



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 365 234**

② Número de solicitud: 201030375

⑤ Int. Cl.:

C12N 9/22 (2006.01) **C07K 14/415** (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01) **C12N 15/55** (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01) **A61K 38/46** (2006.01)

A01N 65/00 (2009.01) **A61P 31/00** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **15.03.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
27.09.2011

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑦ Inventor/es: **Serra Yoldi, María Teresa;**
García Luque, Isabel y
Guevara Morato, María Ángeles

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Proteína de *Capsicum chinense* con actividad RNasa y DNasa.**

⑤ Resumen:

Proteína de *Capsicum chinense* con actividad RNasa y DNasa.

La invención se refiere a una proteína de *Capsicum chinense* la cual presenta actividad tanto DNasa como RNasa. La presente invención también se refiere a la secuencia nucleotídica que codifica para dicha proteína así como a una construcción genética que contenga la secuencia nucleotídica, a un vector que contenga la construcción genética y a una célula hospedadora que contenga el vector. Esta invención también se refiere a los usos de la proteína.

ES 2 365 234 A1

DESCRIPCIÓN

Proteína de *Capsicum chinense* con actividad RNasa y DNasa.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biotecnología. Específicamente, se refiere a una proteína procedente de *Capsicum chinense* con actividad DNasa y RNasa, a su secuencia aminoacídica, a la secuencia nucleotídica que la codifica, a una construcción genética que contenga la secuencia nucleotídica, a un vector que contenga la construcción genética, a una célula hospedadora que contenga el vector, y a los usos de la proteína.

10 **Estado de la técnica anterior**

Los ácidos nucleicos se encuentran presentes en todas las células de los organismos vivos. Esta presencia en algunos procesos industriales o desarrollos de laboratorio no es deseable, ya que puede suponer la contaminación de las muestras. En múltiples ocasiones, por tanto, es necesaria la eliminación de los ácidos nucleicos, como por ejemplo en preparaciones bioquímicas o farmacéuticas. Para llevar a cabo esta eliminación, el proceso más extendido es la digestión mediante enzimas, bien DNasas o RNasas, en función de cual sea el ácido nucleico contaminante.

Las DNasas y RNasas están presentes en todos los organismos estudiados, desde bacterias a animales. Estas enzimas degradan DNA o RNA, y esta degradación puede darse de forma específica de secuencia, como en el caso de las enzimas de restricción, o de forma inespecífica, dando lugar a fragmentos de pequeño tamaño o incluso a mononucleótidos. En la literatura existen descritas distintas proteínas con actividad RNasa o DNasa que actúan sobre diversos sustratos, dando lugar a diferentes productos de reacción. Cada una de estas proteínas presenta unos requerimientos diferentes tanto de pH como de temperatura, presencia o ausencia de iones o cofactores, etc. para ser activas. Estas enzimas, en múltiples ocasiones, presentan especificidad de sustrato, y solo son capaces de degradar bien DNA de cadena doble, bien de cadena sencilla, o bien RNA.

En la actualidad, existen multitud de situaciones en las que resulta necesaria la digestión tanto de DNA como de RNA. Hoy por hoy existen descritas al menos 3 enzimas capaces de llevar a cabo esta digestión conjunta como son la *Micrococcal nuclease* (Alexander *et al.* 1961, *Journal of Biological Chemistry*, 236(11): 3014-3019) la cual es una proteína derivada de *Staphylococcus aureus* que presenta una actividad nucleasa inespecífica, la endonucleasa de *Serratia marcescens* (Franke *et al.* 1998, *FEBS lett.*, 425(3): 517-522) la cual es una endonucleasa inespecífica que degrada DNA y RNA de cadena simple o doble, y la nucleasa S1 de *Aspergillus oryzae* que presenta actividad preferentemente frente a DNA y RNA de cadena sencilla, aunque puede producir cortes en DNA y RNA de doble hebra (Esteban *et al.* 1992, *Nucleic Acids Research*, 20(18): 4932).

Todas estas enzimas presentan como ventaja frente a las enzimas que únicamente portan actividad DNasa o RNasa, por ejemplo, que en procesos de purificación se reduce el número de manipulaciones. Debido a esto se reduce la posibilidad de contaminación del proceso y se acortan los protocolos de purificación. Por otro lado, la reducción del número de pasos del proceso implica una reducción de la cantidad de reactivos a utilizar abaratando los procesos de producción.

Cada una de estas enzimas presenta unas condiciones óptimas de actuación en cuanto a temperatura, pH, etc. Las condiciones de cada enzima serán óptimas para algunos procesos, mientras que no serán compatibles con otros procesos industriales. Por ello resulta necesario encontrar, bien una batería de enzimas que sean útiles en diversas condiciones, o bien nuevas enzimas útiles en multitud de condiciones para de esta forma poder optimizar los procesos industriales y aumentar su rentabilidad.

Para la investigación de estas enzimas se realizan búsquedas en diversos organismos, como pueden ser por ejemplo bacterias u hongos. Una alternativa podría ser la búsqueda de este tipo de enzimas en organismos más complejos, como por ejemplo las plantas.

En plantas se ha descrito la existencia tanto de ribonucleasas (RNasas), como de deoxi-ribonucleasas (DNasas) las cuales se expresan bien de forma constitutiva o bien, por ejemplo, mediante la inducción en ciertas situaciones de estrés medioambiental o en la defensa vegetal frente a patógenos (Yen *et al.*, 1991. *Plant Physiol* 97:1487-1493; Green, 1994. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45:421-445; Sugiyama *et al.* 2000. *Plant Mol. Bio.* 44:387-397).

