilo          | Fenoxicarb        |
| Paraoxon                |                   |
| Fosmet                  |                   |
| Malation                |                   |
| Caduzafos               |                   |
| Crotoxfos               |                   |
| Dialifor                |                   |
| Fonofos                 |                   |
| Fensulfotion            |                   |
| Isofenfos               |                   |
| Tricloronato            |                   |

Los compuestos organofosforados (OPs) son ésteres organofosforados sintéticos y compuestos relacionados tales como fosforoamidatos. Tienen la fórmula general  $(RR'X)P=O$  o  $(RR'X)P=S$ , donde R y R' son grupos de cadena corta. Para los insecticidas organofosforados la molécula X es un buen grupo saliente aromático o alifático, el cual es un requisito para la inhibición irreversible de la acetilcolinesterasa. Los péptidos descritos en la presente invención, donde se incluyen las albúminas de pollo y pavo que comprenden la SEQ ID NO: 2 de la invención, hidrolizan los enlaces fosfoéster de los compuestos OPs. Estos OPs pueden ser OPs de tipo oxon y/o tion tales como el HDCP y el tricloronato, entre otros (ver Tabla 3). Además de los compuestos descritos en la Tabla 3, los péptidos descritos en la presente invención son capaces de hidrolizar compuestos del tipo gases de guerra tales como sarín, ciclosarin, tabun, soman, VX).

A efectos de la presente invención, se utilizan indistintamente los términos "péptido", "polipéptido", o "secuencia peptídica", para referirnos al péptido o péptidos de la invención. El término "polipéptido aislado" o "péptido aislado" tal como se utiliza aquí, se refiere a un polipéptido que es al menos 20% puro, preferiblemente al menos 40% puro, más preferiblemente al menos 60% puro, incluso más preferiblemente al menos 80% puro, más preferiblemente al menos 90% puro, e incluso más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% puro, como se determina por cualquier técnica conocida por el experto en la materia, tal como, SDS-PAGE. Por "polipéptido sustancialmente purificado" o "péptido sustancialmente puro", entendemos un péptido que generalmente ha sido separado de los lípidos, ácidos nucleicos, otros péptidos, y otras moléculas contaminantes con las cuales se asocia en su estado nativo. Preferiblemente, el péptido sustancialmente purificado es al menos 60% libre, más preferiblemente al menos 75% libre, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 96% puro, más preferiblemente al menos 97% puro, más preferiblemente al menos 98% puro, incluso más preferiblemente al menos 99%, más preferiblemente al menos 99,5% puro, e incluso más preferiblemente 100% puro, libre de otros componentes con los cuales se asocian naturalmente o de forma nativa. Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la preparación del polipéptido por medio de métodos recombinantes bien conocidos o por métodos clásicos de purificación. En este documento, el término "polipéptido sustancialmente puro" es sinónimo de los términos "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada."

En la presente invención el término "homología" se refiere al concepto de "homología de secuencia", refiriéndose al grado de similitud entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos. En la presente invención el término "ortólogo" se refiere a dos cadenas de aminoácidos o nucleótidos, procedentes de dos organismos distintos, que comparten un alto grado de homología.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta descripción, hace referencia a la proporción de aminoácidos o nucleótidos idénticos entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos que se comparan. Preferiblemente, se entiende por "identidad" la relación de residuos de ácidos nucleicos o aminoácidos que son idénticos entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos, con respecto a la longitud completa de la secuencia de referencia. El tanto por ciento de identidad

existente entre dos secuencias de aminoácidos puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias. A modo de ejemplo, se puede determinar el grado de identidad mediante el método de ClustalW, el método de Wilbur-Lipman, el programa GAG, que incluye GAP, BLAST o BLASTN, EMBOSS Needle y FASTA. Además, se puede utilizar el algoritmo de Smith Waterman con el fin de determinar el grado de identidad entre dos secuencias.

Para la comparación de secuencias, típicamente una de las secuencias actúa como secuencia de referencia con la cual se comparan las secuencias “problema”. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias para determinar su identidad, la secuencia de referencia y la/s secuencia/s problema se introducen en el programa, y se configuran los parámetros del mismo. Se pueden usar los parámetros del programa que aparecen por defecto o bien ser configurados. Preferiblemente dichos parámetros serán los que aparecen por defecto. Así, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad entre la/s secuencia/s problema y la secuencia de referencia en base a los parámetros del programa. Dos ejemplos de algoritmos que son útiles para determinar el porcentaje de identidad de secuencia son BLAST y BLAST 2.0, descritos en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res 25(17):3389-3402 y Altschul et al. (1990) J. Mol Biol 215(3)-403-410, respectivamente. Preferiblemente, el grado de identidad al que se refiere la presente invención se calcula mediante BLAST. El software para llevar a cabo el análisis BLAST se encuentra disponible públicamente en el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

En una realización particular, el polipéptido o secuencia peptídica de la invención presenta una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 de al menos un 96%, más preferentemente de al menos un 97%, más preferentemente de al menos un 98%, más preferentemente de al menos un 99% y más preferentemente de al menos un 100%.

En otra realización preferida, el polipéptido de la invención comprende al menos una de las secuencias seleccionadas entre cualquiera de las siguientes: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y/o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización más preferida, el polipéptido de la invención consiste al menos una secuencia seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y/o cualquiera de sus combinaciones.

5 Tal y como se demuestra en los ejemplos incluidos en el presente documento, las albuminas de aves, específicamente las albúminas de pollo (SEQ ID NO: 3) y pavo (SEQ ID NO: 4), que comprende en su región N-terminal la SEQ ID NO: 2, actúan como biocatalizadores para la degradación de compuestos organofosforados, ésteres carbámicos y/o ésteres carboxílicos, siempre en presencia de al menos un catión metálico.

10

En otra realización preferida, el polipéptido de la invención se caracteriza por que se encuentra unido covalentemente a al menos un cofactor, siendo dicho cofactor preferentemente un catión metálico con carga  $2^{+}$ .

15

A efectos de la presente invención, el término "cofactor" se refiere a cualquier componente químico, no proteico, termoestable y de bajo peso molecular, necesario para la acción de una proteína o enzima, ya sean iones metálicos, moléculas orgánicas o coenzimas. Ejemplos de cofactores son, pero sin limitarnos, cationes divalentes, preferentemente  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $K^{+}$ ,  $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ , así como otros cofactores orgánicos como vitaminas, NAD(P)<sup>+</sup>, NAD(P)H, ATP, ADP o FAD.

20

En una realización más preferida de la presente invención, los cofactores son preferentemente cationes divalentes y más preferentemente cationes tales como zinc ( $Zn^{2+}$ ) o cobre ( $Cu^{2+}$ ), siendo preferido el cobre,  $Cu^{2+}$ .

25

En otra realización preferida, el polipéptido de la invención se caracteriza por que la SEQ ID NO: 1, y más específicamente, la SEQ ID NO: 2, son las secuencias amino terminal de la albúmina de aves.

30

En otra realización más preferida, el polipéptido de la invención se caracteriza por que la albúmina de aves es una albúmina sérica. En otra realización preferida, la albúmina de aves se selecciona preferentemente de entre albúmina de pollo (SEQ ID NO: 3) o de pavo (SEQ ID NO: 4).

35

A efectos de la presente invención, la "albúmina" se refiere de forma general a albúmina de tipo nativo o recombinante de cualquier especie. Estudios bioquímicos

han revelado que las albuminas de origen animal presentan una homología estructural del 60%. Más preferiblemente, la albúmina es de aves, mamíferos y/o reptiles. Más preferiblemente, la albúmina es de origen aviar. Aún más preferiblemente, la albúmina utilizada es albúmina sérica aviar nativa o recombinante, preferentemente, albúmina de pollo o de pavo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a variantes artificiales o mutantes del péptido de la invención, que comprenden una sustitución conservadora, delección, y/o inserción de uno o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Estas variantes se refieren a variaciones limitadas en la secuencia aminoacídica, que permiten el mantenimiento de la funcionalidad del péptido. Preferiblemente, cambios de aminoácidos son de una naturaleza menor, es decir sustituciones conservadoras de aminoácidos o inserciones que no afectan significativamente al plegamiento y/o actividad de la proteína. Ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro del grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina).

Las variaciones pueden ser variaciones generadas artificialmente como, por ejemplo, mediante mutagénesis o síntesis directa. Estas variaciones no provocan modificaciones esenciales en las características o propiedades esenciales del péptido. Por ello, dentro del alcance de la presente invención también se incluyen los péptidos o polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos sea idéntica u homologa a las secuencias descritas en la presente invención. Además, de los 20 aminoácidos estándar, aminoácidos no estándar (tales como A-hidroxiprolina, 6 - [ $\lambda$ ] lisina /-metilo, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina, y alfa-metil serina) pueden ser sustituidos para los residuos de aminoácidos de un polipéptido de tipo salvaje. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no son codificados por el código genético, y aminoácidos no naturales puede ser sustituido por residuos de aminoácidos. Adicionalmente, si se desea, los aminoácidos no naturales o análogos de aminoácidos químicos se pueden introducir como una sustitución o adición en el péptido de la presente invención. Tales aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, los D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido  $\alpha$ -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminobutírico, ácido 6-amino hexanoico,

ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, tbutilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina,  $\beta$ -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como  $\beta$ -metil aminoácidos, C $\alpha$ -metil aminoácidos, N $\alpha$ -metil aminoácidos, y análogos de aminoácidos en general.

También se incluyen dentro del alcance de la invención los péptidos de la presente invención que se modifican diferencialmente durante o después de la síntesis, por ejemplo, por biotinilación, bencilación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, unión de lípidos (por ejemplo ácidos grasos), derivatización por conocidos grupos protectores/bloqueo, división proteolítica, enlace con una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Estas modificaciones pueden servir para aumentar la estabilidad y/o bioactividad del péptido de la invención.

Los péptidos de la presente invención se pueden producir en una variedad de formas, incluyendo la producción y recuperación de proteínas naturales, producción y recuperación de proteínas recombinantes, y síntesis químicas de las proteínas. En una modalidad, un péptido aislado de la presente invención se produce por el cultivo de una célula capaz de expresar el péptido bajo condiciones efectivas para producir el péptido, y la recuperación del péptido. Las condiciones de cultivo efectivas incluyen, pero no se limitan a, medios efectivos, bioreactor, condiciones de temperatura, pH y oxígeno que permiten la producción de proteínas. Un medio efectivo se refiere a cualquier medio en el cual una célula se cultiva para producir un péptido de la presente invención. Tal medio, por lo general, comprende un medio acuoso que tiene fuentes de nitrógeno, fosfato y carbono asimilable, y sales, minerales, metales apropiados y otros nutrientes, tales como vitaminas. Las células de la presente invención se pueden cultivar en bioreactores de fermentación convencionales, matraces oscilantes, tubos de prueba, placas de microtitulación, y cajas de petri. El cultivo se puede llevar a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. Tales condiciones de cultivo están dentro de la habilidad de un experto en el oficio.

Debido a la degeneración del código genético, en el cual diversos tripletes de nucleótidos dan lugar a un mismo aminoácido, existen diversas secuencias de nucleótidos que dan lugar a una misma secuencia aminoacídica. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido aislado o nucleótido aislado, de ahora en

adelante "polinucleótido de la invención", que codifica al menos un polipéptido de la invención.

5 Los términos "secuencia nucleotídica", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico", "oligonucleótido" y "polinucleótido" se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados. Se refieren, por tanto, a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra. El polinucleótido de la invención puede ser, por tanto, ADN, ARN, o derivados  
10 tanto de ADN como de ARN, incluyendo ADNc. El polinucleótido de la invención puede obtenerse de manera artificial mediante métodos de clonación y selección convencionales, o mediante secuenciación. El polinucleótido, adicionalmente a la secuencia codificante, puede llevar otros elementos, como por ejemplo aunque sin limitarse, intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5' o 3', sitios de unión a  
15 ribosomas, o secuencias estabilizadoras. Estos polinucleótidos adicionalmente pueden incluir secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que puedan ser útiles, por ejemplo, aunque sin limitarse, para aumentar la estabilidad del péptido generado a partir de él o permitir una mejor purificación del mismo.

20 El término "polinucleótido aislado" o "nucleótido aislado" tal como se utiliza aquí, se refiere a un polinucleótido que es al menos 20% puro, preferiblemente al menos 40% puro, más preferiblemente al menos 60% puro, incluso más preferiblemente al menos 80% puro, más preferiblemente al menos 90% puro, e incluso más preferiblemente al menos 95% puro, como se determina por cualquier técnica conocida por el experto en  
25 la materia, tal como, SDS-PAGE. El término "polinucleótido sustancialmente puro" como se usa aquí se refiere a una preparación de polinucleótido libre de otros nucleótidos extraños o indeseados y en una forma adecuada para uso dentro de sistemas de producción de proteínas creadas genéticamente. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la preparación del polinucleótido por medio de métodos  
30 recombinantes bien conocidos o por métodos clásicos de purificación. En este documento, el término "polinucleótido sustancialmente puro" es sinónimo de los términos " polinucleótido aislado" y "polinucleótido en forma aislada". Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura.

35

Las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de la invención pueden, por ejemplo, diseñarse en base a las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente invención. Por lo tanto, otro objeto descrito en la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada que codifica para el polipéptido de la invención. En una realización más preferida el polinucleótido de la invención comprende al menos una de las secuencias seleccionadas de entre cualquiera de las siguientes: SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y/o cualquier combinación de las mismas. En otra realización más preferida, el polipéptido de la invención consiste en al menos una de las secuencias seleccionadas de entre cualquiera de las siguientes: SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y/o cualquier combinación de las mismas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia nucleotídica complementaria al polinucleótido de la invención.

El polinucleótido de la invención puede introducirse en una construcción génica, por ejemplo, en un vector de clonación o vector de expresión, para permitir su replicación o su expresión. Preferiblemente, dicho vector es un vector apropiado para la expresión y purificación del polipéptido de la invención. Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere a una construcción génica que comprende al menos uno de los polinucleótidos de la invención, de ahora en adelante "construcción génica de la invención", unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped.

El término "construcción génica" tal como se utiliza aquí se refiere a una molécula de ácido nucleico, tanto monocatenaria como bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que es modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que lo contrario no existirían en la naturaleza. El término "construcción génica" o "construcción génica" es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención. Por tanto, la construcción genética de la invención puede comprender además una o más secuencias control o reguladoras de la expresión génica, tales como secuencias promotoras, secuencias líder, secuencias terminadoras de la transcripción, secuencias de poliadenilación, secuencias señal, etc. Un polinucleótido aislado que codifica un

polipéptido de la presente invención puede ser manipulado en una variedad de maneras para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar

5 secuencias de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinantes son bien conocidos en la técnica. La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención.

10 El término "secuencias de control" tal y como se define aquí incluye todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Tales

15 secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada de la traducción y la transcripción. Las secuencias de control pueden ser provistas de enlaces con el fin de introducir sitios de restricción

20 específicos que faciliten la ligadura de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido. Secuencias de control apropiadas para la expresión de un polinucleótido en células eucariotas son conocidas en el estado de la técnica. Como se usa aquí, el término "promotor" hace referencia a una secuencia nucleotídica, generalmente "aguas arriba" o "*upstream*" del

25 punto de inicio de la transcripción, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular y promotores inducibles o reprimibles. En general, las secuencias de control dependen del origen de la célula hospedadora.

30 El término "unido operativamente" denota aquí una configuración en la que se coloca una secuencia de control en una posición apropiada con relación a la secuencia de codificación de la secuencia de polinucleótidos de tal manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

35 Cuando se usa aquí el término "secuencia de codificación" o "secuencia codificante" significa una secuencia de nucleótidos, que especifica y directamente da lugar a una

5 secuencia específica de aminoácidos de su producto proteico. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente por un marco de lectura abierto, que normalmente empieza con el codón de iniciación ATG o codones de iniciación alternativos tales como GTG y TTG. La secuencia de codificación puede ser una secuencia de nucleótidos de ADN, ADNc, o recombinante.

