



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 147 539**

⑫ Número de solicitud: 009900301

⑬ Int. Cl.⁷: C12N 15/12

C07K 14/435

C12N 15/63

C12N 15/79

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **15.02.1999**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2000**

Fecha de concesión: **31.01.2001**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2001**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.04.2001

⑲ Titular/es:
BIAL INDUSTRIAL FARMACEUTICA, S.A.
Alameda de Urquijo, nº 27
48008 Bilbao, Vizcaya, ES

⑳ Inventor/es: **Palacios Peláez, Ricardo;**
Martínez Quesada, Jorge;
Martínez Garate, Alberto y
Asturias Ortega, Juan Andrés

㉑ Agente: **Ungría López, Javier**

㉒ Título: **ADN recombinante que codifica para epítomos del alérgeno tropomiosina de ácaros, cucarachas y moluscos, útil para el diagnóstico y tratamiento de alergias.**

㉓ Resumen:
ADN recombinante que codifica para epítomos del alérgeno tropomiosina de ácaros, cucarachas y moluscos, útil para el diagnóstico y tratamiento de alergias.

Las moléculas de ADN recombinante se caracterizan porque codifican para un polipéptido que tiene al menos un epítomo del alérgeno tropomiosina de animales invertebrados, tales como insectos, arácnidos y moluscos.

Las correspondientes moléculas polipeptídicas codificadas por dichas moléculas de ADN se caracterizan por contener al menos un epítomo de dichos animales invertebrados y pueden obtenerse expresando dichas moléculas de ADN en un organismo hospedador, como *Escherichia coli*.

Estas moléculas recombinantes tienen utilidad para el diagnóstico in vitro de las alergias relacionadas con el alérgeno tropomiosina y para la producción de vacunas destinadas al tratamiento convencional de este tipo de alergias.

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 147 539 B1

DESCRIPCION

ADN recombinante que codifica para epítomos del alérgeno tropomiosina de ácaros, cucarachas y moluscos, útil para el diagnóstico y tratamiento de alergias.

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra en el campo del diagnóstico y tratamiento de alergias, particularmente alergias a aeroalérgenos del ambiente doméstico y a alérgenos alimentarios. Concretamente, trata del alérgeno tropomiosina, que se haya presente en todas las células animales, y que es causante de numerosas reacciones alérgicas cruzadas entre diferentes grupos animales, como los crustáceos, moluscos, insectos, etc. En la presente invención se proporcionan moléculas de ADN recombinante que codifican para un polipéptido que tiene al menos un epitopo del alérgeno tropomiosina, de una serie de animales invertebrados. En particular los pertenecientes a los grupos de insectos (como la cucaracha americana, *Periplaneta americana*), arácnidos (como el ácaro del polvo, *Dermatophagoides pteronyssinus*), y moluscos (como el caracol terrestre, *Helix aspersa*). Todos ellos son invertebrados que tienen importancia en enfermedades alérgicas, y se encuentran ampliamente distribuidos. La inhalación de sus derivados o ingestión completa puede causar fenómenos de hipersensibilidad mediada por IgE (alergia de tipo I). Se describen también métodos de producción de estos polipéptidos recombinantes en sistemas de expresión heterólogos. También se describen eficientes métodos para la purificación de los péptidos recombinantes.

Estado de la técnica anterior a la invención

Las alergias de tipo I son un problema sanitario importante en los países industrializados. Este tipo de alergias están causadas por la formación de anticuerpos IgE contra antígenos transportados por el aire. Estos anticuerpos IgE interaccionan con los mastocitos y basófilos, liberando mediadores biológicos como histamina, produciendo rinitis alérgica, conjuntivitis y asma bronquial en un 20 % de la población [(1) Miyamoto, T. (1991). *Advances in Allergology and Clinical Immunology*. P. Godard, J. Bousquet, and F.B. Michel, eds. (New Jersey, USA: The Parthenon Publishing Group-Carnforth), pp. 343-347]. Uno de los métodos actuales para remediar las manifestaciones alérgicas es la inmunoterapia. Este método consiste básicamente en modular la respuesta inmune en el paciente mediante la administración regular y en concentraciones crecientes de las proteínas que producen la alergia (extractos alérgicos).

Los métodos de diagnóstico de las enfermedades alérgicas, tales como RIA (immuno-radiometric assay), RAST (radio-allergosorbent test), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), inmunotransferencia, ensayos de liberación de histamina entre otros, dependen de la disponibilidad de alérgenos puros. Los extractos alérgicos aislados de fuentes naturales son complejas mezclas de proteínas y otras moléculas. Su composición, y por lo tanto alergenidad, depende del material usado, el cual varía según las condiciones ambientales, en el caso de los pólenes, la fase de maduración, en el caso de los hongos, las condiciones de crecimiento de los ácaros, etc. Incluso, algunos extractos pueden contener una concentración insuficiente de alérgenos mayores, pueden estar contaminados con componentes no deseados, frente a los cuales el paciente no es alérgico, o ambos. Además, alérgenos importantes pueden perderse durante la extracción debido a proteasas, y los procesos bioquímicos de purificación de alérgenos son laboriosos y costosos. Por estas razones, se ha prestado gran atención a la tecnología del ADN recombinante como una alternativa viable para la producción de alérgenos recombinantes, facilitando así su caracterización a nivel molecular, y su uso en diagnóstico y terapia [(2) Scheiner, O. and Kraft, D. (1995). *Basic and practical aspects of recombinant allergens*. *Allergy* 50, 384-391]. Los alérgenos recombinantes pueden ser producidos a gran escala en tanques de fermentación, utilizando sistemas de expresión microbianos. Su purificación es más eficiente y barata, ya que se parte de una mayor proporción de la proteína de interés. Además, mediante estas técnicas se pueden obtener fácilmente fragmentos específicos de estas proteínas. La aplicación de las técnicas del ADN recombinante ha llevado al aislamiento de un gran número de proteínas con características alérgicas [(3) Stewart, G.A. (1995). *The molecular biology of allergens*. In *Asthma and Rhinitis*. W.W. Busse and S.T. Holgate, eds. (Boston: Blackwell Scientific Publications), pp. 898-932].

Las tropomiosinas constituyen una ubíqua familia de proteínas implicadas con la motilidad celular que están presentes en todos los vertebrados superiores, pudiendo existir hasta 20 isoformas diferentes [(4) Pittinger, M.F., Kazzaz, J.A., and Helfman, D.M. (1994). *Functional properties of non-muscle tropomyosin isoforms*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 3253-3265]. Tienen una estructura supraenrollada que consiste en dos polipéptidos con estructura en α -hélice, enrollados entre sí. Estas proteínas se asocian con la troponina y con siete monómeros de actina formando el sistema de microfilamentos.

La estructura primaria de las tropomiosinas consiste en unas 10 repeticiones heptaméricas caracteri-

zadas por:

- * Los residuos A y D, que forman la parte central o "core", y suelen ser aminoácidos grandes no polares que median el contacto entre α -hélices.
- * Los residuos de las porciones interiores (E y G), son frecuentemente aminoácidos cargados que probablemente forman puentes salinos entre las hélices de la estructura supraenrollada.
- * Los residuos de las posiciones exteriores (B, C y F) son variables e interaccionan con otras proteínas como la actina y la troponina.

La disponibilidad de este panalérgeno como una proteína recombinante permitiría la caracterización a nivel molecular de las regiones implicadas en las reacciones antigénicas, y su uso en diagnóstico y tratamiento de pacientes alérgicos.

En el presente estudio se han clonado por primera vez distintas secuencias, que codifican para tropomiosina. Estas secuencias codifican para unos polipéptidos de unos 33 kDa, identificados como tropomiosinas en base a:

- i) Alta homología con otras secuencias de tropomiosinas clonadas.
- ii) Desplazamiento de la movilidad de la proteína purificada en geles en presencia de urea, típico de tropomiosinas.
- iii) Reactividad frente a sueros obtenidos de conejos inmunizados con tropomiosina purificada de gamba.
- iv) Reactividad con IgE de sueros de pacientes alérgicos a tropomiosinas.

Igualmente se presentan resultados sobre la reactividad cruzada de la tropomiosina con alérgenos comunes relacionados y no relacionados filogenéticamente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado se refiere a moléculas de ADN recombinante que codifican para epítomos del alérgeno tropomiosina de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Periplaneta americana*, y *Helix aspersa*, y a su aplicación para el diagnóstico y tratamiento de alergias.

1. Descripción de los especímenes utilizados como materia prima

La clonación del ADN complementario que codifica para la tropomiosina, se realizó a partir del material genético obtenido de dos organismos dentro del *Phylum Arthropoda*:

- * *Dermatophagoides pteronyssinus* (ácaro del polvo), que pertenece a la Familia Pyroglyphidae, Orden Astigmata, Subclase Acari, y Clase Arachnida;
- * *Periplaneta americana* (cucaracha americana), perteneciente a la Familia Blattidae, Orden Blattaria, y Clase Hexapoda;

y de un organismo del *Phylum Mollusca*:

- * *Helix aspersa* (caracol terrestre) que pertenece a la Familia Helicidae, Orden Pulmonata, y Clase Gasteropoda.

2. Clonación y secuenciación de genes que codifican para tropomiosinas

La clonación de genes puede realizarse utilizando diversos métodos [(5) Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory]: bibliotecas de ADN genómico o ADN complementario, utilizando como vectores: plásmidos, fasmidos, bacteriófagos o cósmidos. También se puede utilizar la técnica de PCR (amplificación en cadena de la ADN polimerasa) para clonar un gen del cual se conoce parte de su secuencia. De igual manera, la detección de los clones que portan el gen de interés puede realizarse de varias formas: complementación de mutantes auxótrofos, inmunodetección o actividad enzimática de la proteína expresada, radiodetección con sondas de oligonucleótidos marcadas radiactivamente, o secuenciación directa. En la presente invención se han conjugado los dos métodos más directos de ambas etapas: la clonación mediante la amplificación por PCR de ADN complementario y la secuenciación directa de los insertos

clonados.

A partir de 100 mg de materia prima de diversas fuentes, se aisló el ARN mensajero enriquecido en transcritos con poli(A+) utilizando columnas de afinidad. Se sintetizó la primera cadena de ADN complementario a partir del ARN mensajero aislado, utilizando transcriptasa reversa. El híbrido de ADN-ARN obtenido se utilizó como molde para la amplificación de los correspondientes genes de la tropomiosina. En este proceso se utilizaron como cebadores oligonucleótidos degenerados, obtenidos por comparación de la secuencia de aminoácidos de varias tropomiosinas de invertebrados conocidas. A estos cebadores se les añadió en sus extremos secuencias de reconocimiento de diversas endonucleasas de restricción. La amplificación por PCR se realizó a temperaturas de hibridación de entre 42-56°C y durante 30-35 ciclos. La reacción se sometió a electroforesis en geles de agarosa (2 %) y una banda de unos 850 pares de bases (pb) fue aislada del gel y purificada. El ADN purificado se digirió con las endonucleasas de restricción EcoRI y HindIII, y se ligó al vector pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), cortado con los mismos enzimas. Células competentes de *E. coli* DH5 α se transformaron con la mezcla de ligación y los transformantes se seleccionaron en placas de medio sólido LB con ampicilina, X-gal e IPTG.

El ADN plasmídico de los clones resistentes a ampicilina, y que tenían color blanco fue aislado, y caracterizado mediante digestión con endonucleasas de restricción. El ADN insertado, cuyo tamaño correspondía con el esperado, fue secuenciado mediante el método de Sanger [(6) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467] utilizando dideoxinucleótidos fluorescentes. El análisis informático de las secuencias demostró que todas las secuencias codificaban para la tropomiosina, y que existía una gran homología con otras tropomiosinas descritas.

3. Expresión de los genes clonados

Existe una gran diversidad de sistemas de expresión de proteínas heterólogas. En la presente invención se ha sobreexpresado el gen de la tropomiosina para formar una proteína no fusionada utilizando el vector de expresión pKN172 [(7) Way, M., Pope, B., Gooch, J., Hawkins, M., and Weeds, A.G. (1990). Identification of a region in segment 1 of gelsolin critical for actin binding. EMBO J. 9, 4103-4109]. La expresión en este plásmido se basa en la interacción de la ARN polimerasa del fago T7 con un promotor específico del mismo fago (promotor del gen ϕ 10), que es colocado delante del fragmento que queremos expresar. La expresión de la ARN polimerasa de T7, en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) [(8) Studier, F. M. and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189, 113-130], se induce con IPTG, lo cual desencadena la expresión final del gen de interés. El IPTG se añadió, a concentraciones entre 0,6-1 mM, a un cultivo crecido en medio nutritivo (LB ó TB) con ampicilina (100-200 μ g/ml), a una densidad óptica a 600 nm de entre 0,6-1. Esta adición provoca la expresión del gen de la tropomiosina clonado detrás del promotor del gen ϕ 10. El cultivo se recogió entre 3-6 horas después de la inducción.