En vegetales existen descritas diversas proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs). Algunas de estas proteínas tienen actividad RNasa y se inducen en la defensa de plantas frente a patógenos. Estas pueden ser por ejemplo las proteínas relacionadas con la patogénesis del grupo 10 de *Capsicum annuum* (Park *et al.*, 2004. *Plant J.* 37, 186-198; US 7192775), de *Solanum surattense* o de *Astragalus mongholicus* (Liu *et al.*, 2006. *J. Plant Physiol.* 163, 546-556; Yan *et al.*, 2008. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 93-99). La actividad RNasa ha sido también descrita para una proteína relacionada con la patogénesis del grupo 4 de trigo (Caporale *et al.*, 2004. *FEBS Letters* 575, 71- 76). En dichas proteínas, sin embargo no se ha descrito que presenten actividad DNasa.

65 Existe por tanto la necesidad de encontrar enzimas que presenten actividad tanto DNasa como RNasa y que puedan servir de alternativa a las actuales, ya que de esta forma se podrá optimizar cada proceso utilizando la enzima más adecuada a las condiciones en que se realice.

Descripción de la invención

La presente invención refiere a un polipéptido aislado de *Capsicum chinense* con actividad DNasa y RNasa, así como a un polinucleótido que codifica para dicho polipéptido, a una construcción genética que contenga dicho polinucleótido, a un vector que pueda contener dicho polinucleótido o construcción genética, y a una célula hospedadora que pueda contener dicho polinucleótido, construcción genética o vector. La invención también se refiere a los usos del polipéptido.

En la presente invención se demuestra cómo una proteína obtenida de *Capsicum chinense* y de secuencia SEQ ID NO: 1 presenta actividad DNasa y RNasa. Esta presencia de ambas actividades en una única molécula convierte a esta proteína en un elemento de interés para la purificación de muestras tanto a nivel de laboratorio como a nivel industrial. Esta proteína presenta como ventajas su elevada termoestabilidad, la cual se deriva del hecho de que al ser autoclavada o hervida no pierde su actividad RNasa. Por otro lado esta proteína también presenta como ventaja la no necesidad de la adición de cofactores para llevar a cabo su actividad.

De igual forma que ocurre con muchas de las proteínas descritas, como por ejemplo entre proteínas homólogas en diferentes organismos, el polipéptido de *Capsicum chinense* podría tener alterado algún residuo aminoacídico sin que se produjera una alteración sustancial en la proteína. Esto significa que esta alteración no sería determinante en el polipéptido ni para su estructura ni para su actividad. Por todo ello un primer aspecto de la invención se refiere a un polipéptido aislado (polipéptido de la invención) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 87%, preferiblemente un 90%, más preferiblemente un 95% y aun más preferiblemente un 98% de identidad sobre la longitud completa de la secuencia SEQ ID NO: 1. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

Esta secuencia aminoacídica se ha demostrado en la presente invención que presenta actividad tanto DNasa como RNasa, por lo que una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a un polipéptido aislado y purificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 87%, preferiblemente un 90%, más preferiblemente un 95% y aun más preferiblemente un 98% de identidad sobre la longitud completa de la secuencia SEQ ID NO: 1 que presenta actividad DNasa y RNasa. Otra realización preferida se refiere al polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, que presenta actividad DNasa y RNasa.

El polipéptido de la invención puede presentar variantes. Estas variantes se refieren a variaciones limitadas en la secuencia aminoacídica, que permiten el mantenimiento de la funcionalidad del péptido. Esto quiere decir que la secuencia de referencia y la secuencia de la variante son similares en conjunto, e idénticas en muchas regiones. Estas variaciones se generan por sustituciones, deleciones o adiciones. Dichas sustituciones se dan entre aminoácidos que presentan similares características como por ejemplo en cuanto a polaridad, tamaño o carga, e incluyen, aunque sin limitarse, sustituciones entre ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp), entre Lisina (Lys) y Arginina (Arg), entre asparagina (Asn) y glutamina (Gln), entre serina (Ser) y treonina (Thr), y entre los aminoácidos que componen el grupo alanina (Ala), leucina (Leu), valina (Val) e isoleucina (Ile). Las variaciones pueden ser variaciones existentes en la naturaleza como por ejemplo variaciones alélicas, o generadas artificialmente como por ejemplo mediante mutagénesis o síntesis directa. Estas variaciones no provocan modificaciones esenciales en las características o propiedades esenciales del polipéptido, por lo que dichas variantes mantienen su actividad biológica.

Todos estos péptidos pueden ser péptidos presentes en la naturaleza o bien ser producidos de forma artificial como por ejemplo, aunque sin limitarse, de forma recombinante, de forma sintética, o mediante la combinación de estos 2 métodos.

Los péptidos adicionalmente pueden encontrarse en forma madura o bien formando parte de una proteína mayor como un precursor o una proteína de fusión. Los péptidos adicionalmente pueden incluir secuencias secretoras, secuencias que permitan su purificación como colas de histidinas, prosequencias o secuencias que aumenten su estabilidad durante la producción de la proteína. También pueden incluir secuencias aminoacídicas o lipídicas adicionales que puedan aumentar la inmunogenicidad de la molécula.

Los términos “péptido”, “polipéptido”, “proteína” o “secuencia aminoacídica” se usan de forma intercambiable en la presente invención, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.* 1984, *Nucleic Acids Research* 12: 287 Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, WI); BLAST o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.* 1999, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410). Adicionalmente, el algoritmo de Smith Waterman debe usarse para determinar el grado de identidad de dos secuencias.