10 El término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraducciona, y secreción.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a un "péptido de fusión" o "polipéptido de fusión" que comprende al menos el polipéptido de la presente invención.

15 En una realización preferida, el péptido de fusión según la presente invención se refiere a cualquier péptido nativo o recombinante, al que se le une covalentemente el péptido de la invención y que es capaz de mantener la actividad organofosfatasa, tal y como se describe en el presente documento.

20 En una realización preferida, la construcción génica de la invención es un vector de expresión. Un "vector de expresión" es una molécula de ADN lineal o circular que comprende al menos un polinucleótido de la invención, y que se une de manera operativa a nucleótidos adicionales que se proporcionan para su expresión. Dicho vector que comprende el polinucleótido de la invención, se puede introducir en una  
25 célula hospedadora de tal manera que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autoreplicante.

A efectos de la presente invención, el término "vector" o "vector de expresión", se refiere a un vector recombinante, que incluye al menos una molécula aislada de ácido  
30 nucleico de la presente invención que codifica para el polipéptido de la presente invención, insertada en cualquier vector, y que está unida operativamente a los nucleótidos adicionales que propician su expresión y que es capaz de entregar la molécula de ácido nucleico en una célula huésped. Dicho vector puede contener secuencias heterólogas del ácido nucleico, es decir secuencias del ácido nucleico que  
35 no se encuentran naturalmente adyacentes a las moléculas del ácido nucleico de la presente invención y que preferiblemente se derivan de una especie diferente de la

especie de la cual, la(s) molécula(s) del ácido nucleico se derivan. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de tal manera que ésta se une operativamente a las secuencias control adecuadas para su expresión. Por tanto, los vectores de expresión a los que se hace referencia en la presente invención comprenden el polinucleótido de la invención, un promotor, y señales de terminación de la transcripción y la traducción. Los diversos ácidos nucleicos y las secuencias control descritas aquí pueden unirse entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o la sustitución del polipéptido de la invención en dichos sitios.

El vector de expresión al que se refiere la invención puede ser cualquier vector, ARN o ADN, ya sea procariota o eucariota, y por lo general es un virus o un plásmido. Preferiblemente, el vector de expresión también es capaz de replicar dentro de la célula huésped. Los vectores de expresión de la presente invención incluyen cualquiera de los vectores que puede funcionar (i.e., expresión directa del gen) en las células recombinantes de la presente invención, incluyendo en las células bacterianas, fúngicas, de endoparásitos, artrópodos, otras células animales, y vegetales. La elección del vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que se va a introducir el mismo. El vector de expresión puede ser un plásmido, un cósmido, un fago, un virus, un cromosoma artificial de bacteria (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), o similares. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados. El vector puede ser un vector replicante de forma autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado. Además, se puede usar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que contienen conjuntamente el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula hospedadora, o un transposón. Los vectores de expresión preferidos de la presente invención pueden dirigir la expresión del gen en células bacterianas, de levaduras, vegetales y de mamífero.

Los vectores de la presente invención contienen preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una selección fácil de células transformadas, transfectadas, transducidas, o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.

Se puede insertar más de una copia del polinucleótido de la presente invención en la célula hospedadora para aumentar la producción del/los producto/s génico/s. Se puede obtener un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula hospedadora o incluyendo con el polinucleótido un gen marcador seleccionable amplificable, donde las células que contienen las copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por tanto, copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar cultivando las células en presencia del agente de selección adecuado.

La construcción génica de la invención, como se ha mencionado anteriormente, se puede introducir en una célula hospedadora competente para llevar a cabo la expresión del polipéptido de la invención. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una "célula" o "célula hospedadora" que comprende el polipéptido, la secuencia polinucleotídica o la construcción génica de la invención, "célula hospedadora de la invención" o "célula de la invención".

El término "célula huésped" o "célula huésped recombinante", como se usa aquí, incluye cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción, y similares con la construcción génica de la invención.

Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en la célula huésped para aumentar la producción del producto del gen. Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede conseguir mediante la integración de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y copias de ese modo adicionales del polinucleótido, pueden ser seleccionadas para cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado. Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores

de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

La transformación de una molécula de ácido nucleico en una célula se puede lograr por cualquier método por el cual una molécula de ácido nucleico puede ser insertada en la célula. Las técnicas de transformación incluyen, pero no se limitan a, transfección, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, y fusión de protoplastos. Una célula recombinante puede permanecer unicelular o puede crecer en un tejido, un órgano o un organismo multicelular. Las moléculas de ácidos nucleicos transformadas de la presente invención pueden permanecer extracromosomales o pueden integrarse en uno o más sitios dentro de un cromosoma de la célula transformada (i.e., recombinante) de tal manera que se conserva su capacidad de ser expresada.

La elección de una célula huésped en gran parte depende del gen que codifica el polipéptido y su fuente. La célula huésped puede ser un procariota o un eucariota.

Las células huésped apropiadas para transformar incluyen cualquier célula no-humana que puede ser transformada con un polinucleótido de la presente invención. Las células huésped pueden ser tanto células sin transformar como células que ya están transformadas con al menos una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos que codifican una o más proteínas de la presente invención). Las células huésped de la presente invención pueden ser capaces de producir endógenamente (i.e., naturalmente) las proteínas de la presente invención o pueden ser capaces de producir las citadas proteínas después de ser transformadas con al menos una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Las células huésped de la presente invención pueden ser cualquier célula capaz de producir al menos una proteína de la presente invención, e incluyen células bacterianas, fúngicas (incluyendo levadura), de parásitos, de artrópodos, de animales y vegetales. Las células huésped preferidas incluyen células bacterianas, micobacterianas, de levadura, de vegetales y de animales, preferentemente de mamífero no-humano. Las células huésped más preferidas incluyen células de *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Listeria*, *Saccharomyces*, *Spodoptera*, *Mycobacteria*, *Trichoplusia*, BHK (riñón de crías de hámster), células MDCK (línea celular de riñón de perro normal para el cultivo del herpesvirus canino), células CRFK (línea celular de riñón de gato normal para el cultivo del herpesvirus felino), células CV-1 (línea celular

de riñón de mono Africano utilizada, por ejemplo, para cultivar poxvirus de mapache), células COS (por ejemplo, COS-7), y células Vero. Las células huésped particularmente preferidas son *E. coli*, incluyendo derivados K-12 de *E. coli*; *Salmonella typhi*; *Salmonella typhimurium*, incluyendo cepas atenuadas; *Spodoptera frugiperda*; *Trichoplusia ni*; células BHK; células MDCK; células CRFK; células CV-1; células COS; células Vero; y células G8 del mioblasto de ratón no-tumorugénico (por ejemplo, ATCC CRL 1246). Otras células huésped de mamífero no-humano apropiadas incluyen otras líneas celulares de riñón no-humano, otras líneas celulares de fibroblasto no-humano (por ejemplo, líneas celulares de fibroblasto de embrión de gallina o murina), líneas celulares de mieloma no-humano, células de ovario de hámster Chino, células de NIH/3T3 de ratón y/o células de LMTK.

Las tecnologías de ADN recombinante se pueden utilizar para mejorar la expresión de moléculas de polinucleótidos transformadas por manipulación, por ejemplo, el número de copias de las moléculas del polinucleótido dentro de una célula huésped, la eficiencia con la cual las moléculas del polinucleótido se transcriben, la eficiencia con la cual las transcripciones resultantes se traducen, y la eficiencia de modificaciones post-traduccionales. Las técnicas recombinantes útiles para aumentar la expresión de moléculas del polinucleótido de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, moléculas del polinucleótido ligadas operativamente a plásmidos de alto número de copias, integración de las moléculas del polinucleótido en uno o más cromosomas de la célula huésped, adición de secuencias de estabilidad del vector para plásmidos, sustituciones o modificaciones de las señales de control de la transcripción (por ejemplo, promotoras, operadoras, potenciadoras), sustituciones o modificaciones de la señales de control de la traducción (por ejemplo, sitios de enlace del ribosoma, secuencias Shine-Dalgarno), modificación de las moléculas del polinucleótido de la presente invención que corresponden al uso del codón de la célula huésped, y la delección de secuencias que desestabilizan las transcripciones. La actividad de una proteína recombinante expresada de la presente invención se puede mejorar por fragmentación, modificación, o derivatización de las moléculas del polinucleótido que codifica dicha proteína.

En una realización preferida, la célula hospedadora de la invención comprende, por tanto, al menos un polinucleótido de la invención introducido recombinantemente mediante la construcción génica de la invención. Dichos polinucleótidos pueden codificar el polipéptido maduro o una pre-proteína que consiste en un péptido señal

unido a la enzima madura que tendrá que procesarse posteriormente con el fin de producir el polipéptido de la invención.

5 La célula hospedadora de la invención expresa al menos uno de los péptidos seleccionados de entre cualquiera de los siguientes SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, así como cualquier péptido que comprenda dichas secuencias en su región N-terminal de manera que dichos péptidos sean funcionales tal y como se describe en el presente documento, es decir, mantengan su actividad hidrolíticas frente a compuestos organofosforados y/o carbamatos. Entre dichas secuencias péptidicas se encuentran  
10 las albúminas de aves, preferentemente, las albúminas de pollo (SEQ ID NO: 3) y la albúmina de pavo (SEQ ID NO: 4). El término "funcional" significa que el(los) péptido(s) expresado(s) retiene(n) su actividad catalítica hidrolizante de esteres fosfóricos, carbámicos y/o carboxílicos. Esta actividad puede medirse por medio de cualquier procedimiento adecuado conocido en el estado de la técnica,  
15 preferiblemente por medio de cualquiera de los procedimientos descritos a continuación en los ejemplos que acompañan al presente documento.

El término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción del péptido de la invención que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación post-transcripcional, traducción, modificación post-traducciona, y secreción.  
20

Se puede llevar a cabo la expresión del péptido de la invención en la célula hospedadora de la invención por medio de cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como la transformación de una célula hospedadora adecuada con al  
25 menos un polinucleótido de la invención y/o con cualquier combinación de éstos, o con la construcción genética de la invención, y el cultivo de la célula hospedadora transformada en condiciones que induzcan la expresión de dicho polinucleótido con el fin de obtener el péptido secretado y/o cualquier combinación de éstos.

30 Se puede cultivar la célula hospedadora en un medio nutritivo adecuado, sólido o líquido, para la producción del péptido de la invención, en condiciones que permitan expresarlo y/o aislarlo. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Si se secretan los péptidos de la  
35 invención en el medio nutritivo, éstos se pueden recuperar directamente del medio.

Por el contrario, si éstos permanecen en el interior de la célula hospedadora, se recuperarían mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

5 A su vez, dichos péptidos de la invención se pueden detectar utilizando procedimientos conocidos en la técnica específicos para polipéptidos. Estos procedimientos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto, o la desaparición de un sustrato. Además, dichos péptidos se pueden recuperar utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, a partir del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero  
10 no se limitan a, centrifugación, filtración, extracción, secado mediante pulverización, evaporación, o precipitación.

Los péptidos de la presente invención se pueden purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a,  
15 cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, cromatofocalización, y exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, focalización isoelectrica preparativa), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación en sulfato de amonio), SDS-PAGE, o extracción.

20 Así, en otra realización preferida, la célula hospedadora de la invención puede expresar al menos uno de los péptidos de la invención, o cualquier combinación de los mismos, por ejemplo aunque sin limitarnos, los péptidos que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 14, 15, y/o cualquier combinación de los mismos.

25 Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a una composición, de ahora en adelante "composición de la invención", que comprende las secuencias polinucleotídicas, o las secuencias peptídicas, o la construcción génica, o las proteínas de fusión, o los vectores, o las células, descritas a lo largo del presente documento, junto con al menos un cofactor caracterizado por que es un catión  
30 divalente.

En una realización preferida, la composición de la invención se caracteriza por que comprende una secuencia peptídica seleccionada entre cualquiera de las siguientes: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 14, SEQ ID  
35 NO: 15, y/o cualquier combinación de las mismas; más preferiblemente las secuencias son la SEQ ID NO: 3 y/o la SEQ ID NO: 4.

En otra realización más preferida, la composición de la invención se caracteriza por que los cationes divalentes se selecciona de entre cualquiera de la siguiente lista:  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y/o cualquiera de sus combinaciones, más preferiblemente donde catión divalente es  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ , preferentemente  $\text{Cu}^{2+}$ .

5

En una realización más preferida, la composición de la invención es una composición que presenta actividad catalítica hidrolizante de compuestos organofosforados tales como malation, paration, clorpirifos, metamidofos, monocrotofos, tricloronato, acetafo, diaxinón, diazinón, paraoxin, entre otros, incluyendo ésteres de ácidos fosfónicos y fosfínicos y ésteres de ácidos carbámicos y ésteres carboxílicos.

10

En una realización preferida, la composición de la invención se caracteriza por que es una composición farmacéutica o veterinaria. Dichas composiciones pueden comprender además vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Un excipiente puede ser cualquier material que los animales, plantas, material vegetal o animal, o ambiente (incluyendo muestras de suelo y agua) que se tratan, puedan tolerar. Ejemplos de tales excipientes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank, y otras soluciones salinas acuosas fisiológicamente balanceadas. Los vehículos no acuosos, tales como aceites fijos, aceite de ajonjolí, etil oleato, o triglicéridos también se pueden utilizar. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes que mejoran la viscosidad, tal como sodio carboximetilcelulosa, sorbitol, o dextran. Los excipientes también pueden contener menores cantidades de aditivos, tales como sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química. Ejemplos de soluciones reguladoras incluyen solución reguladora de fosfato, solución reguladora bicarbonato y solución reguladora Tris, mientras que ejemplos de conservantes incluyen timerosal u o-cresol, formalina y alcohol bencílico. Los excipientes también se pueden utilizar para aumentar la vida media de una composición, por ejemplo, pero no se limitan a, vehículos poliméricos de liberación controlada, implantes biodegradables, liposomas, bacterias, virus, otras células, aceites, ésteres, y glicoles.

15

20

25

30

En otra realización preferida, las composiciones farmacéuticas o veterinarias descritas en la presente invención, pueden comprender además otro principio activo. El término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro

35

efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

En una realización preferida, los principios activos que pueden acompañar a las composiciones farmacéuticas o veterinarias descritas en la presente invención, se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: agentes bloqueantes de receptores de acetilcolina, preferentemente atropina (evita los efectos tóxicos de organofosforados y carbamatos), oximas, preferentemente pralidoxima, o cualquier sustancia o compuesto capaz de reactivar las colinesterasas inhibidas por organofosforados, *bioscavengers* no catalíticos (proteínas o péptidos que se unen y capturan compuestos organofosforados y/o carbamatos); cualquier otro compuesto capaz de evitar efectos adversos de la intoxicación por organofosforados y/o carbamatos, tales como ansiolíticos, anticonvulsivos, sedantes, como por ejemplo, el diazepam y/o bloqueantes de calcio.

En otra realización preferida, la composición de la invención comprende además un vehículo o excipiente, farmacéutica o veterinariamente aceptable.

El término "vehículo" aplicados a las composiciones farmacéuticas y veterinarias descritas en la presente invención se refieren a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se deben administrar el péptido de la invención, la secuencia nucleotídica que lo codifica, la construcción génica, o la célula según se describe en la invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes de la misma hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente. Además, el vehículo debe estar permitido y evaluado de modo que no causen daño a los organismos a los que se les administra.

35

Un excipiente puede ser cualquier material que, los animales, incluidos el ser humano, puede tolerar. Ejemplos de tales excipientes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank, y otras soluciones salinas acuosas fisiológicamente balanceadas. Los vehículos no acuosos, tales como aceites fijos, aceite de ajonjolí, etil oleato, o triglicéridos también se pueden utilizar. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes que mejoran la viscosidad, tal como sodio carboximetilcelulosa, sorbitol, o dextran. Los excipientes también pueden contener menores cantidades de aditivos, tales como sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química. Ejemplos de soluciones reguladoras incluyen solución reguladora de fosfato, solución reguladora bicarbonato y solución reguladora Tris, mientras que ejemplos de conservantes incluyen timerosal u o-cresol, formalina y alcohol bencílico. Los excipientes también se pueden utilizar para aumentar la vida media de una composición, por ejemplo, pero no se limitan a, vehículos poliméricos de liberación controlada, implantes biodegradables, liposomas, bacterias, virus, otras células, aceites, ésteres, y glicoles.

