



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 294 935**

② Número de solicitud: 200601879

⑤ Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/18 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **13.07.2006**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2008**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.04.2008

⑦ Solicitante/s:
Universidade de Santiago de Compostela
Edif. CACTUS-CITT, Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

⑦ Inventor/es: **Martínez Ubeira, Florencio y**
Gárate Ormaechea, María Teresa

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Secuencias peptídicas y nucleotídicas de *Anisakis* spp., anticuerpos que reconocen dichas secuencias, y usos de los mismos.**

⑤ Resumen:

Secuencias peptídicas y nucleotídicas de *Anisakis* spp., anticuerpos que reconocen dichas secuencias, y usos de los mismos. En la presente invención se proporcionan secuencias de péptidos, polipéptidos y proteínas que mantienen la antigenicidad de las moléculas nativas de *Anisakis* de las que derivan, así como los ácidos nucleicos que codifican dichas secuencias y anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos para dichos péptidos, polipéptidos o proteínas. Los péptidos, polipéptidos y proteínas descritos, así como los anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a dichos péptidos, polipéptidos y proteínas son útiles para desarrollar inmunoensayos para el serodiagnóstico de la anisakiosis humana y animal.

ES 2 294 935 A1

DESCRIPCIÓN

Secuencias peptídicas y nucleotídicas de *Anisakis* spp., anticuerpos que reconocen dichas secuencias, y usos de los mismos.

Esta invención se refiere al campo del diagnóstico, prevención y terapia de infecciones humanas y animales por especies del género *Anisakis*. Esta invención también se refiere a la detección de antígenos de *Anisakis* en alimentos.

10 **Antecedentes de la invención**

El género *Anisakis* (familia *Anisakidae*) incluye parásitos nematodos que pertenecen a varias especies relacionadas. Mediante el uso de marcadores morfológicos y genéticos/moleculares actualmente se reconocen 8 especies de *Anisakis* entre las que se incluyen: a) las especies gemelas *Anisakis simplex* “en sentido estricto” (Rudolphi, 1809), *A. pegreffii* (Campana-Rouget y Biocca, 1955) y *A. simplex* C (Nascetti *et al.*, 1986, Mattiucci *et al.*, 2002), antiguamente incluidas en el complejo *A. simplex*; b) *A. typica* (Diesing, 1860); c) *A. physeteris* (Baylis, 1923); d) *A. brevispiculata* (Dollfus, 1966); e) *A. ziphidarum* (Paggi *et al.*, 1998); y f) *A. paggiae* (Mattiucci *et al.* 2005).

Las especies de *Anisakis* alcanzan la madurez sexual en el estómago de cetáceos y, menos frecuentemente, en pinípedos. Estos mamíferos pueden infectarse por ingestión de a) hospedadores paraténicos, es decir, peces (principalmente teleosteos) y cefalópodos (principalmente calamares), que albergan la tercera fase larvaria del parásito (L3), y b) por ingestión de krill, como intermedio, que también alberga las larvas L3 (por ejemplo, ballenas).

Al igual que los mamíferos marinos, los seres humanos también pueden infectarse por larvas L3 de *Anisakis* mediante la ingestión de peces y calamares crudos portadores del parásito, lo cual produce una enfermedad clínica denominada anisakiosis o anisakiasis. Con mucha frecuencia, varios platos de pescado se consideran de alto riesgo para la infección con especies de *Anisakis*. Estos incluyen el sushi y el sashimi japonés, el arenque salteado o ahumado alemán, el gravlax escandinavo, el lomi-lomi hawaiano, el cebiche sudamericano y los boquerones en vinagre españoles (“pickled anchovies”).

Cuando las larvas L3 de *Anisakis* infectan a seres humanos, a menudo causan síntomas gastrointestinales que pueden estar asociados con reacciones alérgicas de distinta gravedad. Dependiendo de la localización de las larvas y los síntomas dominantes, se han presentado cuatro formas clínicas principales de anisakiosis (gástrica/gastroalérgica, intestinal, extragastrointestinal y alérgica) en seres humanos. En la forma gástrica (aguda) de anisakiosis, la larva penetra la pared gástrica y frecuentemente se observa un curso clínico caracterizado por dolor epigástrico agudo, náuseas y vómitos unas pocas horas después de la ingestión de pescado que contenga larvas de *Anisakis* L3 vivas. Los estudios endoscópicos frecuentemente revelan lesiones consistentes en hemorragias puntiformes, petequias y erosión en el sitio de penetración. Además, también pueden observarse síntomas alérgicos (es decir, urticaria/angioedema y algunas veces anafilaxis) en aproximadamente el 10% de los casos. La combinación de infección gástrica y síntomas alérgicos se denominó “anisakiosis gastroalérgica” (Daschner *et al.*, 2000). Algunos pacientes pueden desarrollar una forma subaguda o crónica cuyas manifestaciones clínicas incluyen dolor epigástrico, dispepsia, vómitos y anorexia, que puede persistir durante varios meses o incluso años.