El término “aislado”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a nucleótidos o péptidos que: 1) se encuentran sustancialmente libres de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con él en la naturaleza,

o 2) si se encuentran en su medio natural, han sido sintéticamente (no naturalmente) alterados por la intervención humana y/o introducidos en una célula que no los posee de forma nativa. Por ejemplo, un nucleótido natural se convierte en “aislado” si se ha alterado, o si proviene de un ADN que ha sido alterado por medio de la intervención humana (por medio de, por ejemplo pero sin limitarnos, mutagénesis dirigida, inserciones, deleciones, etc.). De la misma manera, un nucleótido natural se convierte en “aislado” si se introduce por medios no naturales en un genoma no nativo a dicho nucleótido (transfección). Por tanto, el término “aislado” en este último caso, es equivalente al término “heterólogo”.

El polipéptido de la invención es codificado por, al menos un polinucleótido que da como resultado la proteína de *Capsicum chinense* con actividad DNasa y RNasa. Un ejemplo de polinucleótido que codifica para el péptido de la invención es por ejemplo, aunque sin limitarse, el polinucleótido de secuencia SEQ ID NO: 2. 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 todo ello otro aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido aislado (polinucleótido de la invención) que codifica para el polipéptido de la invención, o a una secuencia nucleotídica complementaria a dicho polinucleótido aislado. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica para el péptido de la invención que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 75%, preferiblemente un 85%, más preferiblemente un 90%, aun más preferiblemente un 95% y aun más preferiblemente un 98% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia nucleotídica complementaria a dicho polinucleótido aislado. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 o una secuencia nucleotídica complementaria a dicho polinucleótido aislado.

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.

Cualquiera de los polinucleótidos de la invención pueden encontrarse en la naturaleza y obtenerse por aislamiento mediante métodos conocidos en el estado de la técnica, u obtenerse de manera artificial mediante métodos de clonación y selección convencional, o mediante secuenciación.

Los polinucleótidos, adicionalmente a la secuencia codificante, pueden llevar otros elementos como por ejemplo aunque sin limitarse, intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5' o 3', sitios de unión a ribosomas, o secuencias estabilizadoras. Estos polinucleótidos adicionalmente también 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.

El polinucleótido de la invención, para dar lugar al péptido de la invención puede encontrarse incluido en construcciones génicas. Por ello otro aspecto de la presente invención se refiere a una construcción genética (construcción genética de la invención) que comprende el polinucleótido de la invención. Esta construcción genética puede llevar incluidas secuencias de control unidas operativamente al polinucleótido de la invención.

El término “secuencia de control”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a secuencias nucleotídicas que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias a las que están ligadas. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa. Ejemplos de secuencias de control, son por ejemplo, pero sin limitarse, promotores, señales de inicio de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, señales de poliadenilación o activadores transcripcionales.

La expresión “unidos operativamente”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a un polinucleótido, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región del ADN, generalmente “aguas arriba” o “upstream” del 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 o de tejido o promotores inducibles o reprimibles. Las secuencias de control dependen del origen de la célula en la que se quiere expresar el ácido nucleico. Ejemplos de promotores procariontes incluyen, por ejemplo, pero sin limitarnos, los promotores de los genes *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacI*, *tet*, *gal*, *trc*, o *tac* de *E. coli*, o el promotor del gen *α -amilasa* de *B. subtilis*. Para la expresión de un ácido nucleico en una célula procarionte también es necesaria la presencia de un sitio de unión ribosomal situado “upstream” de la secuencia codificante. Secuencias de control apropiadas para la expresión de un polinucleótido en células eucariotas son conocidas en el estado de la técnica.

ES 2 365 234 A1

Tanto el polinucleótido de la invención como la construcción genética de la invención que comprende el polinucleótido, pueden introducirse, por ejemplo, en un vector de clonación o un vector de expresión para permitir su replicación o su expresión. Preferiblemente, dicho vector es un vector apropiado para la expresión y purificación del péptido de la invención. Por todo ello, otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector (vector de la invención) que comprende el polinucleótido de la invención, o la construcción genética de la invención.

El término “vector de clonación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. Ejemplos de vectores de expresión son, pero sin limitarse, plásmidos, cósmidos, fagos de ADN o cromosomas artificiales de levadura.

El término “vector de expresión”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un vector de clonación adecuado para expresar un ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo tras ser introducido en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico se encuentra, generalmente, unido operativamente a secuencias control.

El término “expresión” se refiere al proceso por el cual se sintetiza un polipéptido a partir de un polinucleótido. Incluye la transcripción del polinucleótido en un ARN mensajero (ARNm) y la traducción de dicho ARNm en una proteína o polipéptido. La expresión puede tener lugar en una célula hospedadora, pero también mediante cualquier proceso de expresión proteica *in vivo*.

El polinucleótido de la invención así como la construcción genética de la invención o el vector de la invención, pueden introducirse en una célula hospedadora para su amplificación o expresión. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende el polinucleótido de la invención, la construcción genética de la invención o el vector de la invención. Debido al origen vegetal del polipéptido, resulta más aconsejable su expresión en células vegetales. Por ello, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende el polinucleótido de la invención, la construcción genética de la invención o el vector de la invención, donde la célula hospedadora es una célula vegetal.

El término “célula hospedadora” o “célula huésped”, tal y como se utilizan en la presente descripción se refieren a cualquier organismo procarionta o eucariota que es recipiente de un vector de expresión, de clonación o de cualquier otra molécula de ADN. Las células hospedadoras pueden ser células procariontas como, por ejemplo, pero sin limitarse, *E. coli*, o eucarióticas como por ejemplo, aunque sin limitarse células vegetales, levaduras, células de insectos, células de anfibios o células de mamífero.