4. Purificación de la tropomiosina recombinante

El método de purificación de la tropomiosina se basa en las características fisicoquímicas de esta proteína, que hacen que a bajos valores de pH precipite selectiva y reversiblemente. De esta forma, después de diversos ciclos de precipitación a pH 4, se obtiene una preparación altamente purificada de tropomiosina [(9) Smillie, L.B. (1982). Preparation and identification of alfa and beta tropomyosins. Methods Enzymol. 85, 234-241].

En resumen, esta invención proporciona ADN recombinante que codifica para tropomiosina de varias especies animales. Igualmente proporciona un sistema de expresión microbiano (*E. coli*) para la obtención de grandes cantidades de tropomiosina. Esta expresión puede realizarse en otros sistemas microbianos (*Pseudomonas*, *Bacillus*) o eucarióticos (levaduras o células de insectos). La tropomiosina producida se purifica mediante precipitaciones selectivas a pHs ácidos, y una precipitación final con sulfato amónico. La invención también describe métodos de diagnóstico utilizando está tropomiosina recombinante.

5. Aplicaciones

Los métodos de diagnóstico, tanto *in vitro* como *in vivo*, que actualmente se utilizan se basan en el uso de extractos de alérgenos. Debido a la dificultad de obtener lotes reproducibles de extractos alérgnicos, y a que algunos alérgenos menores, como la tropomiosina están poco representados o parcialmente degradados [(10) Susani, M., Jertschin, P., Dolecek, C., Sperr, W.R., Valent, P., Ebner, C., Kraft, D., Valenta, R., and Scheiner, O. (1995). High level expression of birch pollen profilin (Bet v 2)

in *Escherichia coli*: purification and characterization of the recombinant allergen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 215, 250-263] es interesante el uso de preparaciones reproducibles de alérgenos puros obtenidos mediante la tecnología de ADN recombinante [(2) Scheiner and Kraft, 1995]. Actualmente se pueden realizar diagnósticos precisos de ciertos tipos de alergias utilizando un número definido de alérgenos recombinantes. La caracterización del patrón de reactividad de cada paciente puede conducir en un futuro próximo, al desarrollo de un tipo de inmunoterapia más individualizada, y por ello eficiente. El alérgeno recombinante, tropomiosina descrito en esta invención, permite el diagnóstico de alergias a organismos invertebrados (ácaros, insectos) y alergias alimentarias a marisco y gasterópodos en las cuales se encuentra implicada la tropomiosina.

Depósito de las cepas

Las cepas de microorganismos correspondientes a la presente invención han sido depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia (Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100 BURJASOT, Valencia) de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes, con las siguientes referencias:

- *Escherichia coli* CECT 5099
- *Escherichia coli* CECT 5100
- *Escherichia coli* CECT 5101

depositadas todas ellas el 3 Diciembre 1998.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Secuencia de cDNA del gen de la tropomiosina de *Dermatophagoides pteronnyssinus*. La secuencia de aminoácidos deducida se muestra debajo de la secuencia de ADN.

Figura 2: Secuencias de cDNA del gen de la tropomiosina de *Periplaneta americana*. La secuencia de aminoácidos deducida se muestra debajo de la secuencia de ADN.

Figura 3: Secuencias de cDNA del gen de la tropomiosina de *Helix aspersa*. La secuencia de aminoácidos deducida se muestra debajo de la secuencia de ADN.

Figura 4: Comparación de las secuencias deducidas de aminoácidos de las tropomiosinas descritas en esta invención con otras secuencias de tropomiosinas secuenciadas: mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*, Swiss-Prot P06754), ácaro (*D. pteronnyssinus*, GenBank Y14906), camarón (*Metapenaeus ensis*, GenBank U08008), caracol (*Biomphalaria glabrata*, Swiss-Prot P43689), mejillón (*Mytilus edulis*, GenBank U40035), nematodo (*Caenorhabditis elegans*, GeneBank D38540), pollo (GeneBank M32441), humano (esqueleto, GeneBank X04201). La identidad de los residuos con la secuencia superior de tropomiosina de cucaracha se señala con puntos. Los residuos conservados en más de 60 % están marcados en negrita. Los residuos conservados en todas las tropomiosinas o sólo en las tropomiosinas de invertebrados están indicados con asteriscos o con dos puntos, respectivamente.

Figura 5: Expresión y purificación de la tropomiosina recombinante de *Dermatophagoides pteronnyssinus* (Der p 10) producida en *E. coli*. (A) SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie del proceso de purificación de Der p 10. Carriles 1 y 2, lisado de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo pKN172 sin inserto y con el inserto de ADNc de Der p 10, respectivamente; carriles 3 y 4, rDer p 10 después de la precipitación isoelectrica (3 y 6 µg, respectivamente); carril 5, rDer p 10 después de la cromatografía de tamizado. (B) 12,5 % SDS-PAGE conteniendo 6 M urea. Carril 1, rDer p 10; carril 2, BSA; y carril 3, citocromo c.

Figura 6: Expresión y purificación de tropomiosina recombinante de *Periplaneta americana* (Per a 7) producida en *E. coli*. (A) SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie del proceso de purificación de Per a 7 y (B) 12,5 % SDS-PAGE conteniendo 6 M urea. Carriles 1 y 2, lisado de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo pKN172 sin inserto y con el inserto de ADNc de Per a 7, respectivamente; carriles 3 y 4, rPer a 7 y nPer a 7 purificadas por precipitación isoelectrica, respectivamente; carril 5, BSA; y carril 6, citocromo c.

Figura 7: Western blotting de rDer p 10 incubado con: antisuero comercial anti-tropomiosina de pollo (Sigma Chemicals, St. Louis, USA) (carril 1); antisuero anti-tropomiosina de gamba, producido experimentalmente por inmunización de conejos con tropomiosina de gamba (carril 2); y pool de sueros humanos de: individuos sanos (carril 3); pacientes monosensibilizados a ácaros (carril 4); y pacientes sensibles a ácaros y a insectos caseros (carril 5).

Figura 8: Caracterización inmunológica de Per a 7. Reactividad de anticuerpos IgE procedentes de pacientes alérgicos a insectos caseros frente a extractos de *P. americana* (A) y proteína rPer a7 purificada (B). Las proteínas se transfirieron a PVDF y se incubaron con sueros de pacientes alérgicos a insectos caseros (carriles 1 a 16), pool de sueros de individuos sanos (carril H), o tampón sólo (carril B). El marcador de tamaño molecular se tiñió con Negro Amido B.

Figura 9: análisis Western-blot de la reactividad cruzada entre tropomiosinas. Los extractos de *P. americana* (A), *B. orientalis* (B) y *P. borealis* (gamba del Atlántico) (C) se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. La inhibición se realizó preincubando el pool de sueros de pacientes alérgicos a insectos caseros (A y B) o a marisco (C) con tampón PBS (carril 1), nPer a 7 (carril 2), rPer a 7 (carril 3), BSA (carril 4), y tropomiosina natural de gamba (carril 5).

Figura 10: Inhibición competitiva de la unión de IgE humanas procedentes de pacientes alérgicos a marisco. En la fase sólida se absorbió tropomiosina natural de gamba y en la fase líquida se estudiaron: nPer a 7, rPer a 7, tropomiosina natural de gamba, y BSA como control.

Modos de realización de la invención

La invención puede ser entendida a partir de los siguientes Ejemplos, los cuales no deben considerarse en absoluto como limitativos del alcance de la misma.

Técnicas básicas de la tecnología del ADN recombinante y bioquímica

Como muchas de las técnicas de ADN recombinante empleadas en esta invención son utilizadas rutinariamente por personal cualificado en el tema, es mejor introducir una corta descripción de estas técnicas más que describirlas cada vez que se utilicen. Excepto donde existe una indicación específica, todos estos protocolos están descritos en la referencia Sambrook y col. (5)

1. Aislamiento de plásmidos para su secuenciación

Protocolo modificado del descrito en Sambrook y col. (5), paginas 1.21 a 1.41. Un cultivo de 15 ml de *E. coli*, crecido en LB con ampicilina (100 µg/ml) durante 16 horas a 37°C, se recogió por centrifugación. Las células se resuspendieron en 1 ml TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 2 ml de solución de lisis (0,2 N NaOH, 1 % SDS), manteniéndose en hielo 5 min. Se añadieron 1,5 ml de acetato potásico 3M pH 4,8, agitándose por inversión, y se incubó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 4000xg y 4°C. El sobrenadante se pasó a otro tubo al que se añadieron 9 ml de etanol, incubándose durante 20 minutos. Se centrifugó en las mismas condiciones, y el precipitado se lavó con etanol al 70 %, y se secó.

Este ADN se resuspendió en 200 µl de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA y 100 µg/ml de ARNasa y se siguió purificando según el protocolo Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI) o alternativamente se utilizaron el método de cromatografía Qiafilter plasmid midi kit (Qiagen GmbH, Hidden, Alemania). El ADN así obtenido se resuspendió en 50-80 µl de agua destilada estéril, y se guardó a -20°C.

2. Corte con endonucleasas de restricción

Una reacción contiene típicamente entre 50-500 µg/ml de ADN en el tampón de reacción recomendado por los fabricantes (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia; Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemania; Promega). Se añaden de 2 a 5 unidades de la endonucleasa de restricción por cada µg de ADN y la reacción se incuba de 1 a 3 horas a las temperaturas recomendadas por el fabricante. La reacción se para calentando a 85°C durante 10 min, o por extracción con fenol seguida de precipitación de ADN con etanol. Esta técnica está descrita también en las páginas de 5.28 a 5.32 de la referencia Sambrook. y col. (5).

3. *Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos de ADN de geles*

La electroforesis en geles de agarosa se realizó en un aparato horizontal, utilizando como tampón Tris-borato, como se describe en las páginas 6.3 a 6.15 de la referencia de Sambrook y col. (5). Los fragmentos de ADN se tiñeron utilizando 0,5 mg/ml de bromuro de etidio que se añadió al gel. El ADN se visualizó por iluminación ultravioleta entre 300 y 310 nm. Para purificar fragmentos de ADN de la agarosa se utilizó el kit de GeneClean (Bio101 Inc., La Jolla, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4. *Ligación de fragmentos de ADN*

Para la ligación de fragmentos de ADN con extremos cohesivos complementarios, 100 ng de cada uno de los fragmentos se incubaron en un volumen de reacción de 10 a 20 μ l conteniendo unas 0,5 unidades de T4 ADN ligasa (BioLine, London, UK) en el tampón recomendado por el fabricante. La incubación se llevó a cabo durante 15 horas a 12-15°C, o 7 horas a 20°C.

5. *Transformación de E. coli con ADN*

Las cepas de *E. coli* DH5 α o BL21 (DE3) fueron utilizadas en la mayoría de los experimentos. El ADN fue introducido mediante el protocolo del cloruro cálcico, como se describe en Sambrook (5), páginas de 1.76 a 1.84, o mediante el método del cloruro de rubidio, como describe Hanahan [(23) Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580]. La selección se realizó en LB sólido con ampicilina (100 μ g/ml) y cuando fue necesario se añadieron a cada placa de Petri: 40 μ l de X-gal (20 mg/ml en dimetilformamida), y 4 μ l de IPTG (200 mg/ml).

6. *Muestreo de plásmidos en E. coli*

Después de la transformación, las colonias resultantes de *E. coli* fueron estudiadas para detectar la presencia de los plásmidos deseados mediante un protocolo rápido de aislamiento de plásmidos. Este protocolo está descrito en las páginas 1.25 a 1.28 de la referencia de Sambrook (5).

7. *Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)*

Se siguió básicamente la técnica descrita por Laemmli [(11) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685] utilizando un aparato de electroforesis MINI-PROTEAN (Bio-Rad, Hercules, CA). Los geles, de 10 x 10 cm y con una concentración de poliacrilamida del 12,5 o 15 %, se sometieron a una corriente de 200 voltios durante 45 minutos en tampón Tris-glicina. Las proteínas utilizadas como patrones fueron las del kit Bio-Rad para bajos pesos moleculares. El cálculo de los pesos moleculares y los análisis densitométricos de los geles se realizó utilizando un analizador de imagen (Bio-Image, Millipore Corp, Bedford, MA).