En la forma intestinal de la anisakiosis, la larva penetra en la pared intestinal, frecuentemente a nivel del fleon terminal. En los casos agudos, a menudo se observan la presencia de dolor abdominal (habitualmente 24-48 horas después de la ingestión del pescado contaminado), acompañado de náuseas, vómitos, hinchazón abdominal, induración y desviación del ritmo intestinal establecido con estreñimiento o diarrea. La observación macroscópica de los tejidos infectados en caso de anisakiosis intestinal revela lesiones flemonosas caracterizadas por edema local intenso, petequias, hiperemia e inflamación difusa de la serosa y el mesenterio. Estas lesiones pueden ocasionar obstrucción y dilatación proximal del intestino. En una cantidad importante de pacientes, se puede encontrar líquido ascítico abdominal con un alto contenido de eosinófilos. En la anisakiosis intestinal subaguda o crónica, los cambios granulomatosos inducidos por las larvas conducen a un engrosamiento de la pared, estenosis luminal y síntomas abdominales crónicos.

En la forma extragastrointestinal o ectópica, la larva infectante de *Anisakis* atraviesa la pared gastrointestinal, alcanzando la cavidad abdominal y migrando a órganos y tejidos tales como pulmones, páncreas, hígado, etc. En estos casos, los síntomas clínicos dependen de la localización topográfica de la larva.

La forma de anisakiosis alérgica se reserva a pacientes que tienen reacciones alérgicas después de la infección con larvas de *Anisakis*, pero sin síntomas gástricos ni intestinales. Frecuentemente, los primeros síntomas aparecen muy pronto, en las primeras horas después de la ingestión del pescado contaminado y el transcurso clínico sigue el patrón general para las reacciones alérgicas de tipo I. Su gravedad varía desde una simple urticaria o angioedema a shock anafiláctico.

Cuando las larvas de *Anisakis* están presentes en el estómago, duodeno o colon, el examen endoscópico es el método preferible para demostrar la infección. Esta técnica también es útil para extraer las larvas por medio de las pinzas asociadas al endoscopio, lo cual conduce a la curación del paciente. No obstante, cuando: a) las larvas no están accesibles para el examen endoscópico; b) las larvas están parcialmente destruidas o no son visibles para el

endoscopista; o c) los síntomas predominantes son alérgicos, el método preferible para confirmar la infección es demostrar la presencia de anticuerpos específicos en el suero del paciente. Este último también es el método preferido para demostrar infecciones previas por *Anisakis* en individuos asintomáticos.

5 Entre las diferentes clases de anticuerpos que se producen contra antígenos de *Anisakis* durante la infección, los anticuerpos IgE son los más relevantes ya que: 1) están implicados en las reacciones alérgicas de tipo I observadas durante infecciones con *Anisakis*, y b) ésta es la clase de inmunoglobulinas más relevante en términos de especificidad entre las que están presentes en suero de pacientes infectados.

10 Desde la descripción del primer caso de infección humana por una larva de *Anisakis* (Van Thiel, 1960), se han hecho numerosos intentos de desarrollar un ensayo serológico sensible y específico para detectar anticuerpos anti-*Anisakis* de diferentes clases.

15 Los primeros métodos para medir anticuerpos anti-*Anisakis* en suero incluyeron aglutinación del látex (Akao y Yoshimura, 1989); inmunodifusión doble e inmunolectroforesis (Petithory *et al.*, 1986; Tsuji, 1990), hemaglutinación indirecta (Ashaishi *et al.*, 1989; Tsuji, 1989); y ensayo de fijación del complemento (Oshima, 1972; Tsuji, 1989). Todos estos métodos tienen dos inconvenientes principales: a) carecen de suficiente sensibilidad y especificidad y b) con estas técnicas no es posible la determinación de anticuerpos IgE (reagínicos).

20 Más recientemente, se pudieron realizar determinaciones de IgE anti-*Anisakis* en sueros de pacientes infectados con la introducción de otros inmunoensayos, por ejemplo, pruebas de radioalergosorbencia (Desowitz *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1990), ensayos de inmunoabsorción vinculada a enzimas (ELISA) (Rodero *et al.* 2002), enzimoimmunoensayos fluorescentes (UniCap FEIA, Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Sweden) e inmunotransferencia (Del Pozo *et al.*, 1996; García *et al.*, 1997), pero también se presentaron problemas de sensibilidad y/o especificidad con estos métodos.

30 La dificultad principal para desarrollar métodos serológicos útiles para el diagnóstico de *Anisakiosis* humana radica en la obtención de antígenos del parásito (en nuestro caso alérgenos) que por una parte (i) sean reconocidos por anticuerpos IgE presentes en los sueros de todos aquellos pacientes infectados, y (ii) que la molécula completa (es decir, todos los epítomos presentes en el alérgeno seleccionado) sean específicos del género *Anisakis*. De otro modo, se obtendría una baja sensibilidad y/o reacciones cruzadas que condujesen a falsos positivos.