Otro aspecto se refiere a una semilla, de ahora en adelante semilla de la invención, que comprende el polinucleótido de la invención, la construcción genética de la invención o el vector de la invención. Dicha semilla, por tanto, integrará en su material genético los polinucleótidos de la invención, las construcciones genéticas de la invención, o el vector de la invención.

Otro aspecto se refiere a un cultivo de células vegetales, de ahora en adelante cultivo de células vegetales de la invención, que comprenden el polinucleótido de la invención, la construcción genética de la invención o el vector de la invención.

El término “cultivo de células” en esta memoria, hace referencia a un cultivo de células aisladas del mismo o diferente tipo de tejido, o una colección de tales células organizadas en partes de una planta o en tejidos (cultivos tisulares). Tipos de cultivos de este tipo son, por ejemplo, cultivos de protoplastos, *calli* (grupo de *callus* o células vegetales indiferenciadas capaces de regenerar una planta completa) y células vegetales que están aisladas de plantas o partes de las plantas, tales como por ejemplo, pero sin limitarse, embriones, protoplastos, células meristemáticas, polen, hojas o anteras.

Otro aspecto de la invención se refiere a una planta, que comprende las células o el cultivo de células vegetales de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la planta se ha obtenido tras el crecimiento de una célula, de un grupo de células vegetales o de la semilla de la invención. Dicha planta, por tanto, integrará en su material genético los polinucleótidos de la invención, las construcciones genéticas de la invención, o el vector de la invención.

El péptido de la invención, tal y como se demuestra en los ejemplos presenta actividad tanto DNasa como RNasa. Esto convierte dicho péptido en una herramienta de elevado interés a la hora de purificar elementos de origen biológico. Esto se debe a que los ácidos nucleicos se encuentran presentes en todos los organismos vivos y, por tanto, es uno de los elementos contaminantes más comunes en muestras biológicas. Estos ácidos nucleicos no son deseables en muchos procesos industriales en el que el producto final tiene un origen biológico, como puede ser por ejemplo cuando se quieren obtener compuestos o proteínas purificadas para composiciones farmacéuticas. El uso del polipéptido de la invención permite la digestión de todos los ácidos nucleicos en un solo paso debido a la capacidad de digerir tanto RNA como DNA, tanto de cadena sencilla como de doble hebra, ayudando y simplificando los procesos de purificación. Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de la invención para la purificación de elementos de origen biológico. En una realización más preferida de este aspecto de la invención los elementos de origen biológico son proteínas.

Por otro lado, debido a que se trata de una proteína relacionada con la patogénesis en plantas, la actividad DNasa y RNasa resulta útil en la protección de dicha planta frente a diversos grupos de patógenos como pueden ser bacterias, virus, hongos o nematodos. Muchos de los virus patógenos son virus cuyo material genético es RNA de hebra sencilla. El polipéptido con actividad RNasa, por tanto, sería útil para el tratamiento frente a estos virus. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del polipéptido de la invención para la elaboración de un medicamento, o alternativamente al polipéptido de la invención para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del polipéptido de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas, o alternativamente al polipéptido de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Una realización preferida se refiere al uso del polipéptido de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas donde el agente infeccioso es un hongo, o alternativamente al polipéptido de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas donde el agente infeccioso es un hongo.

Otra realización preferida se refiere al uso del polipéptido de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas donde el agente infeccioso es un virus, o alternativamente al polipéptido de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas donde el agente infeccioso es un virus.

Otra realización preferida se refiere al uso del polipéptido de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas donde el agente infeccioso es una bacteria, o alternativamente al polipéptido de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas donde el agente infeccioso es una bacteria.

Una realización más preferida se refiere al uso del polipéptido de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas donde el agente infeccioso es un hongo y el organismo infectado es una planta, o alternativamente al polipéptido de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas donde el agente infeccioso es un hongo y el organismo infectado es una planta.

Otra realización más preferida se refiere al uso del polipéptido de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas donde el agente infeccioso es un virus y el organismo infectado es una planta o alternativamente al polipéptido de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas donde el agente infeccioso es un virus y el organismo infectado es una planta.

Otra realización más preferida se refiere al uso del polipéptido de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas donde el agente infeccioso es una bacteria y el organismo infectado es una planta o alternativamente al polipéptido de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas donde el agente infeccioso es una bacteria y el organismo infectado es una planta.

Se entiende por “enfermedad infecciosa” en la presente invención la manifestación clínica consecuyente a una infección provocada por un microorganismo como por ejemplo, aunque sin limitarse, bacterias, hongos, virus, protozoos o priones. Métodos para determinar si una enfermedad presenta un origen infeccioso o cualquier otro origen como por ejemplo metabólico, son bien conocidos y rutinarios para el experto en la materia, y son adaptados para cada caso en función de las necesidades, como pueden ser por ejemplo, aunque sin limitarse, cultivos de muestras obtenidas del individuo, o la detección inmunológica de diversos antígenos en dichas muestras.

Por “planta” en esta memoria, se entienden todos los organismos que pueden ser clasificados dentro del reino *Viridiplantae*, que incluye las algas verdes y a las plantas terrestres (*Embryophyta*).

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. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. *Análisis de la actividad RNasa de la proteína PR-4.*

Análisis de la actividad RNasa de la proteína PR-4 sobre RNA (12 μ g) de *Nicotiana benthamiana* en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1x. + PR-4: En presencia de proteína PR-4; EDTA 5 mM: en presencia de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 5 mM; EDTA 50 mM: en presencia de EDTA 50 mM; DTT: en presencia de 10 mM de DTT (ditioteitol); B: tras ser hervida; Autoc: autoclavada; RNasin: en presencia de un inhibidor de RNasas; B/DTT: tras ser hervida en presencia de DTT 100 mM; c: Control sin PR-4.