La composición de la invención se puede encontrar en estado sólido, líquido o en suspensión, incluso en el interior de nanopartículas, preferentemente en disolución.

La composición de la presente invención puede administrarse por cualquier vía adecuada para una molécula específica, directamente (por ejemplo, por vía local, tal como por inyección, inyección subcutánea o administración tópica en el lugar del tejido) o por vía sistémica (por ejemplo, por vía parenteral o por vía oral). Cuando la composición de la presente invención se va a proporcionar por vía parenteral, tal como mediante administración intravenosa, subcutánea, oftálmica, intraperitoneal, intramuscular, bucal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracisternal, intracapsular, intranasal o mediante administración por aerosol, la composición preferentemente comprende parte de una suspensión o solución compatible fisiológicamente fluida o acuosa. Por lo tanto, el vehículo o excipiente es fisiológicamente aceptable de modo que cuando se suministra el agente deseado al sujeto, la solución no afecta de forma adversa de otro modo al equilibrio de electrolitos y/o al volumen del sujeto. El medio acuoso para el agente puede comprender por lo tanto solución salina fisiológica normal.

En otra realización preferida, la composición de la invención se caracteriza porque es un biocatalizador.

A efectos de la presente invención el término “biocatalizador” se refiere a cualquier proteína o péptido que cataliza una reacción, típicamente corresponde al concepto de enzima. Implica que un compuesto químico (sustrato o sustratos) en presencia del biocatalizador sufre una transformación química dando lugar a un producto o productos de la reacción, mientras que de forma espontánea en su ausencia, la reacción, o bien no ocurre o se produce más lentamente.

Otro objeto de la presente invención se refiere a una formulación de liberación controlada que es capaz de liberar lentamente la composición de la presente invención en un material animal o vegetal, o el ambiente (incluyendo muestras de suelo y agua). Como se utiliza en este documento, una formulación de liberación controlada comprende una composición de la presente invención en un vehículo de liberación controlada. Vehículos de liberación controlada apropiados incluyen, pero no se limitan a, polímeros biocompatibles, otras matrices poliméricas, cápsulas, microcápsulas, micropartículas, preparaciones de bolo, bombas osmóticas, dispositivos de difusión, liposomas, lipoesferas, y sistemas de entrega transdérmicos. Las formulaciones preferidas de liberación controlada son biodegradables (i.e., bioerosionables).

Una formulación de liberación controlada preferida, es capaz de liberar la composición de la presente invención en suelo o agua que está en un área atomizada con un compuesto de tipo éster fosfórico, carbámico y/o carboxílico. La formulación preferiblemente se libera durante un periodo de tiempo que oscila de aproximadamente 1 a cerca de 12 meses. Una formulación preferida de liberación controlada de la presente invención es capaz de realizar un tratamiento preferiblemente durante al menos aproximadamente 1 mes, más preferiblemente por al menos cerca de 3 meses, aún más preferiblemente por al menos cerca de 6 meses, aún más preferiblemente por al menos cerca de 9 meses, e incluso más preferiblemente por al menos cerca de 12 meses.

La concentración y/o cantidad efectiva del polipéptido, secuencia nucleotídica, vector, o célula huésped de la presente invención que será necesaria para hidrolizar un compuesto de tipo organofosforado o carbamato, tales como éster fosfórico, carbámico y/o carboxílico, dependerá de la naturaleza de la muestra que se descontamina, la concentración del éster en la muestra, y la formulación de la composición. La concentración y/o cantidad efectiva del polipéptido, secuencia

nucleotídica, vector, o célula huésped dentro de la composición se puede determinar fácilmente de forma experimental, como será entendido por un experto.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a un biosensor y/o biorremediador que comprende el polipéptido, o el polinucleótido, o la construcción de ácido nucleico, o el vector, o la célula, o la composición según se define en la presente invención, donde dicho biosensor y/o biorremediador es capaz de hidrolizar y/o degradar compuestos organofosforados y/o carbamatos.

A efectos de la presente invención el término "biosensor" se refiere a un dispositivo analítico que por lo general está formado por un material biológicamente activo, tal como una enzima y un transductor que convierte una reacción bioquímica en una señal electrónica cuantificable que se puede procesar, transmitir, y medir. Una revisión general de biosensores que han sido utilizados para la detección de compuestos de tipo éster fosfórico, carbámico y/o carboxílico se proporciona por Rekha et al. (Rekha, M. et al. Critical Reviews in Biotechnology. 2000;20: 213-235). Los objetos descritos en la presente invención, se pueden adaptar para su uso en tales biosensores.

A efectos de la presente invención se describe el término "biorremediación" se refiere al procedimiento para la eliminación y/o destrucción de compuestos contaminantes mediante organismos vivos y/o sustancias y/o compuestos sintetizados por éstos.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso del polipéptido, o del polinucleótido, o de una construcción de ácido nucleico, o de un vector, o de una célula, o de un polipéptido de fusión, o de una composición según la presente invención, para la elaboración de un medicamento. Alternativamente, la presente invención se refiere al polipéptido, o al polinucleótido, o a la construcción de ácido nucleico, o al vector, o a la célula, o al polipéptido de fusión, o a la composición según la presente invención, para su uso como medicamento.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en los animales, incluido el ser humano. En el contexto de la presente invención, la enfermedad se refiere a intoxicaciones producidas por compuestos organofosforados, ésteres carbámicos y/o ésteres carboxílicos.

En una realización preferida, la presente invención describe el uso de la albúmina de aves, preferiblemente la albúmina de pollo (SEQ ID NO: 3) y/o de pavo (SEQ ID NO: 4) junto con un catión divalente, tal y como se describe en el presente documento, para la elaboración de un medicamento. Alternativamente, la presente invención se refiere a la albúmina de aves, preferiblemente la albúmina de pollo (SEQ ID NO: 3) y/o de pavo (SEQ ID NO: 4) junto con un catión divalente para su uso como medicamento.

Las composiciones de la invención contendrán una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva según se define en el presente documento, para proporcionar el efecto deseado.

Tal como se usa en la presente descripción, el término "cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva" se refiere a la cantidad de polipéptido(s), secuencia(s) nucleotídica(s) que codifica(n) para el/los péptido(s) de la invención, polipéptido de fusión, vector, células de la invención, o composición de la invención que es capaz de producir el efecto deseado. En general, la cantidad terapéuticamente efectiva que debe administrarse dependerá entre otros factores, de las propias características del sujeto, la gravedad de la enfermedad y/o infección, la forma de administración, etc.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso del polipéptido, o del polinucleótido, o de una construcción de ácido nucleico, o de un vector, o de una célula, o de un polipéptido de fusión, o de una composición según la presente invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de intoxicaciones por compuestos organofosforados, esteres carbámicos y/o esteres carboxílicos. Alternativamente, la presente invención se refiere al polipéptido, o al polinucleótido, o a la construcción de ácido nucleico, o al vector, o a la célula, o al polipéptido de fusión, o a la composición según la presente invención, para el tratamiento de intoxicaciones por compuestos organofosforados, esteres carbámicos y/o esteres carboxílicos.

En una realización preferida, la presente invención describe el uso de la albúmina de aves, preferiblemente la albúmina de pollo (SEQ ID NO: 3) y/o de pavo (SEQ ID NO: 4) junto con un catión divalente, tal y como se describe en el presente documento, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de intoxicaciones por compuestos organofosforados, esteres carbámicos y/o esteres carboxílicos.

Alternativamente, la presente invención se refiere a la albúmina de aves, preferiblemente la albúmina de pollo (SEQ ID NO: 3) y/o de pavo (SEQ ID NO: 4) junto con un catión divalente para su uso como medicamento para el tratamiento de intoxicaciones provocadas por compuestos organofosforados, esteres carbámicos y/o esteres carboxílicos.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso del polipéptido, o del polinucleótido, o de una construcción de ácido nucleico, o de un vector, o de una célula, o de un polipéptido de fusión, o de una composición, o de un biosensor según la presente invención, para hidrolizar moléculas organofosforadas.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso del polipéptido, o del polinucleótido, o de una construcción de ácido nucleico, o de un vector, o de una célula, o de un polipéptido de fusión, o de una composición, o de un biosensor según la presente invención como biocatalizador en útil en los procesos de biorremediación. En una realización preferida, dicho uso va dirigido preferentemente a catalizar reacciones de hidrólisis y/o degradación de compuestos organofosforados, ésteres carbámicos y/o ésteres carboxílicos.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso del polipéptido, o del polinucleótido, o de una construcción de ácido nucleico, o de un vector, o de una célula, o de un polipéptido de fusión, o de una composición, o de un biosensor según la presente invención para el aislamiento de compuestos quirales.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso de la albúmina de aves para el tratamiento de intoxicaciones por compuestos organofosforados. Alternativamente, se refiere a la albúmina de aves para su uso en el tratamiento de intoxicaciones por compuestos organofosforados. En una realización preferida, la albúmina se selecciona de entre albúmina de pavo o albúmina de pollo.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso de la albúmina de aves para hidrolizar moléculas organofosforadas. En una realización preferida, la albúmina se selecciona de entre albúmina de pavo o albúmina de pollo.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso de la albúmina de aves para procesos de biorremediación. En una realización preferida, la albúmina se selecciona de entre albúmina de pavo o albúmina de pollo.

- 5 Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso de la albúmina de aves para el aislamiento de compuestos quirales. En una realización preferida, la albúmina se selecciona de entre albúmina de pavo o albúmina de pollo.

- 10 Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso de la albúmina de aves como biosensor. En una realización preferida, la albúmina se selecciona de entre albúmina de pavo o albúmina de pollo.

- 15 Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere a métodos para producir un polipéptido según la presente invención, que comprende (a) cultivar una célula, que en su forma de tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; (b) recuperar y/o recolectar dichas células o tomar una muestra del medio de cultivo de las células; c) aislar y purificar el polipéptido.

- 20 Preferiblemente, la célula es cualquiera de las células descritas en el presente documento, más preferiblemente, la célula es del género *Saccharomyces cerevisiae*, y más preferiblemente *Pichia pastoris*.

- 25 Aunque *Escherichia coli* (*E. coli*) fue el primer hospedero empleado para expresar proteínas humanas recombinantes, tiene inconvenientes para hacer algunas modificaciones postraduccionales, como la glicosilación. Debido a esto, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ha sido utilizada. Sin embargo, debido a que forma en las proteínas derivados glicosilados diferente a las células humanas, produce proteínas antigénicas. Sin embargo más recientemente se están usando  
30 otras levaduras no-convencionales, como *Pichia pastoris* (*P. pastoris*).

- La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprende (a) cultivar una célula huésped que comprende una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el  
35 polipéptido de la invención bajo condiciones propicias para la producción del

polipéptido, y (b) recuperar y/o recolectar dichas células o tomar una muestra del medio de cultivo de las células; c) aislar y purificar el polipéptido.

5 En una realización preferida de los métodos descritos en el presente documento, estos se caracterizan por que en la etapa b) se prepara un extracto crudo o extracto clarificado homogeneizado. En otra realización más preferida del método de la invención, es opcional enriquecer el nivel de pureza del péptido en el extracto homogeneizado o en el extracto crudo.

10 En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula *Pichia pastoris* puede ser cultivada por cultivo en matraz de agitación, y a pequeña escala o fermentación a gran escala (incluyendo continua, por lotes, alimentación por lotes, o fermentaciones en estado  
15 sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones permitiendo que el polipéptido sea expresado y / o aislado.

20 El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection).

25 Si el polipéptido se secreta en el medio nutritivo, el polipéptido puede ser recuperado directamente del medio. Si el polipéptido no se secreta, se puede recuperar a partir de lisados celulares.

30 Los polipéptidos pueden ser detectados usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, formación de un producto enzimático, o desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad del polipéptido como se describe en el presente documento.

35 El polipéptido resultante puede ser recuperado usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede ser recuperado del medio nutritivo por

procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitado a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, precipitación, uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto, o la desaparición de un sustrato.

5 Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, de interacción hidrofóbica, de filtración en gel, HPLC), métodos electroforéticos (isoelectroenfoque preparativo, electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida-SDS), solubilidad  
10 diferencial (precipitación con sulfato amónico), ultracentrifugación preparativa en gradiente de sacarosa. Una vez que se ha alcanzado el grado deseado de pureza, lo que puede requerir más de un paso cromatográfico, es frecuente que sea necesario concentrar la proteína o eliminar sales e iones que puedan ser perjudiciales para su posterior uso. En ese caso, se recurre a técnicas conocidas, tales como liofilización o  
15 ultrafiltración.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a un método para el aislamiento de isómeros a partir de una mezcla racémica de compuestos organofosforados que comprende las siguientes etapas: a) incubar una mezcla  
20 racémica de compuestos organofosforados con al menos uno de los péptidos, secuencias nucleotídicas, construcción de ácido nucleico, vector, célula, polipéptido de fusión, composición, o biosensor descritos en el presente documento, en presencia de al menos un catión metálico, según se describe en el presente documento; b) recuperar y/o recolectar los compuestos obtenidos; y c) aislar, purificar e identificar el  
25 isómero.

La etapa a) puede llevarse a cabo en reactores en los que se mezclan la mezcla racémica de compuestos organofosforados en presencia de al menos un catión metálico, y el biocatalizador y/o composición de la invención. La detección de los  
30 isómeros obtenidos se realiza por cualquier metodología conocida por el experto medio en el presente campo técnico, tales como por ejemplo, sin ser limitativas, técnicas de extracción con solventes o técnicas cromatográficas.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a un método de  
35 desintoxicación y tratamiento de un sujeto que ha estado expuesto a contaminación por moléculas organofosforadas que comprende la administración a dicho sujeto de

un cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido, o del polinucleótido, o de la construcción de ácido nucleico, o del vector, o de la célula, o del polipéptido de fusión, o de la composición, según se describe a lo largo de la presente invención.

- 5 A efectos de la presente invención el término sujeto se refiere a se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye pero no se limita a animales de granja y domésticos, primates y humanos, por ejemplo seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.
- 10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y
- 15 no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1 (A)** ilustra el efecto de la concentración de cobre sobre los niveles de hidrólisis del O-hexil,O-2,5 diclorofenilfosforamidato (HDGP) en el suero de pollo y su comparación en presencia de (B) calcio, EDTA y Tris.

La **Figura 2** muestra los niveles de hidrólisis de cada uno de los dos isómeros de HDGP por efecto de su incubación con suero (S) de pollo (10 µL) y su respectiva concentración de albúmina (A) (216 µg) en presencia de cobre o EDTA durante 60 y

25 120 minutos en condiciones fisiológicas de pH y temperatura.

La **Figura 3** muestra el efecto activador del cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) sobre la hidrólisis del isómero R-HDGP por la albúmina del suero de pollo y la hidrólisis de los dos isómeros de la albúmina de suero de pavo.

La **Figura 4** muestra la capacidad de hidrólisis de diferentes especies de albúminas de vertebrados (excluyendo aves) sobre el compuesto HDGP y efecto de diferentes concentraciones de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Cada punto representa el promedio  $\pm$  SD de tres experimentos realizados con 216 µg de albúmina de oveja (OSA), de perro (DSA), de cerdo (PSA) o de lamprea (LSA) incubada con HDGP racémico 400 µM (200 µM de cada isómero) y diferentes concentraciones de cobre durante 60 min a 37°C y pH 7.4.

35 La **Figura 5** muestra el efecto de diferentes cationes sobre la hidrólisis de ambos isómeros de HDGP de la albúmina de suero de pavo.

La **Figura 6** muestra el efecto de cobre sobre la hidrólisis de ambos isómeros de tricloronato por la albúmina de suero de pavo.