8. *Análisis por inmunotransferencia*

Se realizó por el método de Shen y cols. con modificaciones [(12) Shen, H.D., Choo, K.B., Lee, H.H., Hsieh, J.C., Lin, W.L., Lee, W.R., and Han, S.H. (1991). The 40-kilodalton allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies. Clin. Experiment. Allergy 21, 675-681]. Las proteínas separadas en SDS-PAGE fueron electro-transferidas a filtros de polivinil-difluoruro (PVDF) nylon. El filtro es incubado con un agente bloqueante (como puede ser leche desnatada al 5 % en PBS: al cual llamaremos a partir de ahora leche/PBS). El filtro es entonces incubado con los anticuerpos de interés durante varias horas (estos anticuerpos podrán provenir de pacientes o de animales inmunizados). Posteriormente, el filtro se lava varias veces con leche/PBS, y se incuba con un segundo anticuerpo comercial, al cual está acoplada una enzima (por ejemplo peroxidasa). Este anticuerpo comercial será anti-IgG, en el caso que hayamos utilizado un animal inmunizado, o anti-IgE, si el suero proviene de humanos. El filtro es nuevamente lavado en PBS, y teñido con 4-cloro-1-naftol al 0,06 % en PBS con H₂O₂ al 0,01 %, a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción se para con agua destilada.

9. *Agarosa-isoelectroenfoque (IEP)*

Esta técnica se realizó utilizando placas de Agarosa Isogel (FMC Bio Products, Rockland, Maine), en el intervalo de pH 3-10. Se aplicaron 20 μ g de proteína por calle. El punto isoelectrónico (pI) de las moléculas en cuestión fue determinado comparando su migración con la de un conjunto de proteínas de pI conocido. El esquema electroforético obtenido se evaluó por análisis de imagen en el sistema BIO-IMAGE

(Millipore, Bedford, Mass. USA).

10. *ELISA-Inhibición*

5 Se recubrieron placas de microtitulación (A/S Nunc, Roskilde, Denmark) con tropomiosina natural (200 ng/pocillo) en 0,1 M tampón bicarbonato pH 9,6 mediante incubación a 4°C durante 16 h. Posteriormente se bloquearon con tampón de bloqueo, compuesto por PBS suplementado con 0,05 % Tween-20 y 1 % BSA. Alicuotas de 100 µl de antisuero anti-tropomiosina de gamba (diluido 1:2500) o sueros de
10 pacientes alérgicos (diluido 1:2 o 1:4), fueron incubados previamente con diferentes concentraciones de tropomiosinas natural y recombinante, durante 16 h a 4°C, y posteriormente se añadieron a los pocillos incubándose durante 1 h a 37°C (cuando eran antisueros de conejo) o 16 h a 4°C (cuando era suero de pacientes).

11. *Inhibición "Immunot"*

15 Los sueros de pacientes alérgicos a insectos domésticos, fueron incubados durante la noche a 4°C con 20 µg/ml del inhibidor purificado o BSA (control negativo). Los sueros preadsorbidos se usaron más tarde para inmunoblot según descrito en el apartado 6.1.8.

20 12. *Sueros humanos y experimentales*

La alergia a insectos domésticos y a marisco se diagnosticó de acuerdo a la historia clínica y pruebas positivas de prick. Se seleccionaron los sueros de los pacientes alérgicos con prueba de RAST con mayor clase valor de 1. Los anticuerpos policlonales de conejo contra tropomiosinas, tanto obtenidos experi-
25 mentalmente como comerciales, fueron empleados para caracterizar las proteínas recombinantes. Para la elaboración del inmunosuero, experimental, la inmunización se realizó en conejos New Zealand machos, con inyecciones subcutáneas semanales de 20 mg de tropomiosina de gamba con adjuvante completo de Freud. Después de 8 inyecciones, los animales fueron sangrados y el suero fue recogido. El inmunosuero comercial contra tropomiosina de pollo se adquirió de Sigma Chemicals (St. Louis, MO).

30 **Ejemplos relacionados específicamente con la invención**

1. *Aislamiento de ADN poli (A+) de cuerpos enteros (ácaros y cucaracha) o músculo del pie (caracol)*

35 Se aisló el ARN poli (A+) de 100 mg de cuerpos enteros (ácaros y cucaracha) o músculo del pie (caracol) siguiendo el protocolo descrito en Quick Prep Micro mRNA Purification Test (Pharmacia Biotech). El ARN purificado se resuspendió en 400 µl de agua destilada tratada con dietilpirocarbonato, y se determinó su concentración a 260 nm. Se obtuvieron de 4 a 8 µg de ARN, que se guardaron a -20°C precipitados con etanol. Este ARN poli (A+) fue utilizado para realizar la síntesis de la primera cadena
40 de ADN complementario, como se expone en apartado siguiente.

2. *Síntesis de la primera cadena de ADN complementario*

Un µg de ARN poli (A+) obtenido según el apartado siguiente, fue sedimentado por centrifugación
45 a 4°C a 14000xg durante 30 min. El sobrenadante se lavó con etanol al 70 %, se seco y se resuspendió en 20 µl de agua destilada tratada con dietilpirocarbonato. La solución se calentó a 60°C durante 10 min y luego se enfrió en hielo. Posteriormente, se siguió el protocolo descrito en First-Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia Biotech), salvo que la incubación con la transcriptasa reversa se realizó durante 70 minutos. El cebador utilizado fue la mezcla al azar de hexadesoxinucleótidos, llamado pd(N6)primer
50 (Pharmacia Biotech). Una vez acabada la reacción, la mezcla se calentó a 90°C durante 5 minutos y se enfrió en hielo, almacenándose posteriormente a -20°C hasta que fue utilizada para la reacción en cadenas de la polimerasa (PCR) como se explica en el apartado siguiente.

3. *Amplificación del gen de tropomiosina por PCR*

55 Los cebadores utilizados de la PCR fueron obtenidos de comparar diversas secuencias de tropomiosinas de organismos invertebrados, y teniendo en cuenta la degeneración del código genético:

* TROF (extremo 5' del gen):

60 5'-CCGGGATCCCATATGGA (G/T) GC (C/T) ATCAAGAA (A/G) AA

* TROR (extremo 3' del gen):

5'-CCGAATTCT (T/C) A (A/G) TA (G/A/T) ACCAG (T/A/C)(A/C) A (G/A)(T/C) TCGG

Los cebadores se componen de la zona de hibridación (subrayada), de varios sitios de corte para las endonucleasas de restricción, *EcoRI*, *HindIII* y *NdeI*, (en negrita), y de unos nucleótidos de anclaje. Todos los nucleótidos entre paréntesis están en proporciones equimoleculares en esa determinanda posición.

La reacción de amplificación por PCR del gen de la tropomiosina tenía los siguientes componentes en un volumen de reacción de 50 μ l: tampón de amplificación x 10,5 μ l; 200 mM de dNTPs; 100 pmoles de cada oligonucleótido cebador degenerado; 2,5 unidades de Taq polimerasa (Bioline, London, UK); 5 μ l reacción de ADN complementario obtenido según el ejemplo II y agua, destilada estéril hasta 50 μ l. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador RoboCycler (Stratagene) en las siguientes condiciones: 4 min a 94°C, seguido de 5 ciclos compuestos de 1 min a 94°C, 2 min a 42°C y 2 min a 72°C.

Posteriormente, se realizaron otros 30 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 56°C y 2 min a 72°C de amplificación. Se concluyó con una extensión de 6 minutos a 72°C. El producto de la reacción fue sometido a electroforesis en geles de agarosa (2%). La banda de 850 pb que correspondía a la tropomiosina fue aislada del gel por GeneClean (Bio101, La Jolla, CA), utilizando el protocolo descrito por el fabricante.

4. Clonación del gen de tropomiosina en pBluescript

El fragmento aislado fue digerido con *HindIII*, y posteriormente con *EcoRI*, y las endonucleasas de restricción se inactivaron por calor. Estos fragmentos se ligaron al vector pBluescript digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . La selección se realizó en medio LB con ampicilina, X-Gal e IPTG, como se describe en Sambrook y col. (5). Las colonias resultantes, que en este medio presentaban un color blanco, fueron crecidas para aislar su ADN plasmídico, el cual fue digerido simultáneamente con *EcoRI-HindIII*, y *NdeI-HindIII*. Los clones que, en ambos casos, liberaban un fragmento de 850 pb fueron seleccionados para su posterior análisis.

5. Secuenciación del gen de tropomiosina

La secuenciación del ADN insertado el pBluescript se realizó basándose en el método de Sanger (Hannan, 1983, (23)) modificado para ser utilizado con didesoxinucleótidos fluorescentes y amplificación en termociclador. El ADN a secuenciar se preparó de la siguiente forma: cultivos de *E. coli* DH5 α , conteniendo los plásmidos de interés fueron crecidos en 15 ml de LB suplementado con 100 mg/ml de ampicilina, durante 16 horas, a 37°C y con agitación. El ADN se aisló por el método descrito en el apartado A). Las reacciones de secuenciación se realizaron mezclando 700-1000 ng de molde, 25 pmoles del cebador y los reactivos indicados en el kit de secuenciación (PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Termination Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer) siguiéndose las instrucciones del fabricante. Todos los fragmentos fueron secuenciados en las dos direcciones, utilizando cebadores comerciales (M13-20 primer o reverse primer) o cebadores específicos.

Se obtuvieron las siguientes secuencias de regiones codificantes de tropomiosina:

- Inserto de cDNA de *Dermatophagoides pteronyssinus* de 855 pb que codificaba para un péptido de 284 aminoácidos. La masa molecular esperada es de 32900 Da y un valor de pI de 4,78 (Fig. 1).
- Inserto de cDNA de *Periplaneta americana* de 855 pb que codificaba para un péptido de 284 aminoácidos. La masa molecular esperada es de 32777 Da y un valor de pI de 4,69 (Fig. 2).
- Inserto de cDNA de *Helix aspersa* de 855 pb que codificaba para un péptido de 284 aminoácidos. La masa molecular esperada es de 32637 Da y un valor de pI de 4,58 (Fig. 3).

6. Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras tropomiosinas existentes en el banco de datos (EMBL Data Bank y SWISS-Prot) utilizando el paquete informático GCG (Universidad de Wisconsin Genetics Computer Group) y el programa BLAST [(13) Altschul; S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 23, 3389-3402].

Una alta homología (92 % de nucleótidos idénticos) fue encontrada en la tropomiosina de *D. farinae* (Fig. 1). La ausencia de una secuencia N-X-T/S indica la inexistencia de un sitio de N-glicosilación.

La secuencia, L-K-E-A-E-X-R-A-E, presente en todas las tropomiosinas secuenciadas está también conservada en la región C-terminal de tropomiosinas descritas en esta invención clonadas. Una secuencia periódica heptamérica que forma α -hélice y un extenso motivo "leucine zipper", ambos característicos de tropomiosinas, aparece a lo largo de la secuencia.

5

Búsquedas de similitud entre secuencias, usando el programa BLAST, revelaron que la mayor homología de la tropomiosina de *P. americana* se encuentra con las tropomiosinas de insectos: *Locusta migratoria* (89 %) y *Drosophila melanogaster* (84 %) (Fig.4). También se encontraron altas homologías en otros artrópodos tales como crustáceos (gamba, 84-81 %) y arácnidos (ácaros, 80 %). La homología con otras tropomiosinas de invertebrados, disminuyó fuera de la *Phylum Arthropoda*, por ejemplo, nematodos (69 %) o moluscos (69 %) [(14) Weston, D.S. and Kemp, W.M. (1997). Schistosoma mansonii: Comparison of cloned tropomyosin antigens shared between adult parasites and *iomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol. 76, 358-370. (15) Frenkel, M.J., Savin, K.W., Bakker, R.B., and Ward, C.W. (1989). Characterization of cDNA clones coding for muscle tropomyosin of the nematode *Trichostrongylus colubriformis*. Mol. Biochem. Parasitol. 37, 191-199. (16) Aki, T., Kodama, T., Fujikawa, A., Miura, K., Shigeta, S., Wada, T., Jyo, T., Murooka, Y., Oka, S., and Ono, K. (1995). Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house mite, *Dermatophagoides farinae*. J. Allergy Clin. Immunol. 96, 74-83. (17) Leung, P.S.C., Chu, K.H., Chow, W.K., Ansari, A., Bandea, C.I., Kwan, H.S., Nagy, S.M., and Gershwin, M.E. (1994). Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. J. Allergy Clin. Immunol. 94, 882-890. (18) Reese, G., Jeoung, B.J., Daul, C.B., and Lehrer, S.B. (1997). Characterization of recombinant shrimp allergen Pen a 1 (Tropomyosin). Int. Arch. Allergy Immunol. 113, 240-242. (19) Hanke, P.D. and Storti, R.V. (1986). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a *Drosophila* muscle tropomyosin II isoform. Gene 45, 211-214. (20) Krieger, J., Raming, K., Knipper, M., Grau, M., Mertens, S., and Breer, H. (1990). Insect Biochem. 20, 173-184]. Una homología significativa, aunque menor, se encontró también con las tropomiosinas de los vertebrados, incluyendo las humanas (54 % identidad, 74 % similaridad). La tropomiosina de *P. americana* fue designada con Per a 7 y la de *D. pteronyssinus* como Der p 10, de acuerdo con el Subcomité de Nomenclatura de Alergenos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas [(24) King, T.P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D.G., Platts Mills, T.A.E., and Thomas, W. (1995). Allergen nomenclature. J. Allergy Clin. Immunol. 96, 5-14].