ES 2 365 234 A1

Figura 2. Análisis de la actividad DNasa de la proteína PR-4.

Análisis de la actividad DNasa de la proteína PR-4 sobre DNA (2 μ g) del plásmido pUC18 circular (circ) o linearizado con la enzima EcoR I (lin) en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1x. c. Control de tamaño (pares de bases) del DNA del fago λ digerido con la enzima Hind III; en ausencia de la proteína PR-4 (control) o en su presencia (+PR-4), conteniendo MgCl₂ 5 mM o tras ser hervida en presencia de DTT 100 mM (B/DTT).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente 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.

Ejemplo 1

Purificación de la proteína PR-4 de *Capsicum chinense*

La purificación de la proteína se realiza en varios pasos. A partir de las hojas inoculadas con el virus se obtiene un extracto crudo de las proteínas extracelulares solubles mediante infiltración al vacío en un kitasato en tampón citrato-fosfato 100 mM pH 2,8, durante varios periodos de vacío y presión atmosférica hasta que se observa que todas las hojas están infiltradas. Posteriormente, se retira el exceso de líquido de las hojas con papel de filtro y se colocan dentro de una jeringuilla de 20 cm³, que a su vez se coloca dentro de un tubo de centrifuga de 30 ml y se centrifuga a 4500 rpm durante 20 min. en una centrífuga Sorvall, donde se recupera el filtrado. Posteriormente, el extracto se dializa frente a tampón MES 20 mM a pH 6,0, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los extractos se concentran 30 veces mediante el concentrador Macrosep de centrifuga con una membrana de exclusión molecular de 3 kDa. Posteriormente, los extractos se filtran a través de un filtro de 0,2 μ m y se diluyen hasta alcanzar una concentración de 5 mg/ml con tampón MES 20 mM pH 6,0. A partir de este extracto se purifica parcialmente la proteína mediante cromatografía de intercambio catiónico HiTrap SP de 5 ml (GE Healthcare), equilibrada con el mismo tampón en un equipo de FPLC (*Fast protein liquid chromatography*; cromatografía líquida y rápida de proteínas). Las fracciones unidas se eluyen con un gradiente continuo de ClNa de 0 a 200 mM. La fracción que contiene la proteína parcialmente purificada que corresponde al segundo pico de absorbancia, se dializa frente al tampón 20 mM MES pH 6,0 y se vuelve a concentrar en un microsep de 3 kDa de exclusión molecular y se resuelve por su masa relativa (Mr) mediante FPLC en una columna Superdex 75 (GE Healthcare). La fracción correspondiente al tercer pico, con un tiempo de retención de 37 min. se purifica mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) en una columna de fase reversa C18 Spherisorb S50DS2 (Hichron). La fracción 1, correspondiente a la PR-4 se dializa frente a Tris-HCl 50 mM pH 6,8 toda la noche a 4°C y se concentra como se describe anteriormente.

Ejemplo 2

Análisis de la actividad RNasa de la proteína PR-4 de *Capsicum chinense*

La proteína PR-4 purificada según el ejemplo 1, fue utilizada para analizar su actividad DNasa y RNasa.

Para determinar la actividad RNasa se utilizó RNA total de *Nicotiana benthamiana*, el cual fue extraído mediante el método del Trizol y posteriormente purificado mediante el RNeasy-Plant Mini Kit (QIAGEN). 4 μ g de proteína fueron utilizados en mezclas de reacción que contenían 12 μ g de RNA total de *N. benthamiana*, en una mezcla de reacción de 20 μ l que contenía 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM de imidazol; 5 mM de ClNa durante 30 min. a temperatura ambiente. El RNA fue posteriormente purificado mediante columnas del kit RNeasy-Plant Mini Kit (QIAGEN) y aplicado en geles de agarosa al 1% en presencia de 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio y del tampón TAE, y visualizados por observación mediante luz UV. Los tratamientos a los que se sometió la proteína PR-4 antes de analizar su actividad RNasa fueron: autoclavado durante 20 min. a 120°C; hervida durante 15 min.; calentada a 95°C en presencia de 100 mM DTT; y las reacciones fueron llevadas a cabo en presencia de 5 y 50 mM EDTA y RNasin a 1 u/ μ l. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1.

En la figura se observa que la actividad RNasa no es inhibida por la adición de EDTA a unas concentraciones de 5 y 50 mM. Por otro lado también se observa que la actividad RNasa se sigue manteniendo tras ser hervida durante 15' o tras ser sometida a un tratamiento de 120°C durante 20' en autoclave. De las condiciones utilizadas, la única forma de destruir su actividad es calentando a 95°C durante 5 min. en presencia de DTT 100 mM. Esto indica que la proteína se mantiene activa mediante la formación de enlaces disulfuro.

Ejemplo 3

Análisis de la actividad DNasa de la proteína PR-4 de *Capsicum chinense*

Para determinar la actividad DNasa, 4 μ g de proteína PR-4, purificada como se describe en el apartado anterior, fueron incubados con 4 μ g de plásmido pUC18, linearizado con la enzima de restricción EcoR I, o circular, en mezclas de reacción de 25 μ l en presencia de 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM de imidazol, 5 mM de ClNa y 5 mM de Cl₂Mg.

ES 2 365 234 A1

También se efectuó la reacción en ausencia de Cl_2Mg , y tras ser incubada la proteína a 95°C , durante 5 min. en presencia de 100 mM DTT. Las reacciones se incubaron durante 90 min. a temperatura ambiente, tras lo cual, $10\ \mu\text{l}$ de la reacción fueron analizados en geles de agarosa al 1% en presencia de $0,5\ \mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio y del tampón TAE, y visualizados por observación mediante luz UV, como se observa en la figura 2.