La **Figura 7** ilustra el efecto del pH sobre la hidrólisis de ambos isómeros de HDCP en presencia de EDTA (A) y  $\text{Cu}^{2+}$  (B) por la albúmina de suero de pollo.

5 La **Figura 8** muestra el efecto del tiempo de pre-incubación con  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  sobre la hidrólisis de los isómeros de HDCP de las albúminas del suero de pollo y de pavo.

La **Figura 9** ilustra el efecto de la pre-incubación de  $\text{Ni}^{2+}$  sobre la hidrólisis de isómeros de HDCP de las albúminas de pollo y pavo en presencia de cobre (100  $\mu\text{M}$ ) e incubados a 37°C, pH 7.4 durante 60 minutos.

10

## EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad y utilidad del producto y métodos de la invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

15

20

## Materiales y métodos.

Los compuestos organofosforados utilizados en los ejemplos descritos a continuación son el HDCP y el tricloronato, en forma racémica, utilizando los isómeros S y R de ambos compuestos. El rango de concentraciones utilizadas para los mismos han sido de 100  $\mu\text{M}$  a 400  $\mu\text{M}$ , siendo preferidas concentraciones de 400  $\mu\text{M}$ , equivalente a 200  $\mu\text{M}$  para cada isómero.

25

Las enzimas utilizadas han sido la albúmina de pollo o pavo, presentes en el suero de pollo (CSA) (10  $\mu\text{L}$ ) o pavo (TSA) (10  $\mu\text{L}$ ) respectivamente, así como las albúminas comerciales (Sigma Aldrich) procedentes de diferentes especies, tales como peces, preferentemente lamprea (LSA), mamíferos, tales como oveja (OSA), perro (DSA) y cerdo (PSA), y aves tales como pollo o pavo, a una concentración de 216  $\mu\text{g}$  disueltos en 100  $\mu\text{L}$  de tampón Tris 10 mM, pH 7.4. Por otro lado, el volumen de tampón Tris 10 mM empleado en la reacción fue el necesario para completar 1 mL de reacción enzimática para todos los casos.

35

- Los cofactores metálicos divalentes utilizados han sido,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Ca}^{2+}$ , entre otros, en forma de sales metálicas tales como por ejemplo, sulfato de cobre (1-500  $\mu\text{M}$ ), sulfato de calcio (2.5 mM) o sulfato de zinc (1-500  $\mu\text{M}$ ). Adicionalmente se ha utilizado como quelante EDTA 5 mM. Con el propósito de obtener en el volumen de reacción final de 1 mL a un rango de concentraciones que varíe de 1 nM hasta 2.5 mM, se emplearon volúmenes desde 0.2  $\mu\text{L}$  hasta 250  $\mu\text{L}$  de soluciones 10 mM de las sales metálicas mencionadas anteriormente, y 250  $\mu\text{L}$  de EDTA 20 mM, para obtener concentraciones de 5 mM en cada caso.
- La reacción de hidrólisis de los compuestos organofosforados HDCP y tricloronato analizados se paró con una solución específica en función del análisis posterior que se lleva a cabo para la determinación de la concentración de los compuestos liberados en dicha reacción de hidrólisis, 1,2 diclorofenol (DCP) o triclorofenol (TCP) respectivamente.
- Para el análisis de la concentración de los compuestos DCP o TCP liberados mediante métodos colorimétricos, se para la reacción con la adición de 750  $\mu\text{L}$  de una solución que comprende 2% de SDS/0.25 mg de aminoantipirina/mL en tampón Tris 50 mM/EDTA 1 mM pH 8. Posteriormente se añadieron 375  $\mu\text{L}$  de ferricianuro potásico al 0.4% utilizado como quelante y para la formación de color. Dicha formación de color fue analizado mediante un espectrofotómetro UV/VIS midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm. Los valores de absorbancia de cada compuesto organofosforado analizado se corrigió utilizando los valores de las absorbancias medidos para los controles de hidrólisis espontánea (en ausencia de suero o proteína) y para el blanco colorimétrico del suero. La cantidad de DCP o TCP respectivamente liberada, se determinó por comparación con su respectiva curva de calibrado. Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles}$  de DCP/minuto/mL de suero ó  $\mu\text{g}$  de albúmina, o TCP/minuto/mL de suero ó  $\mu\text{g}$  de albúmina.
- Para el análisis cromatográfico de los isómeros S y/o R de cada compuesto organofosforado, y de los compuestos DCP o TCP obtenidos tras la reacción de hidrólisis de los mismos, la reacción se para la reacción con la adición de 40  $\mu\text{L}$  de una solución 0.2 M de HCl, que además de parar la reacción propicia un medio ácido óptimo para la extracción de los isómeros R y S de los compuestos organofosforados HDCP y tricloronato. Posteriormente, se añaden 2 mL de 1,2-dicloroetano o heptano para cuantificar la cantidad residual de cada isómero de cada compuesto

organofosforado testado, HDCP o tricloronato, respectivamente. Dicha mezcla se mantiene en agitación durante 45 minutos y se centrifugó en frío a 1000 x g durante 15 minutos. De la capa inferior (fase orgánica - 1,2-dicloroetano) se retiró con una microjeringa 1 mL y se depositaron 25 µL de cada muestra en los viales del automuestreador del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector Ev/VIS y columnas quirales, OA-4100, (HPLC Technology Ltd) y CHIRALCEL-OD (Daicel Chem. Ind., LTD).ico HPLC. Las condiciones cromatográficas utilizadas han sido:

- a) Fase móvil: hexano/1,2-dicloroetano/etanol 92:5:3 (v/v/v) a un flujo de 1.5 mL/min para el caso de HDCP y heptano 1 mL/min para el caso de tricloronato.
- b) Detección: detector UV/VIS a  $\lambda$  230 nm.
- c) Columna: quiral Techocel OA-4100, 25 cm x 4.6 mm para el caso de HDCP y Daicel OD 25 cm x 4.6 mm para el caso de tricloronato.

Con estas condiciones, los volúmenes de eluciones fueron de: 1=9-10 min y 2=10.5-11.5 minutos para los isómeros R-HDCP y S-HDCP y 7-8.2 y de 8.3-9 min para los isómeros R-tricloronato y S-tricloronato. La cuantificación de los picos cromatográficos se realizó con el valor de área correspondiente de cada estereoisómero. Los resultados se expresan en concentración µM de isómeros R o S residuales para cada tiempo establecido en los diferentes ensayos.

Todos los ensayos se realizaron a una temperatura de 37°C durante diferentes tiempos dependiendo del ensayo.

**Ejemplo 1. Hidrólisis de compuestos organofosforados mediante el tratamiento con albúminas presentes en suero de pollo (CSA) o de pavo (TSA) en presencia de cationes divalentes ( $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ).**

Para demostrar la capacidad hidrolítica sobre compuestos organofosforados (HDCP o tricloronato) de las albúminas de aves, preferentemente de las albúmina de pollo y/o de pavo, se contactaron mezclas racémicas de dichos compuestos organofosforados, HDCP o tricloronato, con suero de pollo (CSA) o de pavo (TSA), que comprendían sus correspondientes albúminas, en presencia o no, de cationes metálicos divalentes.

Brevemente, en un tubo de ensayo se deposita una disolución que contiene 216 µg de albúmina de suero de pavo (TSA) o de pollo (CSA) disueltos en 100 µL de Tris 10 mM,

a los cuales se les añaden 100  $\mu\text{L}$  de una solución estándar 4 mM del compuesto organofosforado HDCP o tricloronato, y 250  $\mu\text{L}$  de una sal metálica, en este caso particular se utiliza sulfato de cobre de una solución estándar 10 mM. A continuación, se añaden 550  $\mu\text{L}$  de Tris 10 mM, pH 7.4, para ajustar el volumen de la reacción a 1 mL en el tubo de ensayo. La reacción se incubaba a 37 °C durante un tiempo que varía de 60 a 120 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se para la reacción y los productos obtenidos de la reacción de hidrólisis, así como los isómeros R y S residuales se analizan mediante métodos colorimétricos y/o cromatográficos, según se ha descrito previamente en el apartado de materiales y métodos.

10

Para el análisis del producto de hidrólisis formado (DCP o TCP) mediante técnicas colorimétricas tal y como se ha descrito previamente, la reacción se para con la adición de 750  $\mu\text{L}$  de 2% de SDS/0.25 mg de aminoantipirina/mL de Tris 50 mM/EDTA 1 mM pH 8 y 375  $\mu\text{L}$  de ferricianuro potásico al 0.4%. Se deja reposar la mezcla durante aproximadamente 15 minutos y posteriormente se cuantifica la intensidad de color (absorbancia) mediante espectrofotometría a 510 nm en el espectrofotómetro UV/VIS. Los valores de absorbancia de los grupos experimentales se corrigieron como se ha mencionado anteriormente. La cantidad de residual de isómeros de ambos compuestos organofosforados se determinó con una curva de calibrado de concentraciones 0, 100, 200 y 300  $\mu\text{M}$  para cada isómero del compuesto organofosforado testado.

20

Como se pone de manifiesto en la **Figura 1A**, para el caso particular del HDCP, el suero de pollo (CSA) es capaz de hidrolizar el compuesto organofosforado HDCP dando lugar a compuesto DCP, en presencia de concentraciones de 10 hasta 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ , alrededor de 20 veces más con respecto a la hidrólisis de este mismo compuesto cuando se pone en contacto con suero de pollo (CSA) en presencia de calcio (2.5 mM), EDTA (5 mM) o Tris en condiciones fisiológicas de pH y temperatura durante 60 o 120 minutos de incubación (**Figura 1B**).

30

Para el análisis por métodos cromatográficos de los isómeros y del producto de hidrólisis obtenido tras la reacción de hidrólisis del HDCP, se sigue el protocolo descrito anteriormente en el apartado de Materiales y Métodos. Brevemente, la reacción se para con la adición de 40  $\mu\text{L}$  de una solución 0.2 M de HCl (propicia un medio ácido óptimo para la extracción de los isómeros de los compuestos organofosforados) y se añaden 2 mL de 1,2-diclorometano para el caso de HDCP o

35

heptano para el caso de tricloronato. Posteriormente la mezcla se agita durante 45 minutos y se centrifugó a 1000 x g durante 15 minutos en una centrifuga refrigerada a 4 °C. De la fase orgánica (1,2-dicloroetano) se retira 1 mL y se depositan 20 µL en los viales del automuestreador del HPLC que presenta las condiciones descritas anteriormente y se procede al análisis de la concentración de los isómeros R o S, así como del producto resultante de la hidrólisis, DCP, en el caso concreto del compuesto HDCP.

Tal y como se observa en las **Figuras 2 y 3**, la hidrólisis de cada uno de los isómeros R y S del compuesto HDCP en presencia de CSA (10 µL) o albúmina de pollo (210 µg), es dependiente de  $\text{Cu}^{2+}$  (100 µM de sulfato de cobre), ya que en presencia de EDTA 5 mM se inhibe la hidrólisis de HDCP en los tiempos analizados, 60 y 120 minutos (**Figura 2**). Por otro lado, la **Figura 2** muestra que la albúmina de pollo en presencia de cobre es capaz de hidrolizar el isómero R-HDCP en mayor medida que el S-HDCP, demostrando su estereoselectividad para el isómero R, respecto al S.

Para demostrar si el suero de pavo o la albúmina de pavo es a su vez estereoselectivo(a) para el isómero R respecto al S del compuesto HDCP, al igual que sucede con el suero y con la albúmina de pollo, se comparó la capacidad hidrolítica del suero de pollo (CSA) frente al suero de pavo (TSA) en una reacción de hidrólisis para HDCP en presencia de cobre. Como se muestra en la **Figura 3**, la capacidad hidrolítica del suero de pavo (TSA) fue mayor, alrededor del doble, que la capacidad hidrolítica de la albúmina presente en el suero de pollo (CSA), ya que la albúmina de suero de pavo (TSA) hidrolizó los dos isómeros de HDCP a la misma velocidad, es decir, no es estereoselectiva (**Figura 3**), mientras que la de pollo, como hemos comentado anteriormente, si es estereoselectiva para el isómero R-HDCP (**Figura 3**).

Para demostrar que la capacidad hidrolítica de compuestos organofosforados por parte de las albúminas de pollo y pavo, en presencia de cationes metálicos, reside en la región N-terminal, específicamente en aquéllas albúminas que comprenden en dicha región la SEQ ID NO: 1, y más específicamente la SEQ ID NO: 2, se testaron diferentes albúminas de diferentes especies en presencia de cobre como catión metálico, para poner de manifiesto que aquellas albúminas que no presentan en su región N-terminal las secuencias SEQ ID NO: 1, o más específicamente la SEQ ID NO: 2, no muestran actividad hidrolítica de dichos compuestos organofosforados. Las albúminas testadas fueron las albúminas de mamífero presentes en el suero de oveja

(OSA), perro (DSA) y cerdo (PSA), o albúminas de peces tales como la lamprea (LSA). Estas albúminas fueron obtenidas comercialmente de Sigma Aldrich (España).

5 Tal y como se muestra en la **Figura 4**, las albúminas presentes en los sueros OSA, DSA, PSA o LSA presentan una escasa capacidad de hidrólisis del compuesto HDCP. En cambio, tal y como se ha demostrado en la **Figura 3** la capacidad de hidrólisis de HDCP por parte de las albúminas presentes tanto en el suero de pavo (TSA) como en el de pollo (CSA) es muy alta, específicamente para el caso de la albúmina de pavo que presenta una alta actividad hidrolítica para ambos isómeros del compuesto  
10 HDCP, mientras que la albúmina presente en el suero de pollo (CSA), muestra una alta capacidad hidrolítica estereoselectiva para el isómero R-HDCP.

Adicionalmente, también se llevó a cabo un experimento para demostrar cuales eran los cationes divalentes que activaban en mayor medida la capacidad hidrolítica frente  
15 a compuestos organofosforados de las albúminas testadas. Para ello se incubó la albúmina de pavo junto con HDCP y en presencia de diferentes cationes divalentes (zinc, hierro, calcio, manganeso, magnesio, níquel, cobalto y cobre), a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  para cada uno de ellos y se analizó la concentración de cada isómero del HDCP. Como se muestra en la **Figura 5**, el cobre y el zinc fueron los  
20 dos únicos cationes metálicos que activaron la hidrólisis de HDCP por la albúmina de pavo. Específicamente, la mayor capacidad hidrolítica de la albúmina frente al HDCP se llevó a cabo en presencia de cobre.

De la misma manera que se analizó la capacidad hidrolítica de las albúminas de pavo  
25 y pollo para el compuesto organofosforado HDCP, se testó dicha capacidad para el insecticida comercial organofosforado tricloronato. Los resultados ponen de manifiesto que la albúmina de pavo presenta actividad catalítica para tricloronato que es ligeramente estereoselectiva a favor del isómero S-tricloronato (en su forma "tio") (**Figura 6**), a diferencia de la capacidad hidrolítica para el HDCP que no presentó  
30 dicha estereoselectividad (**Figura 3**).

Posteriormente se analizó si el pH podría influir en capacidad hidrolítica de compuestos organofosforados por parte de las albúminas de ave, específicamente de las albúminas de pollo y/o pavo, en presencia de cationes metálicos. Para ello, se  
35 incubó la albúmina presente en el suero de pollo en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  a diferentes pHs dentro del rango de pH 4 a pH 10. Como se observa en la

**Figura 7**, la capacidad catalítica del compuesto HDCP por parte de dicha albúmina se redujo cuando el pH del medio era mayor de 7 y quedó completamente inhibida a pH mayor de 9. Por otro lado, también se analizó si la actividad catalítica de la albúmina de pollo o pavo, en presencia de cationes divalentes se veía afectada cuando se preincubaban dichas proteínas a diferentes tiempos (0, 15 y 30 minutos) en presencia de cationes metálicos (100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ ). Los resultados mostrados en la **Figura 8** demuestran que la preincubación de las albúminas de ave en presencia de  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  y posterior incubación con  $\text{Cu}^{2+}$ , hacen que particularmente para el caso de la preincubación con  $\text{Zn}^{2+}$ , la albúmina de pollo pierda su capacidad estereoselectiva de hidrólisis sobre el isómero R-HDCP, mientras que la albúmina de pavo disminuye su capacidad hidrolítica para ambos isómeros del compuesto HDCP. En cambio, la preincubación con  $\text{Ni}^{2+}$ , en las mismas condiciones de concentraciones y tiempos de incubación que para el  $\text{Zn}^{2+}$ , no fue capaz de inhibir o afectar la hidrólisis de HDCP característica de las dos albuminas en presencia de cobre (**Figura 9**).