7. Subclonación del gen de la tropomiosina en el vector de expresión pKN172

Los vectores recombinantes (2 μ g) derivados del pBluescript fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *Hind*III y *Nde*I. El fragmento de 900 pb, que contenía el gen de la tropomiosina, fue separado por electroforesis en gel de agarosa y aislado del gel. Este fragmento fue ligado al vector de expresión pKN172, digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Las colonias que portaban los plásmidos recombinantes fueron seleccionadas mediante una PCR analítica, en la cual se utilizó como molde una cantidad minúscula de la colonia. El ADN plasmídico de los clones positivos se analizó mediante endonucleasas de restricción, seleccionándose un clon que tuviera el fragmento deseado. Este plásmido se utilizó para transformar la cepa utilizada en la expresión *E. coli* BL21 (DE3) Studier and Moffatt, 1986, (8). Esta cepa tiene en su cromosoma un lisógeno del fago 1 conteniendo el gen de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor lacUV. La selección y crecimiento de esta cepa se realizó rutinariamente en placas de LB conteniendo 200 mg/ml de ampicilina.

8. Expresión de la tropomiosina en *E. coli*

E. coli BL21 (DE3), conteniendo el plásmido pKN172 con la región que codificaba para la tropomiosina, se creció en LB con 200 μ g/ml de ampicilina a 37°C con agitación. A las 16 horas, se diluyó el cultivo hasta una densidad óptica de 0,3-0,4. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,6, se añadió 0,6 mM de IPTG. A las 3 horas de inducción, el cultivo se recogió por centrifugación a 4000xg durante 5 minutos, y el sedimento, después de pesado, se congeló a -20°C. Las células se resuspendieron en 1/10 del volumen original, utilizando 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 y NaCl 100 mM. Alícuotas de las muestras, conteniendo aproximadamente 20 mg de proteína, se analizaron en SDS-PAGE 12,5 %. Se detectó una banda, por tinción de Coomassie, de unos 36-37 kDa, que estaba mucho más intensa que en el control de pKN172 sin inserto. La banda, cuantificada por densitometría, constituía entre un 15 y un 30 % de proteína total.

9. Purificación de la tropomiosina recombinante

Las células, procedentes de la expresión descrita en el apartado anterior se incubaron con lisozima (0,1

mg/ml) durante 15 min a 37°C y posteriormente se sonicaron en hielo durante 2 minutos, en intervalos de 20 segundos. El extracto obtenido se clarificó por centrifugación a 14000 rpm durante 30 min. La tropomiosina fue purificada siguiendo el método de precipitación selectiva descrito por Smillie, 1982 (9). Se incubaron con agitación a 4°C durante 15 min en tampón de extracción (1M KCl; 0,5 mM DTT, pH 7,0). Posteriormente se ajustó a pH 4,6 con HCl y se agitó durante 30 min. La preparación se centrifugó a 5000xg durante 15 min, y el precipitado se resuspendió en tampón de extracción y se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se volvió a agitar a pH 4,6 con HCl, repitiéndose la operación dos veces más. Un mayor grado de purificación se obtuvo mediante precipitación con sulfato amónico a 35-60 % de saturación. La muestra dializada fue liofilizada, y resuspendida en 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Un ejemplo del proceso de purificación de la tropomiosina de *D. pteronyssinus* en la figura 5, y de la tropomiosina *P. americana* en la figura 6. La migración de las tropomiosinas recombinantes era similar a la de la tropomiosina natural utilizada como control.

Una forma no fusionada de Der p 10 fue expresada en *E. coli* BL21 (DE3), usando el vector expresión pKN172 Way et al., 1990 (7) como se describió previamente [(21) Asturias, J.A., Arilla, M.C., Gómez Bayón, N., Martínez, J., Martínez, A., and Palacios, R. (1997). Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100, 365-372]. El rendimiento del alérgeno recombinante Der p 10 (rDer p 10) fue 43 mg/L de cultivo bacteriano, que representa aproximadamente el 15 % del total de las proteínas *E. coli*. La proteína recombinante fue purificada mediante precipitación isoelectrica (Aki et al., 1995, (16)) y cromatografía de filtración en gel de Superdex 75 PC 3.2/30 column (SMART, Pharmacia Biotech). El método de precipitación isoelectrica dio un 96 % de proteína pura, mostrando una banda con una masa molecular aparente de 36 kDa como se determinó mediante SDS-PAGE (Fig. 5A), la cual está en concordancia con la masa molecular deducida de las secuencias nucleótidas. Se hicieron necesarias extracciones repetidas de las primeras precipitaciones para mejorar la recuperación rDer p 10. El rendimiento de la rDer p 10 purificada, fue de 26 mg/L de cultivo bacteriano. Por comparación, el rendimiento de otra tropomiosina recombinante de ácaros, fue 79 veces más bajo y tiene la desventaja que es una proteína fusionada con glutathione S-transferasa, una proteína conocida por ser también un alérgeno de ácaros [(22) O'Neill, G.M., Donovan, G.R., and Baldo, B.A. (1994). Cloning and characterization of a major allergen of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1219, 521-528]. Con la presencia de 6 M de urea, la movilidad de rDer p 10 purificada sobre SDS-PAGE cambió para dar una masa molecular aparente de 48 kDa, mientras que las proteínas utilizadas como control migraban a las posiciones esperadas (Fig. 5B). El rendimiento de rPer a 7 purificada fue de 9 mg/L de cultivo bacteriano. La proteína pura migrada como una banda 37,6 kDa sobre SDS-PAGE (Fig. 6). La movilidad de las tropomiosinas *P. americana* purificadas sobre SDS-PAGE conteniendo 6 M urea cambió, mientras BSA (67 kDa) y citocromo c (12,5 kDa) migraba a la posición esperada (Fig. 6B). En estos geles las tropomiosinas recombinante y natural dieron masas moleculares aparentes de 52 y 47,8 kDa respectivamente. El comportamiento isoelectrico y el cambio de migración en electroforesis en geles de urea son característicos de las tropomiosinas (Smillie, 1982, (9)) e indican que las tropomiosinas recombinantes expresadas en *E. coli* mantienen las propiedades fisicoquímicas de las tropomiosinas naturales.

10. Purificación de la tropomiosina natural.

La materia prima utilizada para la obtención de tropomiosina natural fueron cuerpos enteros de especímenes adultos de ambos sexos de las cucarachas (*P. americana*) músculo del pie de los caracoles (*H. aspersa*) o colas de langostino (*Penaeus borealis*). El método seguido se basó en el protocolo descrito por Smillie, 1982, (9). En primer lugar se obtuvo un extracto acetónico, para lo cual se machacaron 50 g de material con un homogeneizador, y se agitó durante 5 min en 50 ml de 20 mM KCl, 1mM KHCO₃, 0,1 M CoCl₂, 0,1 mM DTT frío, después de dejarlo reposar durante 20 min a 4°C se filtró a través de varias capas de gasa. El residuo se incubó con agitación durante 5 min y se filtró nuevamente. El proceso se repitió 3 veces con 200 ml de etanol 50 %, 2 veces con 200 ml de etanol 95 % y 2 veces con 200 ml de acetona. El residuo se extiende sobre papel de filtro y se deja secar. El extracto acetónico así obtenido se guardó a -20°C, y se utilizó para purificar la tropomiosina natural siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior 9.

La tropomiosina natural de *P. americana* se purificó de extractos de cuerpos completos de cucarachas por medio de la precipitación isoelectrica y fracción de sulfato amónico. La proteína dio una banda homogénea simple sobre SDS-PAGE de Azul de Coomassie, con una masa molecular aparente de 37,1 kDa (Fig. 3A). El rendimiento del alérgeno natural de los extractos de cucarachas fue de 0,7 % (p/p), y de caracoles 1,8 % (p/p).

11. Detección de la tropomiosina recombinante con antisueros de conejo frente a tropomiosina de pollo y gamba

Se corrieron en SDS-PAGE 12,5%, diferentes muestras procedentes de los distintos pasos de la expresión y purificación de tropomiosina, y se transfirieron a PVDF.

Las membranas, conteniendo las proteínas transferidas, se incubaron con diluciones 1:3000 de suero de conejos inmunizados con tropomiosina purificada de gamba y antisueros comerciales (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) anti-tropomiosina de pollo. Después de los lavados, se incubaron con diluciones 1:2000 del anticuerpo conjugado a la enzima peroxidasa. Como se muestra en la figura 7, se detectó una banda de reacción mayoritaria a 36 kDa. La diferente reactividad de rDer p 10 frente a anticuerpos contra la tropomiosina de gamba y pollo (Fig. 7) es una consecuencia del nivel diferente de homología, 80% aminoácidos idénticos, con la tropomiosina de gamba y 55% con la de pollo.

12. Detección de la tropomiosina recombinante con anticuerpos IgE procedentes de pacientes atópicos

Se separaron por SDS-PAGE las proteínas del extracto alergénico de *Periplaneta americana*, y después de ser transferidas a membranas se incubaron con sueros de pacientes alérgicos a insectos. Las tropomiosinas recombinantes mostraron una reacción similar a las proteínas del extracto natural por las IgE del suero de los pacientes, como se puede observar en la Fig. 8.

La frecuencia de la unión de la IgE frente a la tropomiosina (del extracto y de la proteína recombinante purificada) fue comparada por inmunoblotting. Se detectó reactividad de anticuerpos IgE frente a la tropomiosina purificada en 12 de los 29 sueros probados (41%). Un experimento de Western blot representativo incluyendo los sueros positivos a tropomiosina se muestra en la Fig. 8. Siete de estos sueros dieron una señal fuerte en la banda de 37 kDa y otras bandas de menor tamaño (33, 29, 21, y 18 kDa) que podrían ser productos de degradación de la tropomiosina, así como también en una banda de 80 kDa que podría ser una forma dimérica de la tropomiosina. Estos sueros reaccionaron también con una banda de 37 kDa en el extracto de cucarachas.

13. Reactividad cruzada entre tropomiosinas de invertebrados

Experimentos de inhibición de la reactividad de anticuerpos IgE de pacientes sensibles a tropomiosinas con Per a 7 frente a extractos de otros artrópodos, demostraron que las tropomiosinas pueden ser considerados alérgenos importantes de estas especies. Los experimentos de inmunoblotting-inhibición mostraron que ambas tropomiosinas (natural y recombinante) fueron capaces de inhibir la unión de IgE frente a extractos de tropomiosina en *P. americana* y *Blatta orientalis* (Fig. 9). Es importante observar que casi todas las bandas de unión de IgE (65, 52, 36, 27, y 20 kDa), detectadas en el extracto de *B. orientalis*, desaparecieron en presencia de la tropomiosina. Estas bandas de reactividad diferentes de tropomiosina, se pudieron producir por los procesos de agregación o degradación de tropomiosina. No obstante, la tropomiosina natural produjo una inhibición más fuerte que la equivalente recombinante. Cuando se utilizaron los sueros de los pacientes alérgicos a marisco, ambos alérgenos Per a 7 (natural y recombinante) produjeron una inhibición similar. Los alérgenos homólogos, tropomiosina de gamba y Per a 6 también bloquearon la reactividad de la IgE frente a los otros alérgenos detectados por el suero probado (Fig. 6C). En los experimentos de ELISA-inhibición, los alérgenos Per a 6 produjeron el 50% de inhibición de la unión de la IgE frente a la tropomiosina de gamba, comparada con el 96% de inhibición producida con tropomiosina de gamba (Fig. 10).

Usos y administración

La presente invención cubre el uso de la tropomiosina de los orígenes descritos o péptidos sintéticos derivados de ella para tratamientos de hiposensibilización en mamíferos. El método de hiposensibilización implica la administración repetida por vías parenteral (subcutánea, intravenosa o intramuscular), oral, nasal o rectal del alérgeno en cuestión. Estos (poli) péptidos pueden administrarse tanto solos como en combinación con otros diluyentes, de acuerdo con la legislación vigente y los procedimientos galénicos al uso.