5 La actividad DNasa no requiere la adición de cofactores tales como iones Mg^{2+} a 5 mM, y que son requeridos para la actividad de otras nucleasas. La actividad DNasa es activa frente a DNA circular y lineal por lo que presenta actividad tanto endo como exo-nucleasa.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 365 234 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 87% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1, sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 1.
2. Un polipéptido aislado según la reivindicación 1 donde la identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1, sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 1 es de al menos el 90%.
- 10 3. Un polipéptido aislado según la reivindicación 2 donde la identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1, sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 1 es de al menos el 95%.
4. Un polipéptido aislado según la reivindicación 3 donde la identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1, sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 1 es de al menos el 98%.
- 15 5. Un polipéptido aislado según la reivindicación 4 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
6. Un polipéptido aislado y según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el polipéptido presenta actividad DNasa y RNasa.
- 20 7. Un polinucleótido aislado que codifica para el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una secuencia nucleotídica complementaria a dicho polinucleótido aislado.
- 25 8. Un polinucleótido aislado según la reivindicación 7 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 75% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 2, o una secuencia nucleotídica complementaria a dicho polinucleótido aislado.
9. Un polinucleótido aislado según la reivindicación 8 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 85% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 2, o una secuencia nucleotídica complementaria a dicho polinucleótido aislado.
- 30 10. Un polinucleótido aislado según la reivindicación 9 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 90% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 2, o una secuencia nucleotídica complementaria a dicho polinucleótido aislado.
- 35 11. Un polinucleótido aislado según la reivindicación 10 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 95% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 2, o una secuencia nucleotídica complementaria a dicho polinucleótido aislado.
- 40 12. Un polinucleótido aislado según la reivindicación 11 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 98% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 2, o una secuencia nucleotídica complementaria a dicho polinucleótido aislado.
- 45 13. Un polinucleótido aislado según la reivindicación 12 que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2, o una secuencia nucleotídica complementaria a dicho polinucleótido aislado.
14. Una construcción genética que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13.
- 50 15. Un vector que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 o la construcción genética según la reivindicación 14.
16. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, la construcción genética según la reivindicación 14, o el vector según la reivindicación 15.
- 55 17. Una célula hospedadora según la reivindicación 16 donde la célula es una célula vegetal.
18. Semilla que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, la construcción genética según la reivindicación 14, o el vector según la reivindicación 15.
- 60 19. Cultivo de células vegetales según la reivindicación 17.
20. Planta que comprende células según la reivindicación 17.
- 65 21. Planta según la reivindicación anterior que es obtenida tras el crecimiento de una célula según la reivindicación 17, de un grupo de células según la reivindicación 19, o de la semilla según la reivindicación 18.

ES 2 365 234 A1

22. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la purificación de elementos de origen biológico.

23. Uso de un polipéptido según la reivindicación 22, donde el elemento de origen biológico es una proteína.

24. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la elaboración de un medicamento.

25. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

26. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas, donde el agente infeccioso es un hongo.

27. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas, donde el agente infeccioso es un virus.

28. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas, donde el agente infeccioso es una bacteria.

29. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28 donde el organismo infectado es una planta.