En estudios posteriores se incubaron las albúminas de pavo o de pollo en presencia de cobre y HDCP y compuestos que reaccionan con aminoácidos específicos. Dichos compuestos han sido, N,N'-diciclohexilcarbodiimida que reacciona con los aminoácidos aspártico y glutámico, diisopropilfluorofosfato y paraoxon que reaccionan con serina y tirosina, N-etilmaleimida (N-NEM), p-nitrofenol y 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) que reaccionan con los grupos -SH de cisteína, y otros. La presencia de estos compuestos no alteró la propiedad de dichas proteínas para hidrolizar HDCP en presencia de cobre, lo que confirma que en el sitio donde ocurre esta catálisis no están implicados estos aminoácidos. Mediante este ensayo se demuestra que la propiedad catalítica de compuestos organofosforados por parte de las albúminas de pollo o pavo, involucra a la región N-terminal de las mismas.

En conclusión, la actividad catalítica particular de romper compuestos esteres organofosforados (actividad fosfotriesterasa) de las albuminas de pollo y pavo es debido a la alta afinidad que presentan frente a los cationes cobre y zinc en su secuencia N-terminal DAEHK (SEQ ID NO: 2).

## REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una secuencia peptídica que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una secuencia nucleotídica que codifica para dicha secuencia peptídica que tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y al menos un cofactor caracterizado por que es un catión divalente.
2. Composición según la reivindicación 1 caracterizada por que comprende una secuencia peptídica seleccionada entre la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y/o cualquiera de sus combinaciones; o una secuencia nucleotídica seleccionada entre la SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y/o cualquiera de sus combinaciones.
3. Composición según la reivindicación 2 caracterizada por que la secuencia peptídica es la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y/o cualquiera de sus combinaciones.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizada por que el catión divalente se selecciona de entre cualquiera de la siguiente lista:  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y/o cualquiera de sus combinaciones.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizada por que el catión divalente es  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ , preferentemente  $\text{Cu}^{2+}$ .
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizada por que comprende la SEQ ID NO: 3 y/o la SEQ ID NO: 4, y  $\text{Cu}^{2+}$ .
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 caracterizada por que es una composición farmacéutica o veterinaria.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizada por que adicionalmente comprende al menos un principio activo seleccionado de entre cualquiera de los siguientes: bloqueante de receptor colinérgico, preferentemente atropina, bloqueante de calcio, bloqueante de acetilcolinesterasas, bloqueante de butirilcolinesterasas, ansiolítico, anticonvulsivo, sedante, oximas, preferentemente pralidoxima, activadores de colinesterasas y/o cualquiera de sus combinaciones.

9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 caracterizada por que además comprende un vehículo o excipiente, farmacéutica o veterinariamente aceptable.
- 5 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 caracterizada por que se encuentra en estado líquido o sólido.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 caracterizada por que es una composición de liberación controlada.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 caracterizada por que es un biocatalizador.
- 10 13. Biosensor y/o biorremediador que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la elaboración de un medicamento.
- 15 15. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de intoxicaciones por compuestos organofosforados, ésteres carbámicos y/o ésteres carboxílicos.
16. Uso la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o de un biosensor y/o biorremediador según la reivindicación 13, como biocatalizador en procesos de biorremediación.
- 20 17. Uso según la reivindicación 16 caracterizado por que cataliza reacciones de hidrólisis de compuestos organofosforados, ésteres carbámicos y/o ésteres carboxílicos.
- 25 18. Secuencia peptídica aislada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
19. Secuencia peptídica aislada según la reivindicación 18 caracterizada por que comprende una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 2.
20. Secuencia nucleotídica aislada que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19.
- 30 21. Secuencia nucleotídica aislada complementaria a la secuencia nucleotídica de acuerdo con la reivindicación 20.
22. Construcción génica que comprende la secuencia peptídica según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19 o la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21.
- 35 23. Vector de expresión recombinante que comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21.

24. Célula o microorganismo huésped que comprende un vector recombinante según la reivindicación 23.

25. Método para la síntesis de una secuencia peptídica según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, que comprende:

- 5           a) Cultivar una célula que comprende una secuencia peptídica según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, o una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21, bajo condiciones que permitan su crecimiento, y síntesis de dicha secuencia peptídica,
- 10          b) Recuperar y/o recolectar dichas células o tomar una muestra del medio de cultivo de las mismas, y
- c) Aislar y purificar la secuencia peptídica.