La presente invención también comprende la utilización para el diagnóstico "in vivo" (mediante pruebas cutáneas) e "in vitro", (mediante inmunoensayos específicos que utilicen la tropomiosina como fase sólida) de alergias producidas por tropomiosinas de las fuentes descritas o de todas aquellas que originen fenómenos de reactividad cruzada con respecto a éstas.

Lista de secuencias

1. INFORMACION GENERAL:

SOLICITANTE:

NOMBRE: Bial Industrial Farmacéutica, S.A.

CALLE: Alameda de Urquijo, 27

CIUDAD: Bilbao

PROVINCIA: Vizcaya

PAIS: España

CODIGO POSTAL: 48008

TITULO DE LA INVENCIÓN: ADN RECOMBINANTE QUE CODIFICA PARA EPITOPOS DEL ALERGENO TROPOMIOSINA DE ACÁROS, CUCARACHAS Y MOLUSCOS, UTIL PARA EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE ALERGIAS.

NUMERO DE SECUENCIAS: 6

FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

TIPO DE SOPORTE: disco de 3"

ORDENADOR: compatible

SISTEMA OPERATIVO: Windows 3.1

SOFTWARE: Microsoft Word para Windows 3.1

INFORMACION SOBRE EL REPRESENTANTE/AGENTE:

NOMBRE: Javier Ungría López

NUMERO DE REGISTRO: 392/1

INFORMACION SOBRE TELECOMUNICACION:

TELEFONO: 914136062

FAX: 914136417

2. INFORMACION DE SEQ ID NO: 1 :

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 855

(b) Tipo: ácido nucléico

(c) Topología: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm

(iii) origen:

(a) Organismo: *Dermatophagoides pteronyssinus*

(b) Tejido: Cuerpos enteros

(iv) Características: 1-855 región codificante de la tropomiosina

(v) Descripción: SEQ ID NO: 1:

ATGGAGGCCA TCAAGAATAA AATGCAGGCA ATGAAGCTCG AAAAAGATAA 50

TGCTATCGAT CGAGCTGAAA TTGCCGAACA AAAAGCCCGT GATGCTAATC 100

TTCGTGCTGA AAAGTCCGAA GAAGAAGTAC GTGCATTACA GAAAAAATC 150

ES 2 147 539 B1

CAACAAATCG AGAATGAATT GGATCAGGTT CAAGAACAAT TATCGGCTGC 200
 5 CAATACAAAA TTGGAAGAAA AGGAAAAAGC CCTGCAAACCT GCTGAAGGTG 250
 ATGTTGCAGC ATTGAATCGT CGTATTCAAT TGATCGAAGA AGATTTGGAA 300
 10 CGATCAGAAG AACGACTTAA AATTGCAACA GCTAAATTGG AAGAAGCATC 350
 ACAATCTGCC GATGAATCTG AACGTATGCG AAAAATGTTG GAACATCGTT 400
 15 CCATTACCGA TGAAGAACGA ATGGAAGGTT TGGAAAATCA ATTAAAAGAA 450
 20 GCACGTATGA TGGCTGAAGA TGCTGATAGA AAATATGATG AAGTTGCACG 500
 TAAATTAGCA ATGGTTGAAG CCGATTTAGA ACGTGCTGAA GAACGTGCCG 550
 25 AAAGTGGTGA ATCGAAAAAT GTGGAACTTG AGGAAGAATT ACGTGTTGTT 600
 GGTAATAATC TAAAATCATT GGAAGTTAGT GAAGAAAAAG CACAACAACG 650
 30 TGAAGAAGCA CATGAACAAC AGATCCGTAT TATGACAACC AAAGTTAAAG 700
 35 AAGCTGAAGC ACGTGCTGAA TTCGCTGAAC GATCAGTGCA AAAATTACAA 750
 AAAGAAGTTG GTCGTTTGA AGATGAATTG GTCCATGAAA AGGAAAAATA 800
 40 TAAATCCATT TCCGATGAAT TGGACCAAAC ATTTGCCGAA CTTACTGGTT 850
 45 ATTAA 855

3. INFORMACION DE SEQ ID NO: 2 :

- 50 (i) Características de la secuencia:
 (a) Longitud: 284
 (b) Tipo: aminoácido
 (c) Topología: lineal
 55 (ii) Tipo de molécula: péptido
 (iii) Origen:
 (a) Organismo: *Dermatophagoides pteronyssinus*
 (b) Tejido: cuerpos enteros
 60 (iv) Características: tropomiosina
 (v) Descripción: SEQ ID NO: 2:

ES 2 147 539 B1

	Met	Glu	Ala	Ile	Lys	Asn	Lys	Met	Gln	Ala	Met	Lys	Leu	Glu	Lys	
					5					10					15	
5																
	Asp	Asn	Ala	Ile	Asp	Arg	Ala	Glu	Ile	Ala	Glu	Gln	Lys	Ala	Arg	
					20					25					30	
10																
	Asp	Ala	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Lys	Ser	Glu	Glu	Glu	Val	Arg	Ala	
					35					40					45	
15																
	Leu	Gln	Lys	Lys	Ile	Gln	Gln	Ile	Glu	Asn	Glu	Leu	Asp	Gln	Val	
					50					55					60	
20																
	Gln	Glu	Gln	Leu	Ser	Ala	Ala	Asn	Thr	Lys	Leu	Glu	Glu	Lys	Glu	
					65					70					75	
25																
	Lys	Ala	Leu	Gln	Thr	Ala	Glu	Gly	Asp	Val	Ala	Ala	Leu	Asn	Arg	
					80					85					90	
30																
	Arg	Ile	Gln	Leu	Ile	Glu	Glu	Asp	Leu	Glu	Arg	Ser	Glu	Glu	Arg	
					95					100					105	
35																
	Leu	Lys	Ile	Ala	Thr	Ala	Lys	Leu	Glu	Glu	Ala	Ser	Gln	Ser	Ala	
					110					115					120	
40																
	Asp	Glu	Ser	Glu	Arg	Met	Arg	Lys	Met	Leu	Glu	His	Arg	Ser	Ile	
					125					130					135	
45																
	Thr	Asp	Glu	Glu	Arg	Met	Glu	Gly	Leu	Glu	Asn	Gln	Leu	Lys	Glu	
					140					145					150	
50																
	Ala	Arg	Met	Met	Ala	Glu	Asp	Ala	Asp	Arg	Lys	Tyr	Asp	Glu	Val	
					155					160					165	
55																
	Ala	Arg	Lys	Leu	Ala	Met	Val	Glu	Ala	Asp	Leu	Glu	Arg	Ala	Glu	
					170					175					180	
60																
	Glu	Arg	Ala	Glu	Thr	Gly	Glu	Ser	Lys	Ile	Val	Glu	Leu	Glu	Glu	
					185					190					195	

ES 2 147 539 B1

	Glu Leu Arg Val Val Gly Asn Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val Ser	200	205	210
5				
	Glu Glu Lys Ala Gln Gln Arg Glu Glu Ala His Glu Gln Gln Ile	215	220	225
10				
	Arg Ile Met Thr Thr Lys Leu Lys Glu Ala Glu Ala Arg Ala Glu	230	235	240
15				
	Phe Ala Glu Arg Ser Val Gln Lys Leu Gln Lys Glu Val Gly Arg	245	250	255
20				
	Leu Glu Asp Glu Leu Val His Glu Lys Glu Lys Tyr Lys Ser Ile	260	265	270
25				
	Ser Asp Glu Leu Asp Gln Thr Phe Ala Glu Leu Thr Gly Tyr	275	280	

4. INFORMACION DE SEQ ID NO: 3 :

- 30 (i) Características de la secuencia:
- (a) Longitud:
 - (b) Tipo: ácido nucleico
 - (c) Topología: lineal
- 35 (ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm
- (iii) Origen:
- (a) Organismo: *Periplaneta americana*
 - (b) Tejido: cuerpo entero
- 40 (iv) Características: 1-855 región codificante de la tropomiosina
- (v) Descripción: SEQ ID NO: 3:

45	ATGGATGCTA TCAAGAAGAA GATGCAGGCG ATGAAGCTGG AGAAGGACAA 50
50	CGCGATGGAC TGCGCCCTTC TCTGCGAGCA GCAGGCCCGC GACGCCAACC 100
	TTAGGGCCGA GAAGGCTGAG GAGGAGGCGC GCTCCCTGCA GAAGAAGATC 150
55	CAGCAGATTG AGAACGATCT GGATCAGACC ATGGAGCAGC TGATGCAGGT 200
	CAACGCCAAG CTGGACGAGA AGGACAAGGC CCTCCAGAAC GCTGAGAGTG 250
60	AAGTTGCTGC CCTGAACCGC CGTATCCAGC TGCTAGAGGA GGACCTCGAG 300

ES 2 147 539 B1

```

AGGTCTGAGG AACGATTGGC CACTGCCACT GCCAAACTGG CCGAGGCTTC 350
ACAGGCTGTC GATGAATCCG AGCGAGCCCG TAAGATTCTT GAATCCAAGG 400
GCCTGGCGGA TGAAGAACGC ATGGACGCAC TGGAGAACCA GCTGAAGGAG 450
GCCAGGTTCA TGGCTGAAGA AGCAGACAAA AAATATGATG AGGTTGCACG 500
TAAGTTGGCC ATGGTTGAGG CCGACTTGGA GAGAGCAGAG GAACGTGCCG 550
AGAGTGGTGA ATCCAAAATT GTAGAGCTTG AGGAGGAGCT CCGTGTGTTC 600
GGCAACAACC TGAAGTCCCT TGAGGTGTCT GAGGAGAAGG CCAACCTGCG 650
TGAAGAAGAG TACAAGCAGC AGATTAAGAC CTTGACTACC AGGCTAAAGG 700
AGGCTGAGGC CCGTGCTGAG TTCGCTGAGA GGTCCGTGCA GAAGCTGCAG 750
AAGGAGGTTG ACAGGCTTGA GGATGAATTG GTACACGAGA AGGAGAAGTA 800
CAAGTTCATT TGTGATGATC TTGATATGAC TTTCACCGAA CTTGCTGGTT 850

ACTAA 855

```

5. INFORMACION DE SEQ ID NO: 4 :

- (i) Características de la secuencia:
 - (a) Longitud: 284
 - (b) Tipo: aminoácido
 - (c) Topología: lineal
- (ii) Tipo de molécula: péptido
- (iii) Origen:
 - (a) Organismo: *Periplaneta americana*
 - (b) Tejido: cuerpos enteros
- (iv) Características: tropomiosina
- (v) Descripción: SEQ ID NO: 4:

```

Met Asp Ala Ile Lys Lys Lys Met Gln Ala Met Lys Leu Glu Lys
      5                      10                      15
Asp Asn Ala Met Asp Cys Ala Leu Leu Cys Glu Gln Gln Ala Arg
      20                      25                      30
Asp Ala Asn Leu Arg Ala Glu Lys Ala Glu Glu Glu Ala Arg Ser
      35                      40                      45

```

ES 2 147 539 B1

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

6. INFORMACION DE SEQ ID NO: 5 :

(i) Características de la secuencia:

- (a) Longitud:
- (b) Tipo: ácido nucleico
- (c) Topología: lineal

(ii) Tipo de molécula: ADNc a partir de ARNm

(iii) Origen:

- (a) Organismo: *Helix aspersa*
- (b) Tejido: músculo del pie

(iv) Características: 1 - región codificante de la tropomiosina

(v) Descripción: SEQ ID NO: 5 :

```

ATGGATGCTA TCAAGAAGAA GATGTTGGCC ATGAAAATGG AGAAGGAAAA 50
TGCCTTGGAT AGGGCAGAAC AGGTGGAGCA GAAGCTGCGA GACTGCGAGT 100
GTAATAAGAA CAAGGTGGAA GAAGATCTGA ACAACCTACA AAAGAAATTC 150
GCCATCTTGG AGAACGACTT CGACAGCATC AACGAGCAGT TGCTTGATGC 200
CAACACCAAA CTTGAGGCAT CCGAGAAGAA GAATGCAGAG ATTGAAAGTG 250
AGACAGCAGG TCTGCAAAGA CGTATCCAGC TGCTGGAGGA GGACTTGGAG 300
AGGTCAGAAG AGCGTCTTCA GAGTGCAACA GAGAAGTTGG AAGAGGCATC 350
TAAAGCTGCT GATGAAAGTG AAAGAGGTCG TAAGGTGCTT GAGAGCAGGA 400
GCTTGGCTGA TGATGAACGA TTGGATGGTC TTGAAGCTCA GTTGAAAGAA 450
GCTAAATACA TCGCCGAGGA TGCTGAGCGC AAATTCGATG AGGCTGCTCG 500
TAAACTGGCC ATCACAGAGG TGGATCTCGA GAGAGCTGAG GCCCGTTTGG 550
AGGCTGCTGA GCGGAAGATC CTTGAGTTGG AGGAGGAGTT GAAGGTCGTC 600
GGCAACAATA TGAAATCTTT GGAAATCAGT GAACAAGAGG CATCCCAGAG 650
AGAGGATAGC TACGAAGAGA CGATCCGTGA CTTGACCCAG AGGCTCAAGG 700