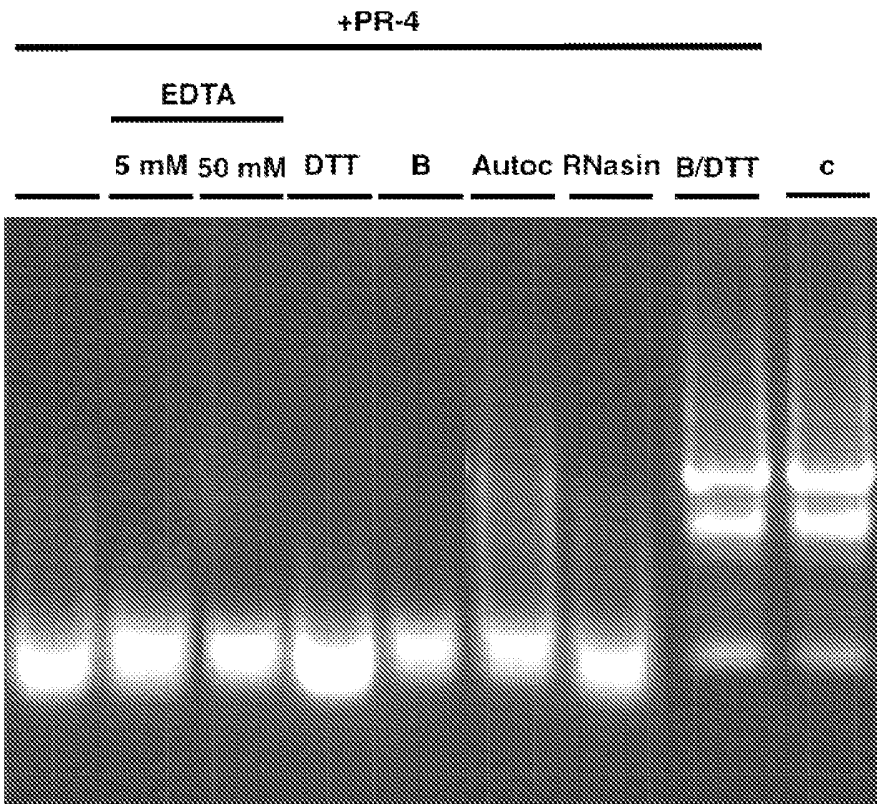


FIG. 1

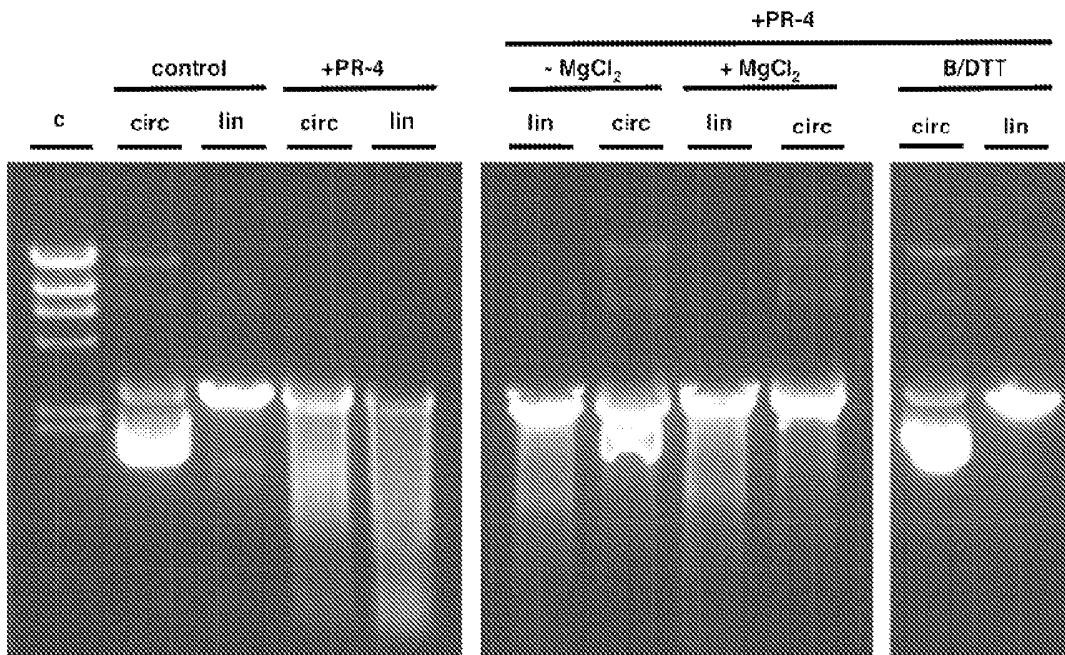


FIG. 2

ES 2 365 234 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas

5 <120> Proteína de *Capsicum chinense* con actividad RNasa y DNasa.

<130> ES1641.636

10 <160> 2

<170> PatenIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 143

<212> PRT

<213> *Capsicum chinense*

20

<400> 1

25 Met Glu Ser Val Asn Lys Leu Cys Val Ala Phe Phe Ile Ile Ser Met
1 5 10 15

30 Met Val Ala Met Ala Ala Ala Gln Ser Ala Thr Asn Val Arg Ser Thr
20 25 30

35 Tyr His Leu Tyr Asn Pro Gln Asn Ile Asn Trp Asp Leu Arg Thr Ala
35 40 45

40 Ser Ala Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Ala Asp Lys Pro Leu Glu Trp Arg
50 55 60

45 Gln Arg Tyr Gly Trp Thr Ala Phe Cys Gly Pro Ala Gly Pro Thr Gly
65 70 75 80

50 Gln Ala Ala Cys Gly Arg Cys Leu Lys Val Thr Asn Thr Gly Thr Gly
85 90 95

55 Thr Gln Ala Thr Val Arg Ile Val Asp Gln Cys Ser Asn Arg Gly Leu
100 105 110

60 Asp Leu Asp Val Asn Val Phe Asn Gln Leu Asp Thr Asp Arg Arg Gly
115 120 125

65 Tyr Gln Gln Gly His Leu Ile Val Asn Tyr Glu Phe Val Asn Cys
130 135 140

60 <210> 2

<211> 692

<212> DNA

<213> *Capsicum chinense*

65

ES 2 365 234 A1

<400> 2

	gacagaaatc ccacaagaaa ttacaattac aatatcatgg agagtgttaa caagttgtgt	60
5	gtagcatttt ttatcatcag catgatggtg gcgatggccg cggcgcagag cgctacgaac	120
	gtgaggtcaa cataccatct gtacaacccg cagaacatca actgggattt gagaactgcc	180
10	agcgcttact gcgctacttg ggatgctgac aagccgctcg agtggcgcca aaggtatggc	240
	tggactgctt tttgtggtcc tgctggacct actggccaag ctgcttgccg tagatgcttg	300
	aaggtgacaa acacaggaac aggaacacaa gcaacggtca gaatagtaga tcaatgcagc	360
15	aatcgagggc ttgatttgga tgtgaacgtg tttaaccaat tggacactga tcgacggggc	420
	taccagcagg gccaccttat agtcaactat gaatttgta actgctaata actaagctgg	480
20	tagctagctc tgcctaaaaa gtgtcatatt tatgtcatca ataataaacc acgatcgaga	540
	ttgatttcat actattatcg agattgatgt ttagaataaa agggactgag cttttaatta	600
	atagtataaa caattatatt atctggaagc tctatatgta ccttggatac tctttaaga	660
25	ttaataaaag aatgtcactt agtactaaaa aa	692
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201030375