FIG. 1

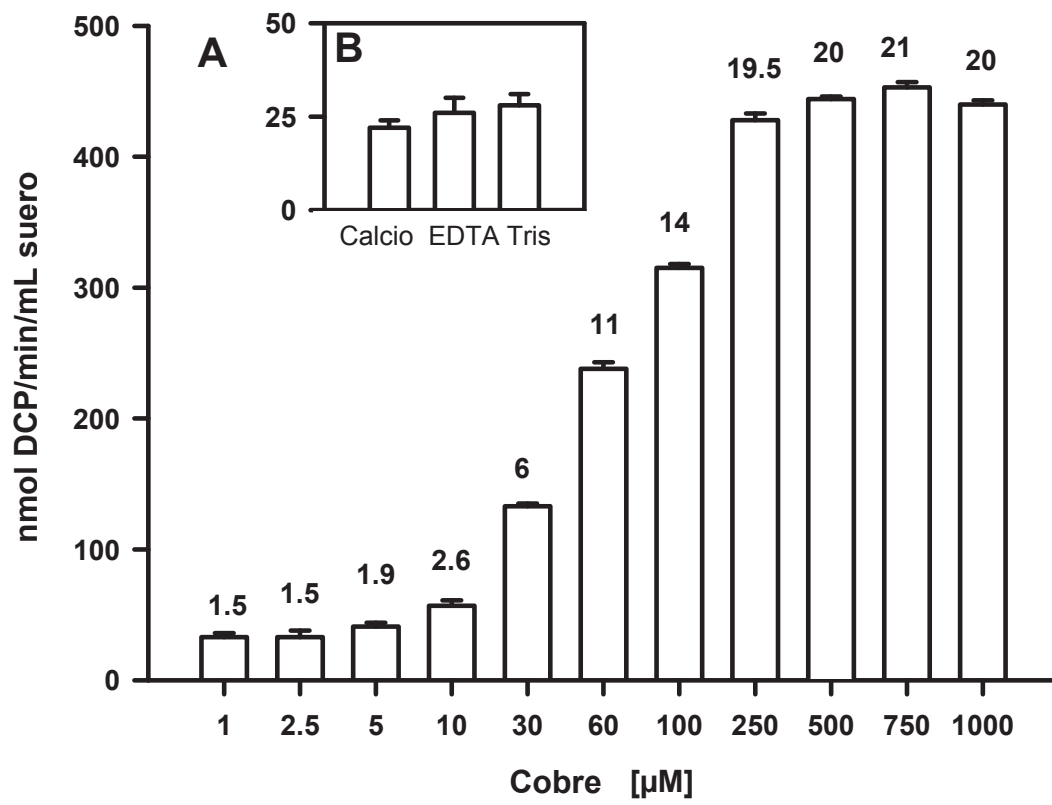


FIG. 2

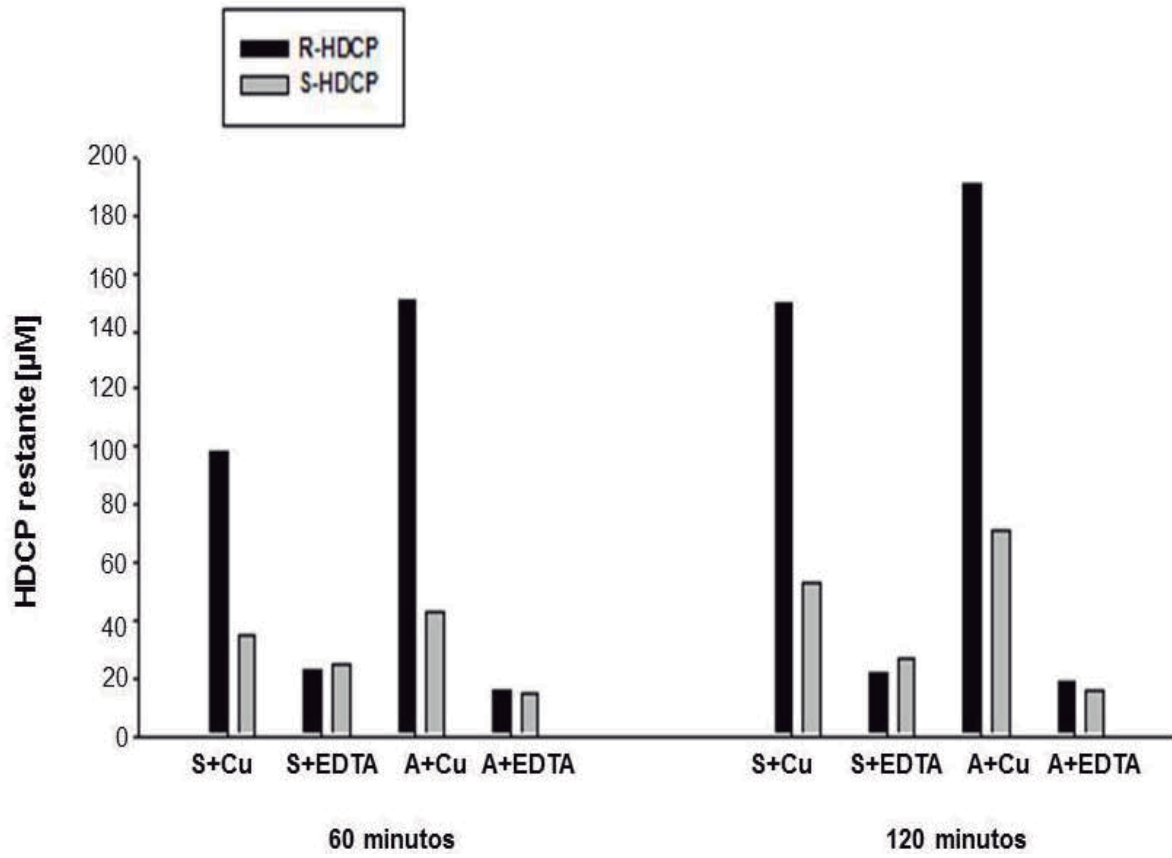


FIG. 3

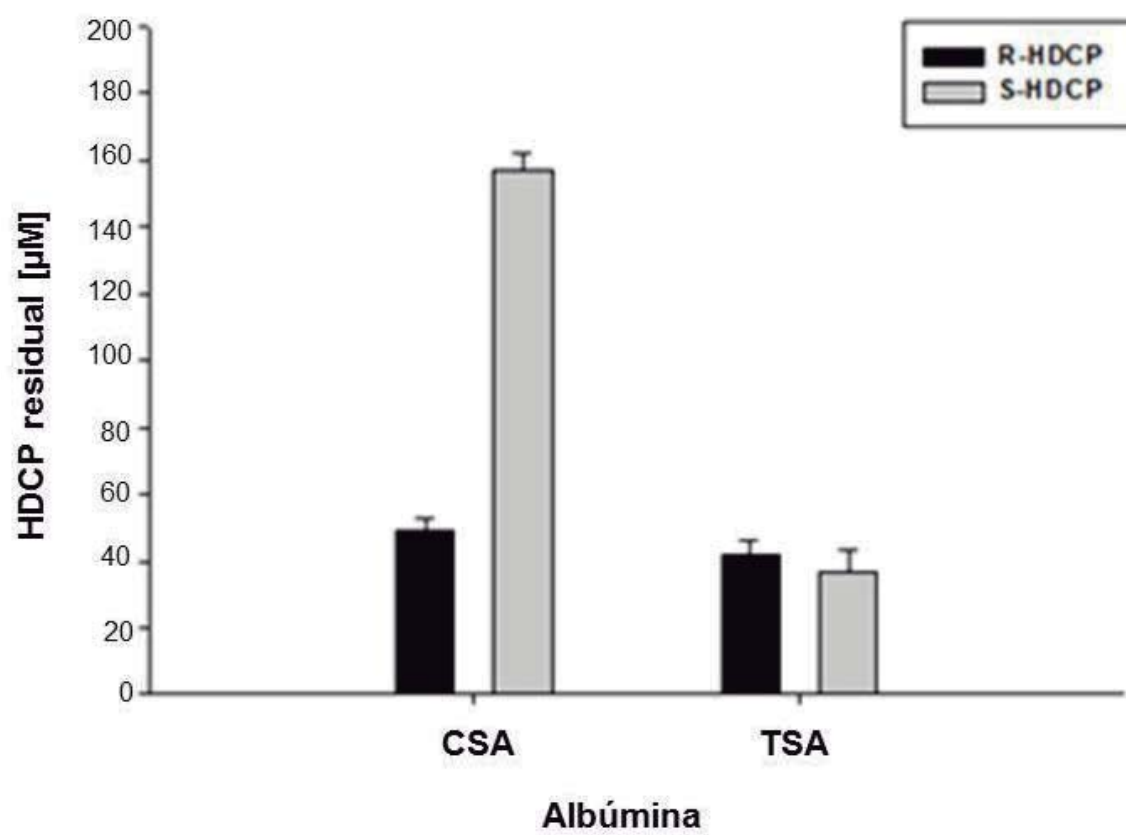


FIG. 4

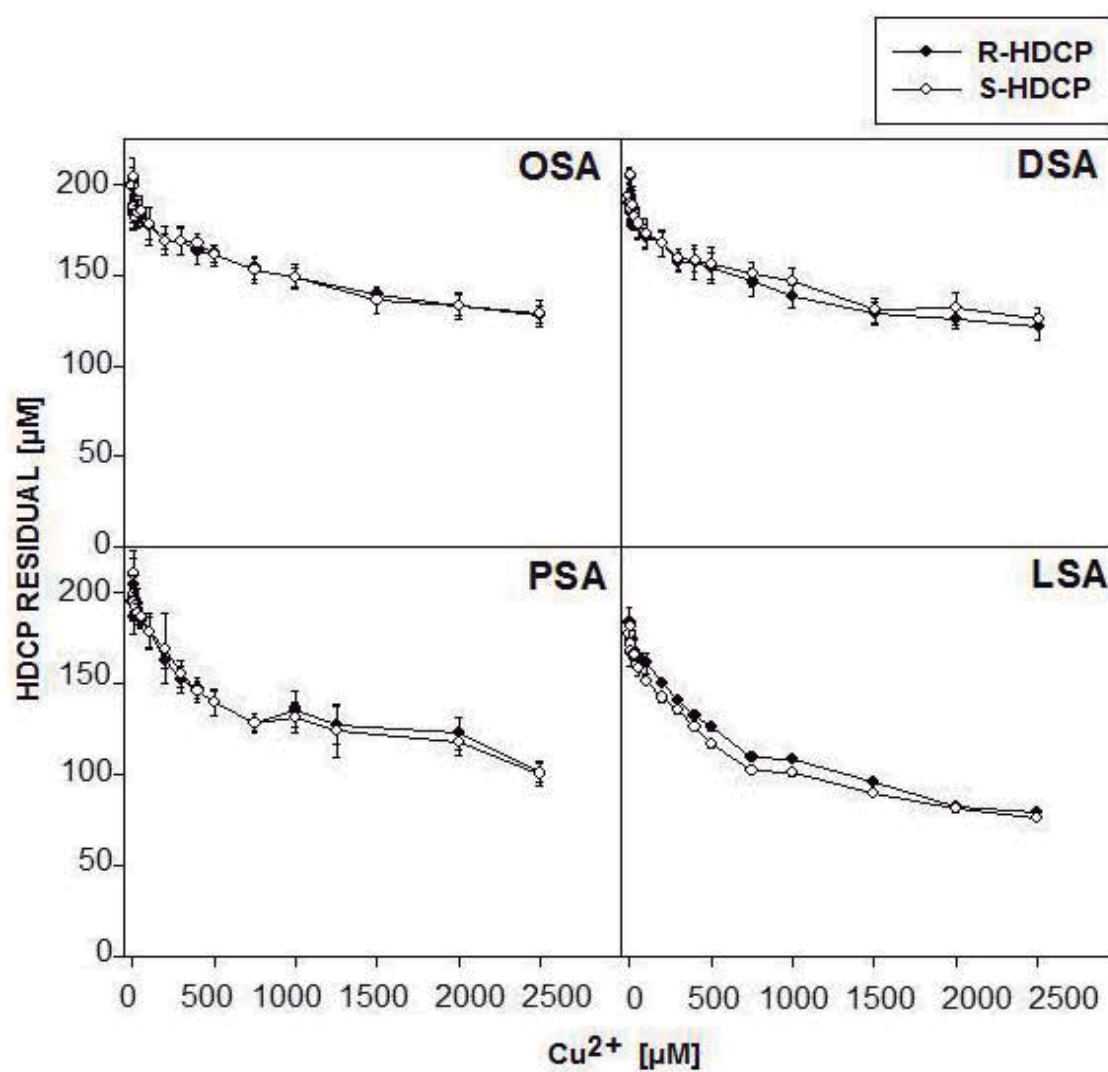


FIG. 5

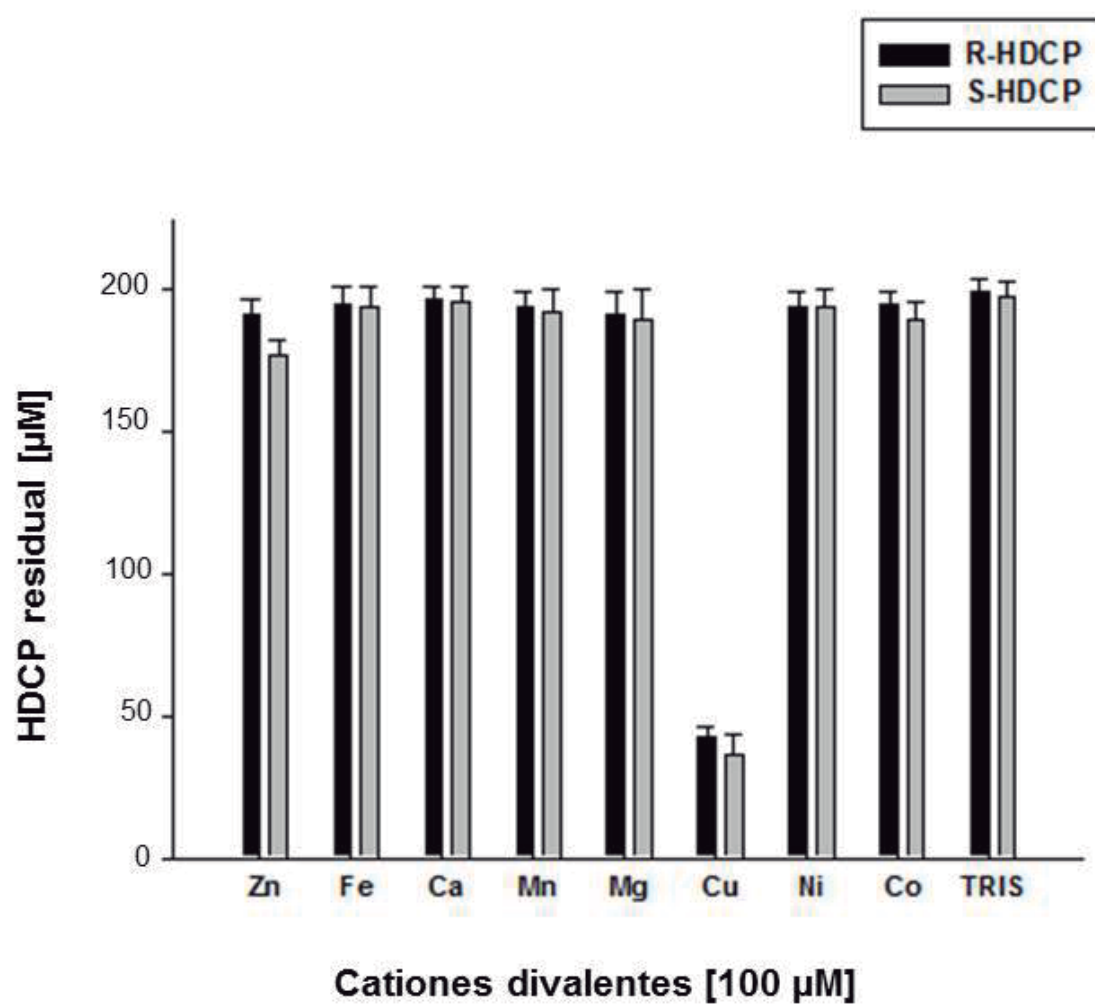


FIG. 6

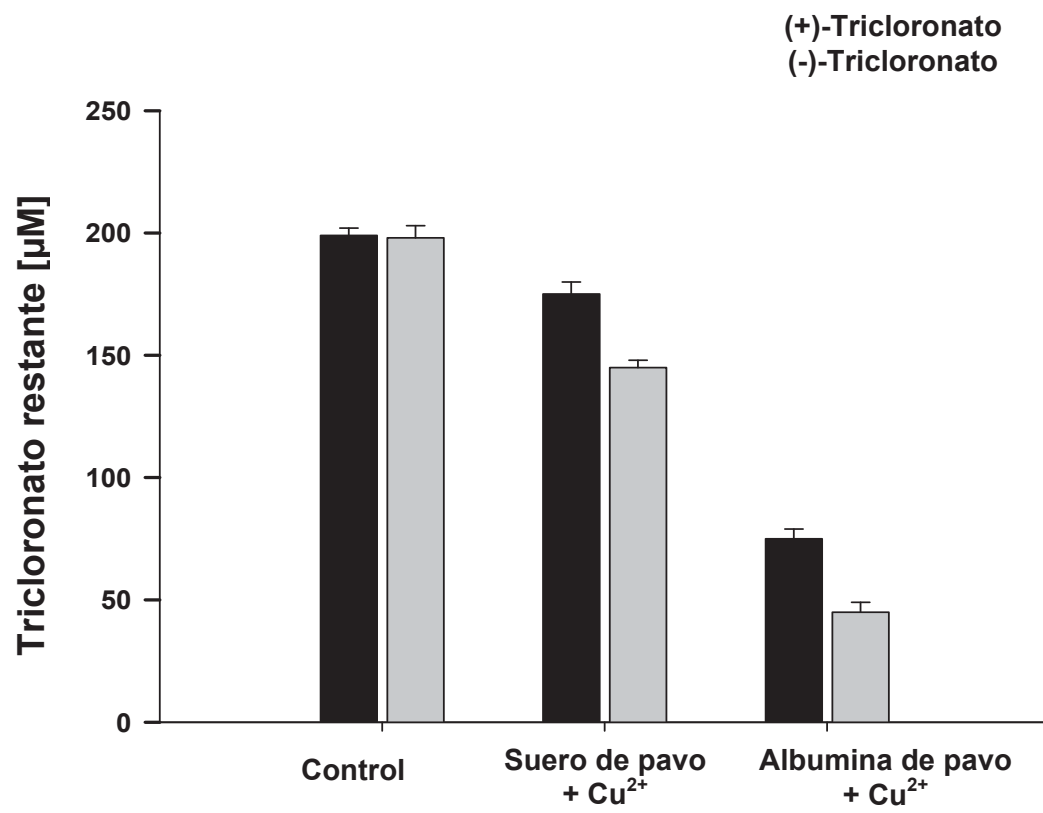


FIG. 7

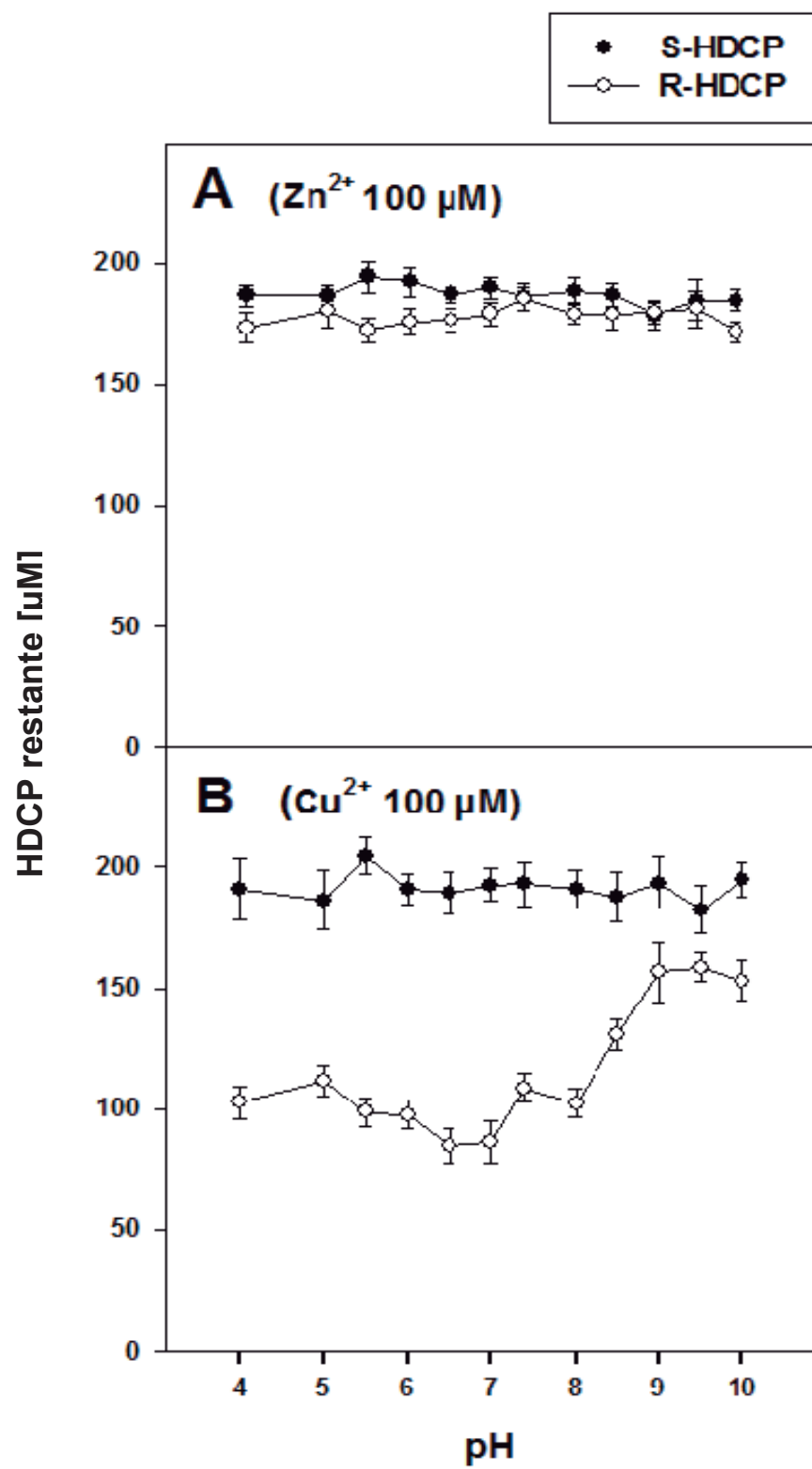


FIG. 8

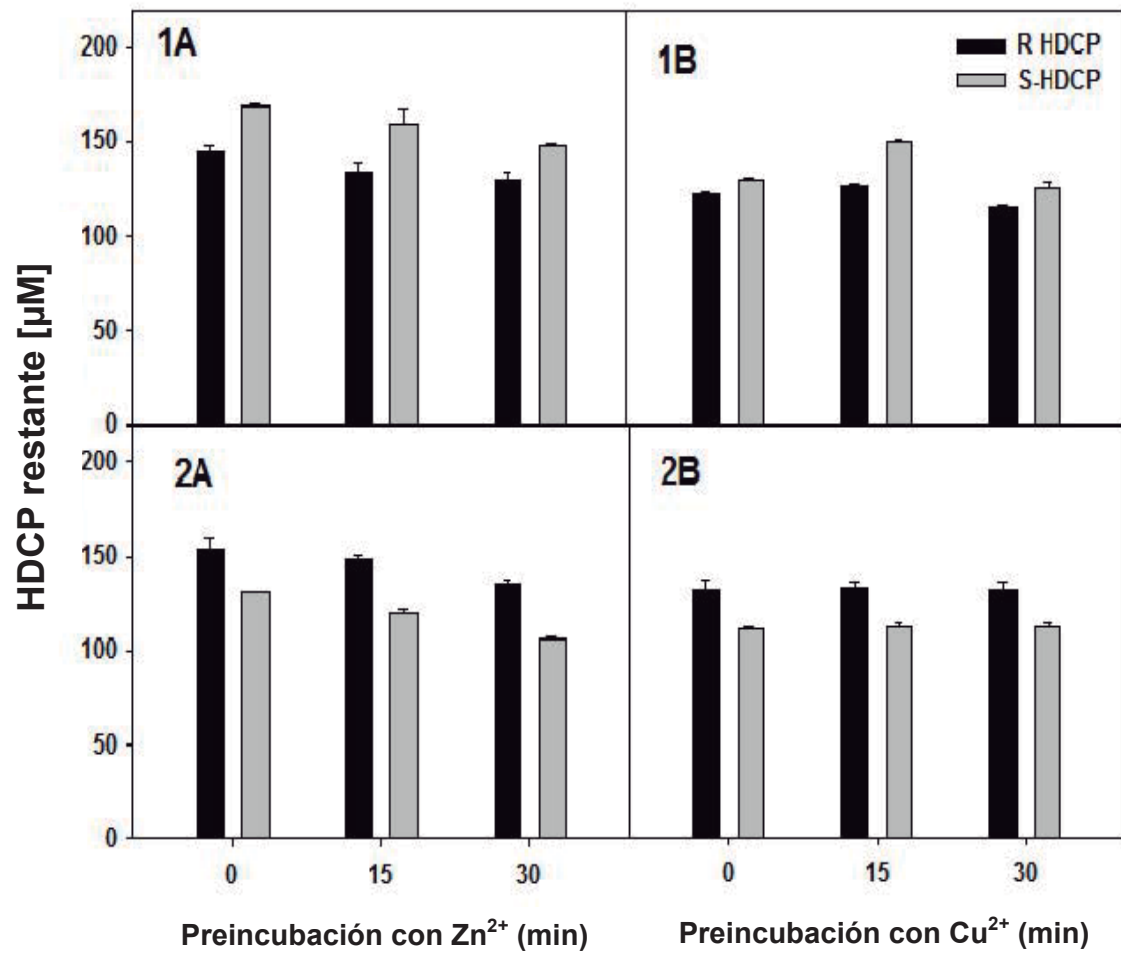
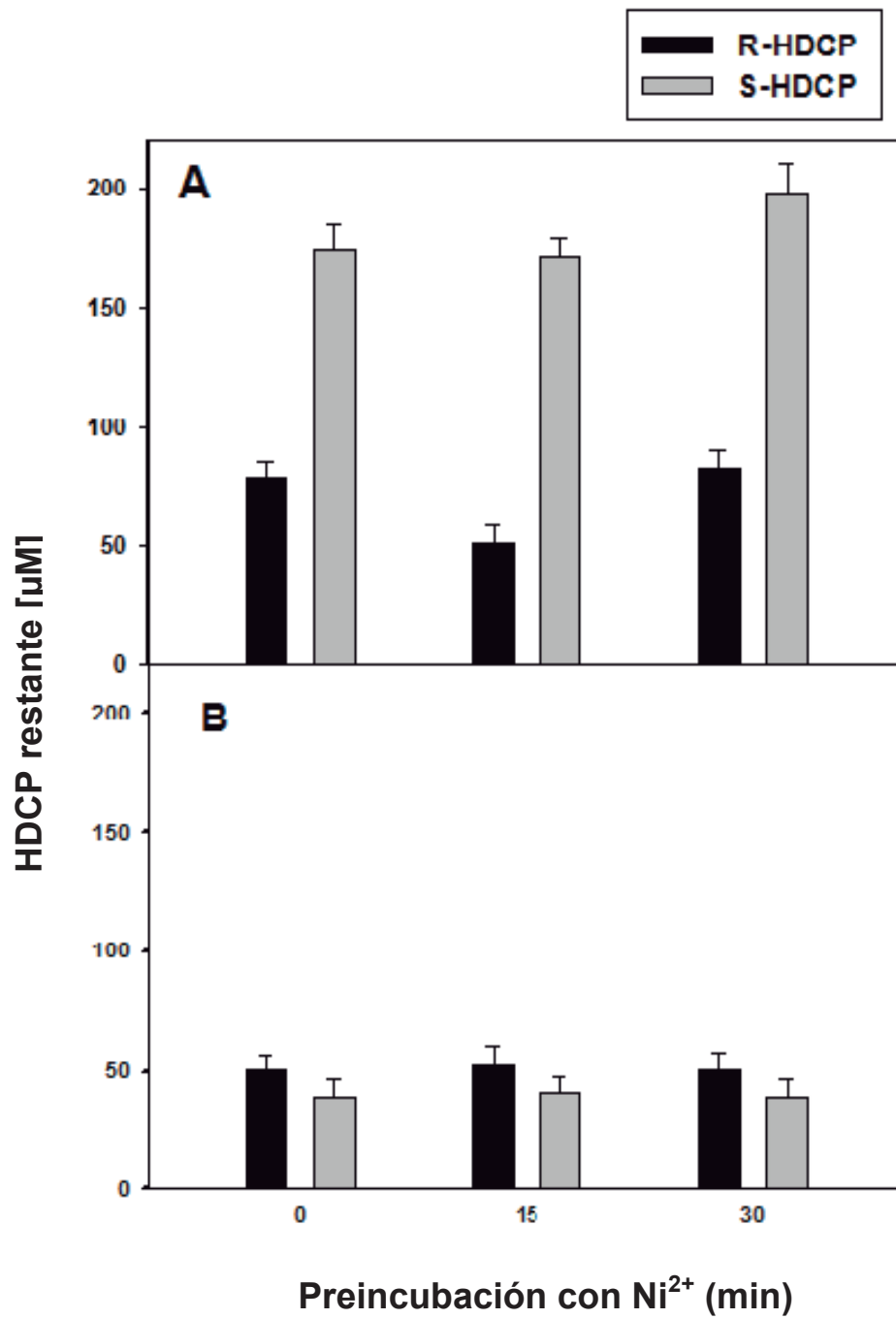