```

ES 2 147 539 B1

ACGCCGAGAA TCGTGCCAGC GAGGCTGAGC GCACAGTGTC CAAACTACAG 750

5 AAAGAGGTGG ACAGATTGGA AGACGAATTG CTGGCAGAGA AAGAGAGATA 800

CAAAGCTACT TCAGACGAAC TGGATAGTAC ATTTGCCGAA CTGGCTGGCT 850

10 ACTAA 855

7. INFORMACION DE SEQ ID NO: 6 :

- 15 (i) Características de la secuencia:
 (a) Longitud: 284
 (b) Tipo: aminoácido
 (c) Topología: lineal
 20 (ii) Tipo de molécula: péptido
 (iii) Origen:
 (a) Organismo: *Helix aspersa*
 (b) Tejido: músculo del pie
 25 (iv) Características: tropomiosina
 (v) Descripción: SEQ ID NO: 6:

Met Asp Ala Ile Lys Lys Lys Met Leu Ala Met Lys Met Glu Lys
5 10 15

Glu Asn Ala Leu Asp Arg Ala Glu Gln Val Glu Gln Lys Leu Arg
35 20 25 30

Asp Cys Glu Cys Asn Lys Asn Lys Val Glu Glu Asp Leu Asn Asn
40 35 40 45

Leu Gln Lys Lys Phe Ala Ile Leu Glu Asn Asp Phe Asp Ser Ile
50 55 60

Asn Glu Gln Leu Leu Asp Ala Asn Thr Lys Leu Glu Ala Ser Glu
65 70 75

Lys Lys Asn Ala Glu Ile Glu Ser Glu Thr Ala Gly Leu Gln Arg
80 85 90

55 Arg Ile Gln Leu Leu Glu Glu Asp Leu Glu Arg Ser Glu Glu Arg
95 100 105

60

ES 2 147 539 B1

	Leu	Gln	Ser	Ala	Thr	Glu	Lys	Leu	Glu	Glu	Ala	Ser	Lys	Ala	Ala
						110				115					120
5	Asp	Glu	Ser	Glu	Arg	Gly	Arg	Lys	Val	Leu	Glu	Ser	Arg	Ser	Leu
						125				130					135
10	Ala	Asp	Asp	Glu	Arg	Leu	Asp	Gly	Leu	Glu	Ala	Gln	Leu	Lys	Glu
						140				145					150
15	Ala	Lys	Tyr	Ile	Ala	Glu	Asp	Ala	Glu	Arg	Lys	Phe	Asp	Glu	Ala
						155				160					165
20	Ala	Arg	Lys	Leu	Ala	Ile	Thr	Glu	Val	Asp	Leu	Glu	Arg	Ala	Glu
						170				175					180
25	Ala	Arg	Leu	Glu	Ala	Ala	Glu	Ala	Lys	Ile	Leu	Glu	Leu	Glu	Glu
						185				190					195
30	Glu	Leu	Lys	Val	Val	Gly	Asn	Asn	Met	Lys	Ser	Leu	Glu	Ile	Ser
						200				205					210
35	Glu	Gln	Glu	Ala	Ser	Gln	Arg	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Glu	Thr	Ile
						215				220					225
40	Arg	Asp	Leu	Thr	Gln	Arg	Leu	Lys	Asp	Ala	Glu	Asn	Arg	Ala	Ser
						230				235					240
45	Glu	Ala	Glu	Arg	Thr	Val	Ser	Lys	Leu	Gln	Lys	Glu	Val	Asp	Arg
						245				250					255
50	Leu	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Ala	Glu	Lys	Glu	Arg	Tyr	Lys	Ala	Thr
						260				265					270
55	Ser	Asp	Glu	Leu	Asp	Ser	Thr	Phe	Ala	Glu	Leu	Ala	Gly	Tyr	
						275				280					
60															

REIVINDICACIONES

1. Moléculas de ADN recombinante **caracterizadas** porque codifican para un polipéptido que tiene al menos un epítipo del alérgeno tropomiosina de animales invertebrados.

5 2. Moléculas de ADN recombinante, según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque codifican para un polipéptido que tiene al menos un epítipo del alérgeno tropomiosina de insectos.

3. Moléculas de ADN recombinante, según la reivindicación 2, **caracterizadas** porque codifican para un polipéptido que tiene al menos un epítipo del alérgeno tropomiosina de cucaracha americana (*Periplaneta americana*).
10

4. Moléculas de ADN recombinante, según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque codifican para un polipéptido que tiene al menos un epítipo del alérgeno tropomiosina de arácnidos.

15 5. Moléculas de ADN recombinante, según la reivindicación 4, **caracterizadas** porque codifican para un polipéptido que tiene al menos un epítipo del alérgeno tropomiosina del ácaro del polvo (*Dermatophagoides pteronyssinus*).

20 6. Moléculas de ADN recombinante, según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque codifican para un polipéptido que tiene al menos un epítipo del alérgeno tropomiosina de moluscos.

7. Moléculas de ADN recombinante, según la reivindicación 6, **caracterizadas** porque codifican para un polipéptido que tiene al menos un epítipo del alérgeno tropomiosina del caracol terrestre (*Helix aspersa*).
25

8. Molécula de ADN recombinante, según la reivindicación 5, **caracterizada** por ser un fragmento de 855 nucleótidos de ADNc proveniente de ARNm de *Dermatophagoides pteronyssinus* con la SEQ ID NO:1.

30 9. Molécula de ADN recombinante, según la reivindicación 3, **caracterizada** por ser un fragmento de 855 nucleótidos de ADNc proveniente de ARNm de *Periplaneta americana* con la SEQ ID NO:3.

10. Molécula de ADN recombinante, según la reivindicación 7, **caracterizada** por ser un fragmento de 855 nucleótidos de ADNc proveniente de ARNm de *Helix aspersa* con la SEQ ID NO:5.
35

11. Moléculas polipeptídicas recombinantes del alérgeno de tropomiosina, útiles para el diagnóstico y tratamiento de alergias provocadas por dicho alérgeno, **caracterizadas** porque contienen al menos un epítipo del alérgeno tropomiosina de animales invertebrados.

40 12. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 11, **caracterizada** por ser un fragmento de 284 aminoácidos proveniente de la SEQ ID NO 1 de *Dermatophagoides pteronyssinus*, correspondiente a la SEQ ID No. 2.

45 13. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 11, **caracterizada** por ser un fragmento de 284 aminoácidos proveniente de la SEQ ID NO 3 de *Periplaneta americana*, correspondiente a la SEQ ID No. 4.

14. Molécula polipeptídica recombinante, según la reivindicación 11, **caracterizada** por ser un fragmento de 284 aminoácidos proveniente de la SEQ ID NO 5 de *Helix aspersa*, correspondiente a la SEQ ID No. 6.
50

15. Un organismo hospedador, tanto eucariota como procariota, transformado con un vehículo de expresión capaz, en dicho organismo, de autorreplicarse para expresar el ADN de las reivindicaciones 1 a 10 para producir los polipéptidos indicados en las reivindicaciones 11 a 14.
55

16. Un organismo hospedador, según la reivindicación 15, **caracterizado** por ser *Escherichia coli*.

17. Un método para producir un polipéptido que contenga al menos un epítipo del alérgeno tropomiosina, que implica el cultivo de un organismo hospedador conteniendo el vehículo de expresión microbiano, que en dicho organismo se autorreplique y sirva para expresar el ADN de las reivindicaciones 1 a 10.
60

18. Un preparado que contenga un polipéptido con al menos una de las secuencias correspondientes

a las SEQ ID NO. 2, 4 y 6.

19. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 14 para el diagnóstico *in vitro* de alergias relacionadas con el alérgeno, tropomiosina.

5

20. Aplicación de las moléculas recombinantes de las reivindicaciones 1 a 14, para la producción de vacunas destinadas al tratamiento convencional de alergias relacionadas con el alérgeno, tropomiosina.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

1	ATGGAGGCCATCAAGATAAAATCGCAGGCAATGAAGCTCGAAAA	45	451	GCACGTATGATGGCTGAAGATGCTGATAGAAAAATATGATGAAGTT	495
1	MetGluAlaIleLysAsnLysMetGlnAlaMetLysLeuGluLys	15	151	AlaArgMetMetAlaGluAspAlaAspArgLysTyrAspGluVal	165
46	GATAATGCTATCGATCGAGCTGAAATTCGCGAACAAAAAGCCGT	90	496	GCACGTAAATTAGCAATGGTTGAAGCCGATTTAGAACGCTGCTGAA	540
16	AspAsnAlaIleAspArgAlaGluIleAlaGluGlnLysAlaArg	30	166	AlaArgLysLeuAlaMetValGluAlaAspLeuGluArgAlaGlu	180
91	GATGCTAATCTTCGTGCTGAAAAAGTCCGGAAGAAGTACGTGCA	135	541	GAACGTGCCGAAACTGGTGAATCGAAAAATTGTGGAACCTGAGGAA	585
31	AspAlaAsnLeuArgAlaGluLysSerGluGluValArgAla	45	181	GluArgAlaGluThrGlyGluSerLysIleValGluLeuGluGlu	195
136	TTACAGAAAAAATCCAAACAAATCAGAAATGAATTCGATCAGTT	180	586	GAATTACGTGTTGTTGGTAAATAATCTAAAAATCATTGGAAGTTAGT	630
46	LeuGlnLysLysIleGlnGlnIleGluAsnGluLeuAspGlnVal	60	196	GluLeuArgValValGlyAsnAsnLeuLysSerLeuGluValSer	210
181	CAAGAAACAATATCGGTCGCCAATACAAAATTTGGAAGAAAGGAA	225	631	GAAGAAAAAGCACAAACACCTGAAGAAGCACATGAACACAGATC	675
61	GlnGluGlnLeuSerAlaAlaAsnThrLysLeuGluGluLysGlu	75	211	GluGluLysAlaGlnGlnArgGluGluAlaHisGluGlnGlnIle	225
226	AAAGCCCTGCAAACTGCTGAAGGTGATGTTGCAGCATTTGAATCGT	270	676	CCTATTATGACAAACCAAACTTAAGAAGCTGAAGCACGCTGCTGAA	720
76	LysAlaLeuGlnThrAlaGluGlyAspValAlaAlaLeuAsnArg	90	226	ArgIleMetThrThrLysLeuLysGluAlaGluAlaArgAlaGlu	240
271	CGTATTCAATTGATCGAAGAAGATTGGAACGATCAGAAGAAGCA	315	721	TTCGCTGAACGATCAGTGCAAAAATAACAAAAAAGAGTTGGTCGT	765
91	ArgIleGlnLeuIleGluGluAspLeuGluArgSerGluGluArg	105	241	PheAlaGluArgSerValGlnLysLeuGlnLysGluValGlyArg	255
316	CTTAAATTCGAACAGCTAAATTTGGAAGAAGCATCACAATCTGCC	360	766	TTGGAAGATGAATTTGGTCCCATGAAAAGGAAAAATATAATCCATT	810
106	LeuLysIleAlaThrAlaLysLeuGluGluAlaSerGlnSerAla	120	256	LeuGluAspGluLeuValHisGluLysGluLysTyrLysSerIle	270
361	GATGAATCTGAACGTATGCGAAAAATGTTGGAACATCGTTCCATT	405	811	TCCGATGAATTTGGACCAACAACTTTGCCGAACCTTACTGGTTATTAA	855
121	AspGluSerGluArgMetArgLysMetLeuGluHisArgSerIle	135	271	SerAspGluLeuAspGlnThrPheAlaGluLeuThrGlyTyrEnd	285
406	ACCGATGAAGAACGAATGGAAGGTTTGGAAAAATCAATTAAGAA	450			
136	ThrAspGluGluArgMetGluGlyLeuGluAsnGlnLeuLysGlu	150			