22 Fecha de presentación de la solicitud: 15.03.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RICHINS, R. et al. "Responsive transcripts in Phytophthora capsici-challenged roots of <i>Capsicum annuum</i> ". 12.03.2004. BASE DE DATOS EMBL [en línea], [recuperado el 14.04.2011], nº de acceso CK902046. Resumen.	1-3,5,7-11,13-21
A	ELVIRA, M.I. et al. "Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in <i>Capsicum chinense</i> L3 plants". JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY. 28.03.2008. Vol. 59, nº 6, páginas 1253-1265. Todo el documento.	1-29
A	HAMADA, H. et al. "Timing and extent of hypersensitive response are critical to restrict local and systemic spread of pepper mild mottle virus in pepper containing the L3 gene". JOURNAL OF GENERAL PLANT PATHOLOGY. 2005. Vol. 71, Nº 1, PÁGINAS 90-94. Todo el documento.	1-29
A	LINTHORST, H.J.M. et al. "Tobacco and tomato PR proteins homologous to <i>win</i> and Pro-Hevein lack the "Hevein" domain". MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS. 1991. Vol. 4. Nº 6, páginas 586-592. Todo el documento.	1-29

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
27.04.2011

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N9/22 (2006.01)
C07K14/415 (2006.01)
C12N15/29 (2006.01)
C12N15/55 (2006.01)
A01H5/00 (2006.01)
A61K38/46 (2006.01)
A01N65/00 (2009.01)
A61P31/00 (2006.01)

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

C12N, C07K, A01H, A61K, A01N, 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, PAJ, BIOSIS, EMBL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.04.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4, 6, 12, 22-29	SI
	Reivindicaciones 1-3, 5, 7-11, 13-21	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 4, 6, 12, 22-29	SI
	Reivindicaciones 1-3, 5, 7-11, 13-21	NO

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

Base de la Opinión.-

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

Consideraciones:

La invención consiste en la proteína relacionada con la patogénesis PR-4, del pimiento *Capsicum chinense* de SEQ ID nº 1 y que presenta simultáneamente actividades ADNasa y ARNasa. La invención también incluye la secuencia de nucleótidos SEQ ID nº 2 que codifica para dicha proteína. La proteína de la invención, puede utilizarse en procedimientos de purificación de productos de origen biológico y también en la preparación de un medicamento para tratar enfermedades infecciosas producidas por hongos, virus o bacterias.

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	RICHINS, R. et al. "Responsive transcripts in <i>Phytophthora capsici</i> -challenged roots of <i>Capsicum annuum</i> ". 12.03.2004. BASE DE DATOS EMBL [en línea], [recuperado el 14.04.2011], nº de acceso CK902046.	
D02	ELVIRA, M.I. et al. "Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in <i>Capsicum chinense</i> L3 plants". JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY. 28.03.2008. Vol. 59, nº 6, páginas 1253-1265.	
D03	HAMADA, H. et al. "Timing and extent of hypersensitive response are critical to restrict local and systemic spread of pepper mild mottle virus in pepper containing the L3 gene". JOURNAL OF GENERAL PLANT PATHOLOGY. 2005. Vol. 71, Nº 1, Páginas 90-94.	
D04	LINTHORST, H.J.M. et al "Tobacco and tomato PR proteins homologous to <i>win</i> and Pro-Hevein lack the "Hevein" domain". MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS. 1991. Vol. 4. Nº 6, páginas 586-592.	

El documento D01, corresponde a un registro de la base de datos EMBO en el que se describe la secuencia de nucleótidos de una proteína identificada después de la infección por el hongo *Phytophthora capsici* de las raíces de la planta del pimiento *Capsicum annuum*. La proteína es similar a la PR-2 y la secuencia descrita, presenta una homología del 97%, respecto a la SEQ ID nº 2 de la presente solicitud.

El documento D02, identifica varias proteínas relacionadas con la patogénesis, identificadas en el pimiento *Capsicum chinense* después de haber sido infectado con el virus del moteado suave del pimiento. Entre las proteínas identificadas no está la proteína PR-4.

El documento D03, describe los efectos de virus del moteado suave del pimiento modificado, sobre pimientos de la especie *Capsicum chinense*. Se identifica una proteína relacionada con la patogénesis PR-4b, registrada en la base de datos GenBank/EMBO con número de acceso AB162223. La proteína, no está relacionada con la proteína PR-4 de la invención.

El documento D04, describe proteínas relacionadas con la patogénesis identificadas en tabaco infectado con virus del mosaico del tabaco y tomate infectado con *Cladosporium fulvum*. En tomate, se identifica una proteína PR-2, que presenta una homología del 86% con la proteína de la invención.

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

Las proteínas relacionadas con la patogénesis PR, sintetizadas en plantas como respuesta a agresiones externas. Varias de estas proteínas son enzimas y su actividad enzimática parece estar relacionada con la resistencia a patógenos. Las proteínas relacionadas con la patogénesis PR de distintas plantas, presentan grados de homología muy elevados.

La presente invención consiste en la proteína PR4, de SEQ ID nº 1 del pimiento *Capsicum chinense*. La invención también incluye la secuencia de nucleótidos SEQ ID nº 2, que codifica para dicha proteína. En las reivindicaciones, no se menciona el origen de dicha proteína.

La proteína PR-4 de secuencia SEQ ID nº 1, no ha sido descrita previamente en el estado de la técnica. Sin embargo, las reivindicaciones 1-13, están redactadas en unos términos tan generales que incluirían numerosas posibilidades de proteínas que no pertenecen al pimiento *Capsicum chinense*, que no han sido todavía identificadas y por tanto no forman parte de la invención.

El documento D01 describe la secuencia de una proteína PR del pimiento *Capsicum annuum* que presenta una homología del 96% con la SEQ ID nº 2 de la invención. Las reivindicaciones 1-3, 5, 7-11, 13-21, en la forma en que están redactadas, carecen de novedad y de actividad inventiva. Las reivindicaciones 1-29, en la medida en que afectan a las SEQ ID nºs 1 y 2, son nuevas y tienen actividad inventiva; cumplen por tanto los requisitos de los Art. 6 y 8 de la LP.