FIG. 9



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Miguel Hernández

<120> Albúminas y péptidos capaces de hidrolizar compuestos organofosforados y carbamatoss, y usos de los mismos.

<130> ES2047.16

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Región catalítica N-terminal de la Albúmina de aves

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 1

Xaa Xaa Glu His Xaa

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Región catalítica N-terminal de la Albúmina de aves

<400> 2

Asp Ala Glu His Lys

1 5

<210> 3

<211> 615

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 3

Met Lys Trp Val Thr Leu Ile Ser Phe Ile Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Thr Ser Arg Asn Leu Gln Arg Phe Ala Arg Asp Ala Glu His Lys Ser

20 25 30

Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Lys Glu Glu Thr Phe Lys Ala

# ES 2 651 192 B2

| 35  |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Val | Ala | Met | Ile | Thr | Phe | Ala | Gln | Tyr | Leu | Gln | Arg | Cys | Ser | Tyr | Glu |  |  |
| 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |
| Gly | Leu | Ser | Lys | Leu | Val | Lys | Asp | Val | Val | Asp | Leu | Ala | Gln | Lys | Cys |  |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |
| Val | Ala | Asn | Glu | Asp | Ala | Pro | Glu | Cys | Ser | Lys | Pro | Leu | Pro | Ser | Ile |  |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |
| Ile | Leu | Asp | Glu | Ile | Cys | Gln | Val | Glu | Lys | Leu | Arg | Asp | Ser | Tyr | Gly |  |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |
| Ala | Met | Ala | Asp | Cys | Cys | Ser | Lys | Ala | Asp | Pro | Glu | Arg | Asn | Glu | Cys |  |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |
| Phe | Leu | Ser | Phe | Lys | Val | Ser | Gln | Pro | Asp | Phe | Val | Gln | Pro | Tyr | Gln |  |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |
| Arg | Pro | Ala | Ser | Asp | Val | Ile | Cys | Gln | Glu | Tyr | Gln | Asp | Asn | Arg | Val |  |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |
| Ser | Phe | Leu | Gly | His | Phe | Ile | Tyr | Ser | Val | Ala | Arg | Arg | His | Pro | Phe |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |
| Leu | Tyr | Ala | Pro | Ala | Ile | Leu | Ser | Phe | Ala | Val | Asp | Phe | Glu | His | Ala |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |
| Leu | Gln | Ser | Cys | Cys | Lys | Glu | Ser | Asp | Val | Gly | Ala | Cys | Leu | Asp | Thr |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |
| Lys | Glu | Ile | Val | Met | Arg | Glu | Lys | Ala | Lys | Gly | Val | Ser | Val | Lys | Gln |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |
| Gln | Tyr | Phe | Cys | Gly | Ile | Leu | Lys | Gln | Phe | Gly | Asp | Arg | Val | Phe | Gln |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |
| Ala | Arg | Gln | Leu | Ile | Tyr | Leu | Ser | Gln | Lys | Tyr | Pro | Lys | Ala | Pro | Phe |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |
| Ser | Glu | Val | Ser | Lys | Phe | Val | His | Asp | Ser | Ile | Gly | Val | His | Lys | Glu |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |
| Cys | Cys | Glu | Gly | Asp | Met | Val | Glu | Cys | Met | Asp | Asp | Met | Ala | Arg | Met |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |
| Met | Ser | Asn | Leu | Cys | Ser | Gln | Gln | Asp | Val | Phe | Ser | Gly | Lys | Ile | Lys |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |
| Asp | Cys | Cys | Glu | Lys | Pro | Ile | Val | Glu | Arg | Ser | Gln | Cys | Ile | Met | Glu |  |  |

# ES 2 651 192 B2

|                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 305                |                    | 310                |                    | 315                |                    | 320                |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |
| Ala                | Glu                | Phe                | Asp                | Glu <sub>325</sub> | Lys                | Pro                | Ala                | Asp                | Leu <sub>330</sub> | Pro                | Ser                | Leu                | Val                | Glu <sub>335</sub> | Lys                |
| Tyr                | Ile                | Glu                | Asp <sub>340</sub> | Lys                | Glu                | Val                | Cys                | Lys <sub>345</sub> | Ser                | Phe                | Glu                | Ala                | Gly <sub>350</sub> | His                | Asp                |
| Ala                | Phe                | Met <sub>355</sub> | Ala                | Glu                | Phe                | Val                | Tyr <sub>360</sub> | Glu                | Tyr                | Ser                | Arg                | Arg <sub>365</sub> | His                | Pro                | Glu                |
| Phe                | Ser <sub>370</sub> | Ile                | Gln                | Leu                | Ile                | Met <sub>375</sub> | Arg                | Ile                | Ala                | Lys                | Gly <sub>380</sub> | Tyr                | Glu                | Ser                | Leu                |
| Leu <sub>385</sub> | Glu                | Lys                | Cys                | Cys                | Lys <sub>390</sub> | Thr                | Asp                | Asn                | Pro                | Ala <sub>395</sub> | Glu                | Cys                | Tyr                | Ala                | Asn <sub>400</sub> |
| Ala                | Gln                | Glu                | Gln                | Leu <sub>405</sub> | Asn                | Gln                | His                | Ile                | Lys <sub>410</sub> | Glu                | Thr                | Gln                | Asp                | Val <sub>415</sub> | Val                |
| Lys                | Thr                | Asn                | Cys <sub>420</sub> | Asp                | Leu                | Leu                | His                | Asp <sub>425</sub> | His                | Gly                | Glu                | Ala                | Asp <sub>430</sub> | Phe                | Leu                |
| Lys                | Ser                | Ile <sub>435</sub> | Leu                | Ile                | Arg                | Tyr                | Thr <sub>440</sub> | Lys                | Lys                | Met                | Pro                | Gln <sub>445</sub> | Val                | Pro                | Thr                |
| Asp                | Leu <sub>450</sub> | Leu                | Leu                | Glu                | Thr                | Gly <sub>455</sub> | Lys                | Lys                | Met                | Thr                | Thr <sub>460</sub> | Ile                | Gly                | Thr                | Lys                |
| Cys <sub>465</sub> | Cys                | Gln                | Leu                | Gly                | Glu <sub>470</sub> | Asp                | Arg                | Arg                | Met                | Ala <sub>475</sub> | Cys                | Ser                | Glu                | Gly                | Tyr <sub>480</sub> |
| Leu                | Ser                | Ile                | Val                | Ile <sub>485</sub> | His                | Asp                | Thr                | Cys                | Arg <sub>490</sub> | Lys                | Gln                | Glu                | Thr                | Thr <sub>495</sub> | Pro                |
| Ile                | Asn                | Asp                | Asn <sub>500</sub> | Val                | Ser                | Gln                | Cys                | Cys <sub>505</sub> | Ser                | Gln                | Leu                | Tyr                | Ala <sub>510</sub> | Asn                | Arg                |
| Arg                | Pro                | Cys <sub>515</sub> | Phe                | Thr                | Ala                | Met                | Gly <sub>520</sub> | Val                | Asp                | Thr                | Lys                | Tyr <sub>525</sub> | Val                | Pro                | Pro                |
| Pro                | Phe <sub>530</sub> | Asn                | Pro                | Asp                | Met                | Phe <sub>535</sub> | Ser                | Phe                | Asp                | Glu                | Lys <sub>540</sub> | Leu                | Cys                | Ser                | Ala                |
| Pro <sub>545</sub> | Ala                | Glu                | Glu                | Arg                | Glu <sub>550</sub> | Val                | Gly                | Gln                | Met                | Lys <sub>555</sub> | Leu                | Leu                | Ile                | Asn                | Leu <sub>560</sub> |
| Ile                | Lys                | Arg                | Lys                | Pro <sub>565</sub> | Gln                | Met                | Thr                | Glu                | Glu <sub>570</sub> | Gln                | Ile                | Lys                | Thr                | Ile <sub>575</sub> | Ala                |
| Asp                | Gly                | Phe                | Thr                | Ala                | Met                | Val                | Asp                | Lys                | Cys                | Cys                | Lys                | Gln                | Ser                | Asp                | Ile                |

# ES 2 651 192 B2

| 580                       |     |     |     |     |     |     |     | 585 |     |     |     | 590 |     |     |     |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn                       | Thr | Cys | Phe | Gly | Glu | Glu | Gly | Ala | Asn | Leu | Ile | Val | Gln | Ser | Arg |
|                           |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Ala                       | Thr | Leu | Gly | Ile | Gly | Ala |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 610                       |     |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <210> 4                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> 615                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212> PRT                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213> Meleagris gallopavo |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400> 4                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Met                       | Lys | Trp | Val | Thr | Leu | Ile | Ser | Phe | Ile | Phe | Leu | Phe | Ser | Ser | Ala |
| 1                         |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Thr                       | Ser | Arg | Asn | Leu | Gln | Arg | Val | Ala | Arg | Asp | Ala | Glu | His | Lys | Ser |
|                           |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Glu                       | Ile | Ala | His | Arg | Tyr | Asn | Asp | Leu | Lys | Glu | Glu | Thr | Phe | Lys | Ala |
|                           |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Val                       | Ala | Met | Ile | Thr | Phe | Ala | Gln | Tyr | Leu | Gln | Arg | Cys | Ser | Tyr | Asp |
|                           | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Gly                       | Leu | Ser | Lys | Leu | Val | Lys | Asp | Val | Val | Asp | Leu | Ala | Gln | Lys | Cys |
| 65                        |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Val                       | Ala | Asn | Glu | Asp | Ala | Pro | Glu | Cys | Ser | Lys | Ser | Leu | Pro | Ser | Ile |
|                           |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ile                       | Leu | Asp | Glu | Ile | Cys | Gln | Val | Glu | Lys | Leu | Arg | Asp | Ser | Tyr | Gly |
|                           |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ala                       | Met | Ala | Asp | Cys | Cys | Ser | Lys | Ala | Asp | Pro | Glu | Arg | Asn | Glu | Cys |
|                           |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Phe                       | Leu | Ser | Phe | Lys | Val | Ser | Gln | Pro | Asp | Phe | Ile | Gln | Pro | Tyr | Gln |
|                           | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Arg                       | Pro | Ala | Ser | Asp | Val | Ile | Cys | Lys | Glu | Tyr | Gln | Asp | Asn | Arg | Val |
| 145                       |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ser                       | Leu | Leu | Gly | His | Phe | Ile | Tyr | Ser | Val | Ala | Arg | Arg | Asn | Pro | Tyr |
|                           |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Met                       | Tyr | Ala | Pro | Thr | Ile | Leu | Ser | Phe | Ala | Ala | Asp | Tyr | Glu | His | Ala |
|                           |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Leu                       | Gln | Ser | Cys | Cys | Gln | Glu | Ser | Asp | Val | Gly | Ala | Cys | Leu | Asp | Ala |
|                           |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |

# ES 2 651 192 B2

Lys Glu Thr Ala Met Arg Glu Lys Ala Lys Lys Ile Ser Val Lys Gln  
 210 215 220  
 Gln Tyr Ser Cys Gly Ile Leu Lys Lys Phe Gly Asp Arg Val Phe Gln  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Lys Leu Val Arg Leu Ser Gln Lys Tyr Pro Lys Ala Pro Phe  
 245 250 255  
 Ser Glu Val Ala Lys Leu Val Arg Glu Ser Lys Asp Val His Lys Glu  
 260 265 270  
 Cys Cys Glu Gly Asp Met Val Glu Cys Met Asp Asp Met Ala Glu Ile  
 275 280 285  
 Ile Asn Asn Met Cys Ser Lys Gln Asp Val Phe Ser Ser Lys Ile Lys  
 290 295 300  
 Gly Cys Cys Glu Lys Pro Ile Met Glu Arg Ser Gln Cys Ile Met Glu  
 305 310 315 320  
 Ala Glu Phe Asp Glu Lys Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Val Glu Lys  
 325 330 335  
 Tyr Ile Gln Asp Lys Glu Val Cys Lys Ser Phe Glu Ala Gly His Asp  
 340 345 350  
 Ala Phe Met Ser Glu Phe Val Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Glu  
 355 360 365  
 Phe Ser Thr Gln Leu Ile Leu Arg Ile Ala Lys Gly Tyr Glu Ser Leu  
 370 375 380  
 Leu Glu Lys Cys Cys Lys Thr Asp Asn Pro Ala Glu Cys Tyr Ala Asn  
 385 390 395 400  
 Ala Gln Asp Gln Leu Asn Gln His Ile Lys Glu Thr Gln Asp Val Val  
 405 410 415  
 Lys Thr Asn Cys Asp Leu Leu Ser Ala His Gly Glu Pro Asp Phe Leu  
 420 425 430  
 Lys Ser Ile Leu Ile Arg Tyr Thr Lys Lys Met Pro Gln Val Ser Thr  
 435 440 445  
 Glu Thr Leu Leu Glu Ile Gly Lys Lys Met Thr Ala Ile Gly Thr Lys  
 450 455 460  
 Cys Cys Gln Leu Ser Glu Asp Arg Arg Met Ala Cys Ser Glu Gly Tyr  
 465 470 475 480