Fig. 1

1	ATGATGCTATCAAGAAGAGATGCAGGCGATGAAGCTGAGAAG	45	451	GCCAGTTTCATGGCTGAAGACGACACAAAAATATGATGAGGTT	495
1	MetAspAlaIleLysLysLysMetGlnAlaMetLysLeuGluLys	15	151	AlaArgPheMetAlaGluGluAlaAspLysLysTyraaspGluVal	165
46	GACACCGGATGGACTGGCCCTTCTCTGCGAGAGCAGGCCCGC	90	496	GCACGTAAGTTGGCCATGGTTGAGGCCGACTTGGAGAGACAGAG	540
16	AspAsnAlaMetAspCysAlaLeuLeuCysGluGlnGlnAlaArg	30	166	AlaArgLysLeuAlaMetValGluAlaAspLeuGluArgAlaGlu	180
91	GACGCCAACCTTAGGCCCGAGAGGCTGAGGAGGAGGCCGCTCC	135	541	GAACGTGCCGAGAGTGGTGAATCCAAAAATTTAGAGCTTGAGGAG	585
31	AspAlaAsnLeuArgAlaGluLysAlaGluGluGluAlaArgSer	45	181	GluArgAlaGluSerGlyGluSerLysIleValGluLeuGluGlu	195
136	CTGCAAGAAGATCCAGCAGATTGAGAACGATCTGGATCAGACC	180	586	GAGTCCGTGTTGTCGGCAACAACCTGAAGTCCCTTGAGGTGCT	630
46	LeuGlnLysLysIleGlnGlnIleGluAsnAspLeuAspGlnThr	60	196	GluLeuArgValValGlyAsnAsnLeuLysSerLeuGluValSer	210
181	ATGGAGCAGCTGATGCAGGTCAAGCCCAAGCTGGAGAGAGGAC	225	631	GAGGAGAAGGCCCAACCTGCTGAAAGAGAGTACAAGACAGCAGATT	675
61	MetGluGlnLeuMetGlnValAsnAlaLysLeuAspGluLysAsp	75	211	GluGluLysAlaAsnLeuArgGluGluGluTyrLysGlnGlnIle	225
226	AAGGCCCTCCAGAACGCTGAGAGTGAAGTTGCTGCCCTGAACCGC	270	676	AAGACCTTGACTACAGGCTAAAGGAGGCTGAGGCCCTGCTGAG	720
76	LysAlaLeuGlnAsnAlaGluSerGluValAlaAlaLeuAsnArg	90	226	LysThrLeuThrThrArgLeuLysGluAlaGluAlaArgAlaGlu	240
271	CGTATCCAGCTGTAGAGGAGGACCTCGAGAGGTTCTGAGGACGA	315	721	TTCGCTGAGAGGTCCTGCGACAAAGCTGCAGAGGAGGTTGACAGG	765
91	ArgIleGlnLeuLeuGluGluAspLeuGluArgSerGluGluArg	105	241	PheAlaGluArgSerValGlnLysLeuGlnLysGluValAspArg	255
316	TTGGCCACTGCCACTGCCAACTGCCCGAGGCTTCACAGGCTGTC	360	766	CTTGAGGATGAATGGTACACGAGAGGAGAGTACAAGTTCAATT	810
106	LeuAlaThrAlaThrAlaLysLeuAlaGluAlaSerGlnAlaVal	120	256	LeuGluAspGluLeuValHisGluLysGluLysTyrLysPheIle	270
361	GATGAATCCGAGCGAGCCCGTAAATCTTGAATCCAAGGGCGCTG	405	811	TGTGATGATCTTGATATGACTTTCACCGAACTTGCTGGTTACTAA	855
121	AspGluSerGluArgAlaArgLysIleLeuGluSerLysGlyLeu	135	271	CysAspAspLeuAspMetThrPheThrGluLeuAlaGlyTyrEnd	285
406	GCGGATGAAGAAGCATGGACGCGCTGGAGAACCAAGCTGAAGGAG	450			
136	AlaAspGluGluArgMetAspAlaLeuGluAsnGlnLeuLysGlu	150			

Fig. 2

1	ATGATGCTATCAAGAAGAGATGTTGGCCATGAAAAATCGAGAAG	45	451	GCTAAATACATCGCCAGGATGCTGAGCGCAAAATTCGATGAGGCT	495
1	MetAspAlaIleLysLysLysMetLeuAlaMetLysMetGluLys	15	151	AlaLysTyrIleAlaGluAspAlaGluArgLysPheAspGluAla	165
46	GAAATGCCTTGGATAGGGCAGAACAAGGTGGAGCAGAAGTCCGA	90	496	GCTCGTAAACTGGCCATCACAGAGGTGGATCTCGAGAGAGCTGAG	540
16	GluAsnAlaLeuAspArgAlaGluGlnValGluGlnLysLeuArg	30	166	AlaArgLysLeuAlaIleThrGluValAspLeuGluArgAlaGlu	180
91	GACTGCGAGTGAATAAGAACCAAGGTGGAAGACATCTGAACAAC	135	541	GCCGTTTGGAGGCTGCTGAGGGCGAAGATCCTTGAGTTGGAGGAG	585
31	AspCysGluCysAsnLysAsnLysValGluGluAspLeuAsnAsn	45	181	AlaArgLeuGluAlaAlaGluAlaLysIleLeuGluLeuGluGlu	195
136	CTACAAAAGAAATTCGCCATCTTGGAGAACGACTTCGACAGCATC	180	586	GAGTTGAAGGTGCTCGGGCAACAATATGAAATCTTTGGAATCAGT	630
46	LeuGlnLysLysPheAlaIleLeuGluAsnAspPheAspSerIle	60	196	GluLeuLysValValGlyAsnAsnMetLysSerLeuGluIleSer	210
181	AACGAGCAGTTGCTTGATGCCAACACCAACTTGAGGCATCCGAG	225	631	GAACAAGAGGCATCCCAGAGAGAGGATAGCTACGAAGAGACGATC	675
61	AsnGluGlnLeuLeuAspAlaAsnThrLysLeuGluAlaSerGlu	75	211	GluGlnGluAlaSerGlnArgGluAspSerTyrGluGluThrIle	225
226	AAGAGAATGCAGAGATTGAAAGTGAGACAGCAGGTCTGCAAGA	270	676	CGTACTTGACCCAGAGGCTCAAGGACGCCGAGAAATCGTGCCAGC	720
76	LysLysAsnAlaGluIleGluSerGluThrAlaGlyLeuGlnArg	90	226	ArgAspLeuThrGlnArgLeuLysAspAlaGluAsnArgAlaSer	240
271	CGTATCCAGTCTCTGGAGGAGGACTTGGAGAGTTCAGAAGACCGT	315	721	GAGGCTGAGCGCACAGTGTCCAACTACAGAAAGAGGTGGACAGA	765
91	ArgIleGlnLeuLeuGluGluAspLeuGluArgSerGluGluArg	105	241	GluAlaGluArgThrValSerLysLeuGlnLysGluValAspArg	255
316	CTTCAGAGTGCACAGAGAAAGTTGGAAGAGGCATCTAAAGCTGCT	360	766	TTGGAACACGAAATGCTGGCAGAGAGAAAGAGATACAAAGCTACT	810
106	LeuGlnSerAlaThrGluLysLeuGluGluAlaSerLysAlaAla	120	256	LeuGluAspGluLeuLeuAlaGluLysGluArgTyrLysAlaThr	270
361	GATGAAAGTGAAGAGGTCGTAAGGTGCTTGAGAGCAGGAGCTTG	405	811	TCAGACGAACCTGGATAGTACATTTGCCGAACCTGGCTGGCTACTAA	855
121	AspGluSerGluArgGlyArgLysValLeuGluSerArgSerLeu	135	271	SerAspGluLeuAspSerThrPheAlaGluLeuAlaGlyTyrEnd	285
406	GCTGATGATGAACGATTGGATGGTCTTGAGGCTCAGTTGAAAGAA	450			
136	AlaAspAspGluArgLeuAspGlyLeuGluAlaGlnLeuLysGlu	150			

Fig. 3

1	50	100
CR	1	100
fruitfly	-MDAIIKKM	Q
Helix	...VD..G..L	ER..V..E..
mite	...M..E..L	R.EQV..KL
shrimp	...E..N...	I
snail	---EFCGR	...R.DTL..N
mussel	...M..E..I	R.EQM..KV
nematode	...M..E..L	R.EQL..KL
chicken	...I..L	R.DAA.EKV
human	ML..D.E..L	R.EQA.ADK
	ML..D.E..L	R.EQA.AEQ
	::	
CR	101	150
fruitfly	ERSEERLATA	TAKLAASQA
Helix	...GS...	A...
mite	...QS...	E.E..K..A...
shrimp	...KI...	E..S..A...
snail	...N...	T...A...
mussel	...QS...	E.E..K..A...
nematode	...YT...	AS..E..K..A...
chicken	...KI...	E..E..THN
human	D.AQ.....	LQ..E..EK..A...
	D.AQ.....	LQ..E..EK..A...
	::	
CR	201	250
fruitfly	VGNILKSLEV	SEKANLREE
Helix	...M..I	...QE.SQ..D
mite	...Q...	Q...
shrimp	...Q...	Q...
snail	...I	...QE.SQ..D
mussel	...A.I.T.Q.	QNDQ.SQ..D
nematode	...LQ..D	S.EE..R.VS
chicken	...QA..YSQK..D	K.EEE..V..
human	...QA..YSQK..D	K.EEE..I..
	::	
CR	286	286
fruitfly	VGNILKSLEV	SEKANLREE
Helix	...M..I	...QE.SQ..D
mite	...Q...	Q...
shrimp	...Q...	Q...
snail	...I	...QE.SQ..D
mussel	...A.I.T.Q.	QNDQ.SQ..D
nematode	...LQ..D	S.EE..R.VS
chicken	...QA..YSQK..D	K.EEE..V..
human	...QA..YSQK..D	K.EEE..I..
	::	