ES 2 651 192 B2

Leu Ser Ile Val Ile His Asp Met Cys Arg Arg Gln Glu Thr Thr Pro  
485 490 495

Ile Asn Asp Asn Val Ser His Cys Cys Ser Asp Ser Tyr Ala His Arg  
500 505 510

Arg Pro Cys Phe Thr Ala Met Gly Val Asp Thr Lys Tyr Val Pro Pro  
515 520 525

Pro Phe Asn Pro Asp Met Phe Ser Phe Asp Glu Lys Leu Cys Ser Ala  
530 535 540

Pro Ala Glu Glu Arg Glu Val Gly Gln Met Lys Leu Leu Ile Asn Leu  
545 550 555 560

Ile Lys Arg Lys Pro Gln Met Thr Glu Glu Gln Ile Lys Thr Ile Ala  
565 570 575

Asp Gly Phe Thr Ala Met Val Asp Lys Cys Cys Lys Gln Ser Asp Ile  
580 585 590

Asn Thr Cys Phe Gly Glu Glu Gly Ser Asn Val Val Ile Ile Pro Gly  
595 600 605

Ser Ala Gln Asp Thr Trp Arg  
610 615

|       |                     |
|-------|---------------------|
| <210> | 5                   |
| <211> | 4                   |
| <212> | PRT                 |
| <213> | Artificial Sequence |

```
<220>
<223>  Región catalítica N-terminal de la albúmina humana
<400>  5
```

Asp Ala His Lys  
1

|       |                     |
|-------|---------------------|
| <210> | 6                   |
| <211> | 4                   |
| <212> | PRT                 |
| <213> | Artificial Sequence |

```
<220>
<223>  Región catalítica N-terminal de la albúmina de conejo
<400>  6
```

Glu Ala His Lys  
1

|                       |   |
|-----------------------|---|
| $\langle 210 \rangle$ | 7 |
| $\langle 211 \rangle$ | 4 |

<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Región catalítica N-terminal de la albúmina de oveja  
<400> 7

Asp Thr His Lys  
1

<210> 8  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Región catalítica N-terminal de la albúmina bovina  
<400> 8

Asp Thr His Lys  
1

<210> 9  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Región catalítica N-terminal de la Albúmina de cerdos  
<400> 9

Asp Thr Tyr Lys  
1

<210> 10  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Región catalítica N-terminal de la Albúmina canina  
<400> 10

Glu Ala Tyr Lys  
1

<210> 11  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Región catalítica N-terminal de la Albúmina de rata  
<400> 11

Glu Ala His Lys  
1

## ES 2 651 192 B2

<210> 12  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Región catalítica N-terminal de la Albúmina de cobra

<400> 12

Thr Ser Ser Thr Gly  
 1 5

<210> 13  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Región catalítica N-terminal de la Albúmina de lamprea

<400> 13

Glu Asp Glu Ser Phe  
 1 5

<210> 14  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Región N-terminal de la Albúmina de pollo

<400> 14

Met Lys Trp Val Thr Leu Ile Ser Phe Ile Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
 1 5 10 15

Thr Ser Arg Asn Leu Gln Arg Phe Ala Arg Asp Ala Glu His Lys Ser  
 20 25 30

<210> 15  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Región N-terminal de la Albúmina de pavo

<400> 15

Met Lys Trp Val Thr Leu Ile Ser Phe Ile Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
 1 5 10 15

Thr Ser Arg Asn Leu Gln Arg Val Ala Arg Asp Ala Glu His Lys Ser  
 20 25 30

Glu Ile Ala  
 35

## ES 2 651 192 B2

<210> 16  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Región N-terminal de la Albúmina humana

<400> 16

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
 1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val  
 20 25 30

<210> 17  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Región N-terminal de la Albúmina de conejo

<400> 17

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
 1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala  
 20 25 30

His Arg

<210> 18  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Región N-terminal de la Albúmina canina

<400> 18

Glu Ala Tyr Lys Ser Glu Ile Ala His Arg  
 1 5 10

<210> 19  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Región N-terminal de la Albúmina de rata

<400> 19

Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala  
 1 5 10 15

## ES 2 651 192 B2

Phe Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala  
                   20                                  25                                  30

His Arg

<210> 20  
 <211> 98  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Región N-terminal de la Albúmina de pollo

<400> 20  
 atgaagtggg taacattaat ttcattcatt ttcctcttca gttcagcaac atccaggaat 60  
 ctgcaaagat ttgctcgtga tgcagagcac aagagtga 98

<210> 21  
 <211> 96  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Región N-terminal de la Albúmina de pavo

<400> 21  
 atgaagtggg taacattaat ttcattcatt ttcctcttca gttcagcaac atccaggaat 60  
 ctgcaaagag ttgctcgtga cgagagcac aagaga 96

<210> 22  
 <211> 1892  
 <212> DNA  
 <213> Gallus gallus

<400> 22  
 ctgcagccat gaagtgggta acattaattt cattcatttt cctcttcagt tcagcaacat 60  
 ccaggaatct gcaaagattt gctcgtgatg cagagcacia gaggtaaatt gcccatcgct 120  
 acaatgattt gaaagaagaa acatttaagg cagttgccat gatcacattt gccagtatc 180  
 tccagaggtg ctcttatgaa ggactgtcta agcttgtgaa ggatgttggt gatctggcac 240  
 aaaaatgtgt agccaatgaa gatgctcctg aatgctcaaa accactgcct tccattatcc 300  
 tggatgaaat ctgccaaagt gaaaagctcc gtgactctta tgggtgcaatg gccgactgct 360  
 gtagcaaagc tgatcctgaa agaaatgagt gtttcctgtc atttaaagtt tcccaaccag 420  
 acttcgttca gccataccaa agaccagctt ctgatgtgat atgccaggaa taccaggaca 480  
 acagagtgtc atttctggga catttcatct attctgttgc aagaagacac cccttcttgt 540  
 atgcccctgc aatccttagt tttgctgttg attttgaaca tgcacttcaa agctgttgca 600  
 aagagagtga tgtcgggtgct tgcctggaca ccaaggaaat tggttatgaga gaaaaagcca 660  
 agggagtaag tgtgaagcag cagtattttt gtggaatctt gaagcagttc ggagatagag 720  
 ttttccaagc acgacaactt atttacctaa gccaaaaata cccaaggct ccattctcag 780

# ES 2 651 192 B2

```

aggtttctaa atttgtacat gattctatcg gcgtccacaa agagtgtgt gaaggggaca      840
tggtggagtg catggatgac atggcacgta tgatgagcaa tctgtgctct caacaagatg      900
ttttctcagg taaaatcaaa gactgctgtg agaagcctat tgtggaacga agccagtgca      960
ttatggaggc agaatttgat gagaaacctg cagatctgcc ttcattagtt gaaaagtaca     1020
tagaagataa ggaagtgtgt aaaagttttg aagcaggcca cgatgcattc atggcagagt     1080
tcgtttatga atactcacga agacaccctg agttctccat acagcttatt atgagaattg     1140
ccaaaggata tgaatcactt ctggaaaagt gctgcaaaac tgataaccct gctgagtgt      1200
acgcaaattgc tcaagagcaa ctgaaccaac atatcaaaga aactcaggat gttgtgaaga     1260
caaactgtga tcttctccat gaccatggcg aggagactt cctcaagtcc atcctgatcc     1320
gctacactaa gaaaatgcct caagtaccaa ctgatctcct gcttgaaact ggaaagaaaa     1380
tgacaactat tggactaag tgctgccagc ttggtgaaga cagacgcatg gcttgttctg     1440
agggttatct gagcattgtg attcatgata cgtgcaggaa acaggagacc acacctataa     1500
atgacaacgt ttcacaatgc tgcagtcagc tctatgctaa cagaagacca tgtttctactg     1560
ctatgggagt agataccaaa tatgttcttc caccatttaa tcctgatatg ttcagctttg     1620
atgaaaaatt gtgcagtgtc cctgctgaag aacgagaagt aggccagatg aaattgctaa     1680
tcaacctcat taaacgcaag cccagatga cagaagaaca aataaagaca attgctgatg     1740
gtttcactgc catggttgac aagtgtgca agcagtcgga catcaatata tgctttggag     1800
aagaggggtg caacctaata gtccaaagca gagccacatt aggaattggg gcttaagaca     1860
cggttgccag tgagaaaaat acaaagataa aa                                  1892

```

```

<210> 23
<211> 1899
<212> DNA
<213> Meleagris gallopavo

```

```

<400> 23
caatcgtcct agcatttttg aataatttag cctacatcat aatctgcagc catgaagtgg      60
gtaacattaa tttcattcat tttcctcttc agttcagcaa catccaggaa tctgcaaaga     120
gttgctcgtg acgcagagca caagagtga aattgccatc gctacaatga tttgaaggaa     180
gagacattta aggcagttgc catgatcaca tttgccagc atctccagag gtgttcttat     240
gatggactgt ctaagcttgt gaaggatgtt gttgatctgg cacaaaaatg tgtggccaat     300
gaagatgctc ctgaatgctc aaaatcactg ccttccatta tccttgatga aatctgccaa     360
gtggaaaagc tccgtgactc atatggcgca atggctgact gctgtagcaa agctgatcct     420
gaaagaaatg agtgtttcct gtcatttaaa gtttcccaac cagacttcat tcagccatac     480
caaagaccag cttctgatgt gatatgcaag gaataccagg acaacagagt gtcattactg     540
ggacatttca tctattctgt tgcaagaaga aacccttaca tgtatgcccc tacaatcctt     600
agttttgctg ctgattatga acatgcactt caaagctgtt gccaaagagag tgatgttggt     660
gcttgccctg atgccaagga aactgccatg agagaaaaag ccaagaaaat aagtgtgaag     720

```

# ES 2 651 192 B2

|            |            |            |            |            |             |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| cagcaatatt | cttgtggaat | cctcaagaag | tttggagaca | gagttttcca | agcagaaaaa  | 780  |
| cttgttcgcc | taagccaaaa | ataccccaag | gctccattct | cagaggttgc | taaacttgta  | 840  |
| cgtgagagta | aggatgtcca | caaagagtgc | tgtgaagggg | acatggtgga | gtgcatggat  | 900  |
| gacatggcag | agatcattaa | caatatgtgc | tctaaacaag | atgttttctc | aagtaaaatc  | 960  |
| aaaggctgct | gtgagaagcc | tattatggaa | cgaagccagt | gtattatgga | ggcagaattt  | 1020 |
| gatgagaaac | ctgcagatct | tccctcatta | gttgaaaaat | acatacaaga | taaggaagtg  | 1080 |
| tgtaaaagtt | ttgaagcagg | ccatgatgcg | ttcatgtcag | aatttgttta | tgaataactca | 1140 |
| cgaagacacc | ctgagttctc | cacgcagctg | attctgagaa | ttgccaaagg | atatgaatca  | 1200 |
| ctcctggaaa | agtgtgcaa  | aactgataac | cctgctgagt | gctacgcaaa | tgctcaagat  | 1260 |
| caactgaacc | aacatatcaa | agaaacgcag | gatgttgtga | agacaaactg | tgatcttctc  | 1320 |
| agtgcccatg | gcgagccaga | cttcctcaag | tccatcctga | tccgctacac | gaagaaaatg  | 1380 |
| cctcaagtat | ccactgaaac | cttgcttgaa | attggaaaga | aaatgacagc | tattggtact  | 1440 |
| aagtgtgcc  | agctttctga | agacagacgc | atggcttggt | ctgagggtta | tctgagcatt  | 1500 |
| gtgattcatg | atatgtgcag | gagacaggag | accacaccta | taaatgacaa | cgtttcacac  | 1560 |
| tgctgcagtg | actcctatgc | tcacaggaga | ccatgtttca | ctgccatggg | agtagatacc  | 1620 |
| aaatatgttc | ctccaccatt | taatcctgat | atgttcagct | ttgatgaaaa | attgtgcagc  | 1680 |
| gctcctgctg | aagaacgaga | agtaggccag | atgaaattgc | ttatcaacct | cattaaacgc  | 1740 |
| aagccccaga | tgacggaaga | acaaataaag | acaattgctg | atggtttcac | tgccatgggt  | 1800 |
| gacaagtgct | gcaagcagtc | agacatcaat | acatgctttg | gagaagaggg | gagcaatgtg  | 1860 |
| gtcatcatcc | ctggaagtgc | tcaagacaca | tgagatga   |            |             | 1899 |



- ②① N.º solicitud: 201630997  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.07.2016  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| A         | SOGORB M A et al. Role of albumin in the detoxication of organophosphorus and carbamate pesticides. ABSTRACTS/TOXICOLOGY LETTERS 196S (2010), S1-S36.S26-1                                                                                                                                                  | 1-25                       |
| A         | SOGORB M A et al. Serum albumins and detoxication of anti-cholinesterase agents. CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS, 20100906 ELSEVIER SCIENCE IRLAND, IR 06/09/2010 VOL: 187 No: 1-3 Pags: 325 - 329 ISSN 0009-2797 Wille Timo; Worek Franz; Thiermann Horst.Abstract, materials and methods, and discussion. | 1-25                       |
| A         | SOGORB MIGUEL A et al. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis.Toxicology Letters (Shannon) March 10, 2002 10/03/2002 VOL: 128 No: 1-3 Pags: 215-228 ISSN 0378-4274.Resumen y apartados 5.5, 6.2 y 6.4                         | 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  
11.11.2016

Examinador  
M. J. García Bueno

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K14/465** (2006.01)

**A61K38/38** (2006.01)

**A61P39/00** (2006.01)

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

C07K, A61K, A61P

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, TXTE, TXTF, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL ALL, GOOGLE ACADÉMICO, GOOGLE PATENTS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.11.2016

**Declaración**

|                                                 |                  |      |           |
|-------------------------------------------------|------------------|------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones | 1-25 | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones |      | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones | 1-25 | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones |      | <b>NO</b> |

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       | SOGORB M A et al. Role of albumin in the detoxication of organophosphorus and carbamate pesticides. ABSTRACTS/TOXICOLOGY LETTERS 196S (2010), S1-S36.S26-1                                                                                                                                                 | 2010              |
| D02       | SOGORB M A et al. Serum albumins and detoxication of anti-cholinesterase agents.CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS, 20100906 ELSEVIER SCIENCE IRLAND, IR 06/09/2010 VOL: 187 No: 1-3 Pags: 325 - 329 ISSN 0009-2797 Wille Timo; Worek Franz; Thiermann Horst.Abstract, materials and methods, and discussion. | 06.09.2010        |
| D03       | SOGORB MIGUEL A et al. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis.Toxicology Letters (Shannon) March 10, 2002 10/03/2002 VOL: 128 No: 1-3 Pags: 215-228 ISSN 0378-4274.Resumen y apartados 5.5, 6.2 y 6.4                        | 10.03.2002        |

**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 de invención consiste en una composición que comprende un péptido aislado que se corresponde con la región amino terminal de la albúmina de aves, que hidroliza compuestos organofosforados y carbamatos , y un catión divalente (reivindicaciones 1-13 y 18-25).

Dicha composición se usa para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de intoxicaciones por compuestos organofosforados y carbamatos (reivindicaciones 14-17).

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica y consiste en un estudio donde se muestra la capacidad de las albúminas de suero de mamíferos para hidrolizar carbamatos y pesticidas organofosforados (ver resumen S26-1).

El documento D02 consiste en un estudio que demuestra que las albúminas séricas son capaces de desintoxicar una variedad de OPs así como carbamatos (ver abstract, materials and methods, and discussion).

El documento D03 consiste en estudios para mejorar el conocimiento de las rutas de desintoxicación en diferentes especies y diseñar insecticidas específicos de carbamatos y piretroides (ver resumen y apartados 5.5, 6.2 y 6.4).

Ninguno de los documentos D01-D03 citados en el Informe del Estado de la Técnica, o cualquier combinación relevante de ellos revela una secuencia peptídica que corresponde en un 95-99% de identidad con la región amino terminal de la albúmina de pollo o pavo.

Por lo tanto los documentos D01-D03 son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia las reivindicaciones 1-25 son nuevas y se considera que implican actividad inventiva según los artículos 6 y 8 Ley 11/1986.