Fig. 4

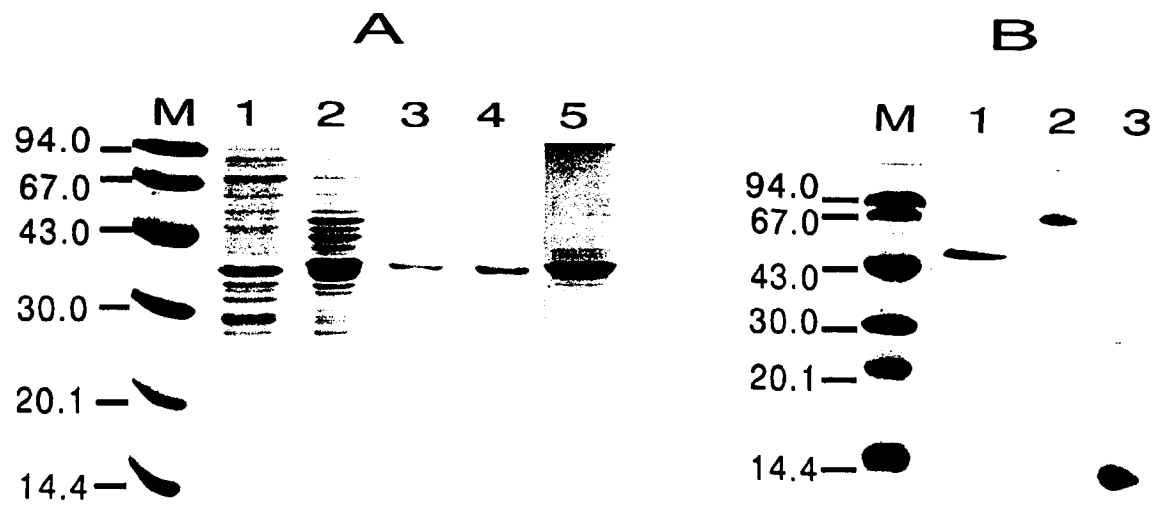


Fig. 5

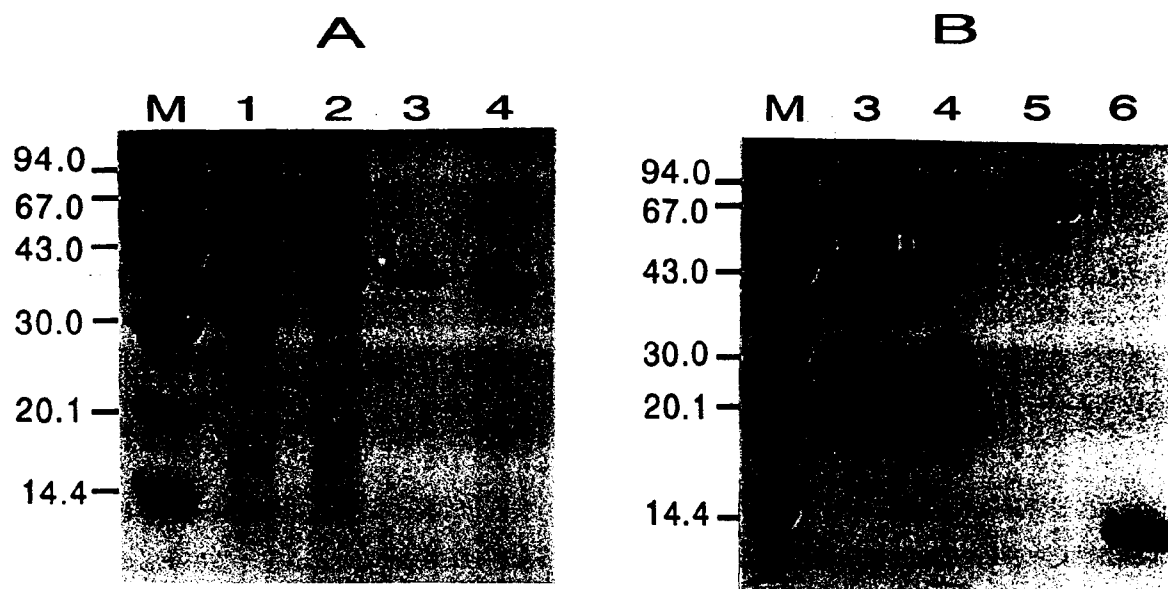


Fig. 6

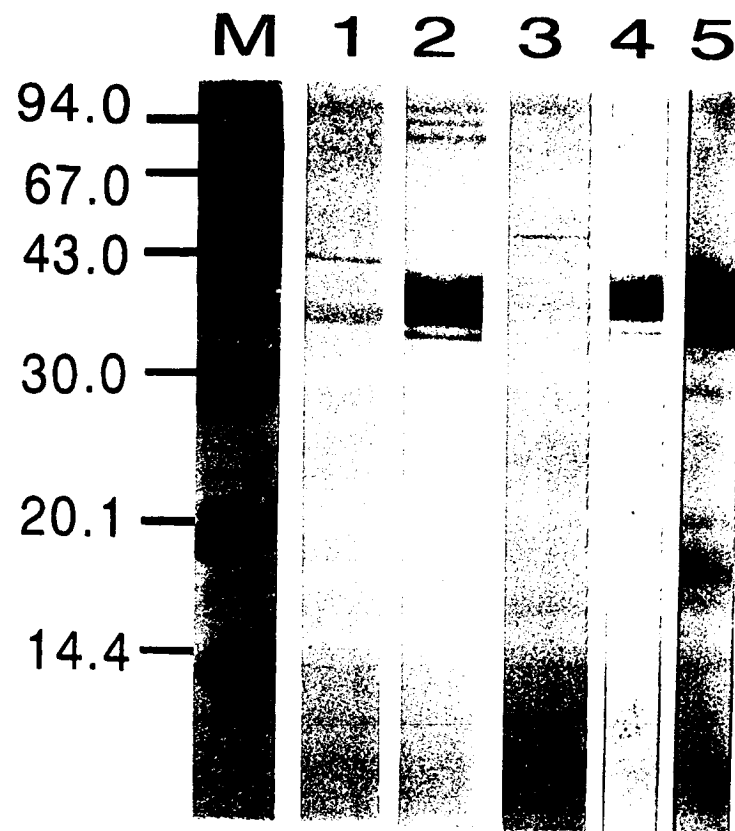


Fig. 7

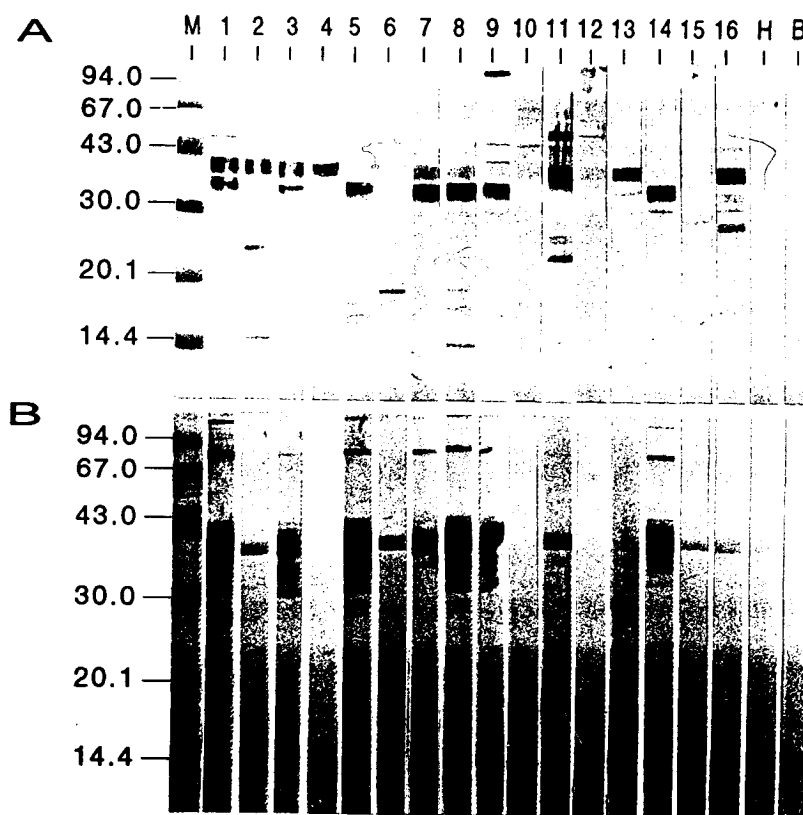


Fig. 8

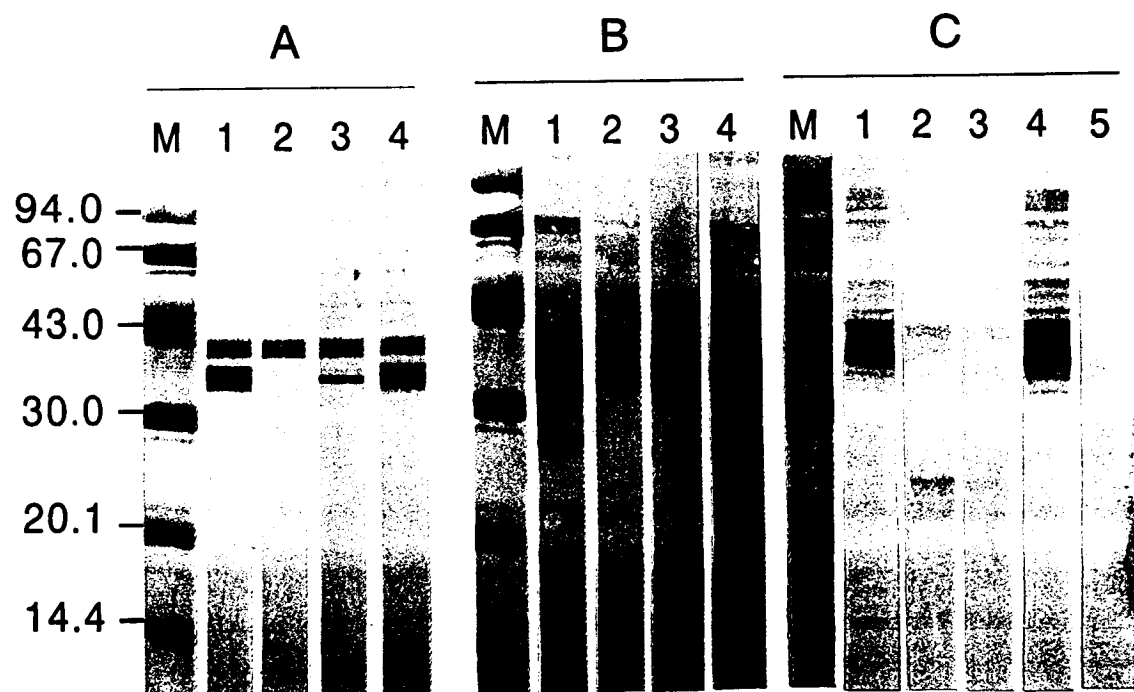


Fig. 9

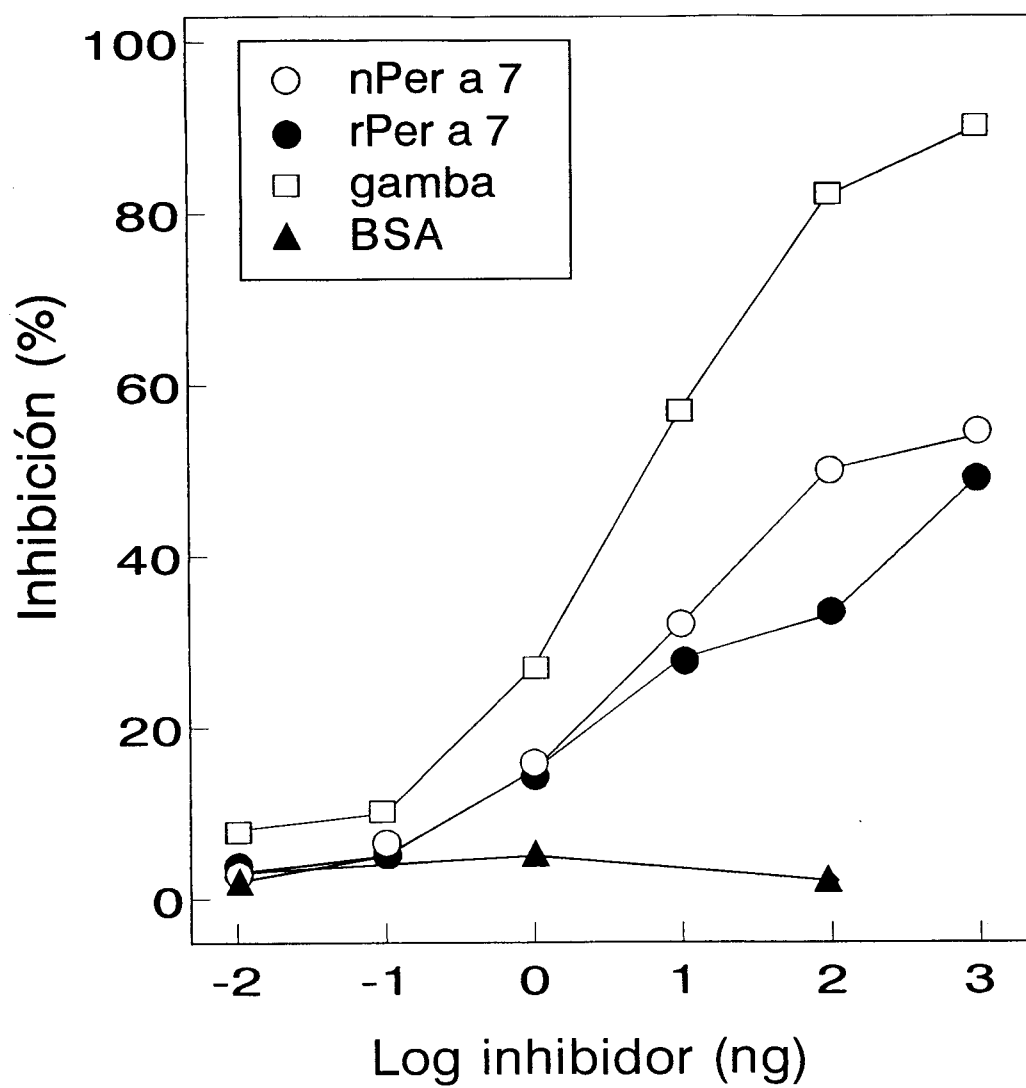


Fig. 10



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 147 539
⑫ N.º solicitud: 009900301
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 15.02.1999
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C12N 15/12, C07K 14/435, C12N 15/63, 15/79

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ASTURIAS J.A. et al.: "Recombinant tropomyosin from American cockroach". En: Annual Meeting of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Birmingham, England, UK, Junio 21-26, 1998. European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Allergy. 1998. Vol. 53 (43). Páginas 29-30.	1-3,9,11, 13,15-17, 18-20
X	ASTURIAS J.A. et al.: "Sequencing and high level expression in Escherichia coli of the tropomyosin allergen (Der p 10) from Dermatophagoides pteronyssius". 1 Abril 1998. Biochimica et Biophysica Acta. Vol. 1397. N.º 1. Páginas 27-30.	1,2,4,5, 8,11,12, 15-20
X	TSUNEHIRO AKI et al.: "Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite, Dermatophagoides farinae". 1995. Journal of Allergy and Clinical Immunology. Vol. 96 (1). Páginas 74-83.	1,2,4,11, 15-19
X	XU H. et al.: "Schistosoma-mansoni tropomyosin production and purification of the recombinant protein and studies on its immunodiagnostic potential". 1991. Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 45 (1). Páginas 121-131.	1,11, 15-20
X	G REESE et al.: "Characterization of recombinant shrimp allergen Pen a 1 (Tropomyosin)". 1997. International Archives of Allergy and Immunology. Vol. 113, N.º 1-3. Páginas 240-242.	1,2,11, 17,18,19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

05.04.2000

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1