35 Se intentó mejorar el serodiagnóstico de anisakiosis humana usando antígenos de excreción/secreción nativos completos (ESA) de larvas de *Anisakis* spp. cultivadas *in vitro* (Poggensee *et al.*, 1989; Baeza *et al.*, 2004), o usando anticuerpos monoclonales para capturar antígenos específicos diana de extractos brutos de larvas L3 de *Anisakis* (Yagihashi *et al.*, 1990; Ubeira e Iglesias, 2000). Sin embargo, los métodos ELISA basados en estas estrategias también carecían de suficiente especificidad debido a la presencia de epítomos de reacción cruzada (principalmente O- y N-glicanos) presentes en las glicoproteínas de *Anisakis*, incluyendo ESA.

40 Descripción de la invención

En la presente invención se proporcionan secuencias de péptidos, polipéptidos y proteínas que mantienen la antigenicidad de las moléculas nativas de *Anisakis* de las que derivan, así como los ácidos nucleicos que codifican dichas secuencias y anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos para dichos péptidos, polipéptidos o proteínas. Los péptidos, polipéptidos y proteínas descritos, así como los anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a dichos péptidos, polipéptidos y proteínas son útiles para desarrollar inmunoensayos para el serodiagnóstico de la anisakiosis humana y animal, careciendo de los inconvenientes de los métodos presentados previamente.

50 De esta manera, un primer aspecto de la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada (denominada en lo sucesivo secuencia de ácido nucleico de la invención) seleccionada entre el siguiente grupo:

- a. Un ácido nucleico que comprende la SEC ID N° 1
- 55 b. Un ácido nucleico que comprende el ácido nucleico complementario de la SEC ID N° 1
- c. Un fragmento del ácido nucleico de la SEC ID N° 1 que comprende la SEC ID N° 15 ó 17
- d. Un ácido nucleico que comprende un fragmento de la SEC ID N° 1 que codifica un tramo contiguo de 8 o
60 más aminoácidos de la SEC ID N° 2 capaz de ser reconocida por anticuerpos anti-*Anisakis*.
- e. Un ácido nucleico que comprende un fragmento de la SEC ID N° 1 que codifica un tramo contiguo de 10 o más aminoácidos de la SEC ID N° 2 capaz de ser reconocida por anticuerpos anti-*Anisakis*.
- 65 f. Un ácido nucleico que comprende un fragmento de la SEC ID N° 1 que codifica un tramo contiguo de 12 o más aminoácidos de la SEC ID N° 2 capaz de ser reconocida por anticuerpos anti-*anisakis*.

ES 2 294 935 A1

- g. Una secuencia nucleotídica que tiene una identidad de al menos el 70% con cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas en los apartados (a) a (f). En una realización preferida de la invención, la secuencia nucleotídica tiene una identidad de al menos el 80% con cualquiera de las secuencias de ácido nucleico mencionadas previamente en los apartados (a) a (f) y, en una realización aún más preferida, dicha secuencia nucleotídica tiene una identidad de al menos el 90% con cualquiera de las secuencias de ácido nucleico mencionadas previamente en los apartados (a) a (f).

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un polipéptido, péptido o proteína aislada (denominada en lo sucesivo secuencia de aminoácidos de la invención) seleccionada entre el siguiente grupo:

- a. Un polipéptido que comprende la SEC ID N° 2
- b. Un fragmento de la SEC ID N° 2 que comprende la SEC ID N° 16 ó 18
- c. Un fragmento de la SEC ID N° 2 que comprende un tramo contiguo de 8 o más aminoácidos capaz de ser reconocido por anticuerpos anti-*Anisakis*.
- d. Un fragmento de la SEC ID N° 2 que comprende un tramo contiguo de 10 o más aminoácidos capaz de ser reconocido por anticuerpos anti-*Anisakis*.
- e. Un fragmento de la SEC ID N° 2 que comprende un tramo contiguo de 12 o más aminoácidos capaz de ser reconocido por anticuerpos anti-*anisakis*.
- f. Una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 70% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en los apartados (a) a (e) en este punto. En una realización preferida de la invención, la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 80% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas previamente en los apartados (a) a (e) en este punto y, en una realización aún más preferida, dicha secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 90% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas previamente en los apartados (a) a (e) en este punto.

Todos estos péptidos, polipéptidos o proteínas pueden ser empleados para superar la dificultad principal de desarrollar métodos serológicos útiles para el diagnóstico de la anisakiosis humana, al proporcionar antígenos del parásito específicos del género *Anisakis* y que son reconocidos por los anticuerpos IgE presentes en los sueros de todos los pacientes infectados por *Anisakis*.

Una realización preferida de la invención se refiere a una secuencia de aminoácidos que pueda ser reconocido por anticuerpos anti-*Anisakis* y que comprenda un fragmento con un tramo contiguo de al menos 8 o más aminoácidos y con una identidad de al menos el 70% con cualquier fragmento de la SEC ID N° 2, seleccionado de entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

- a. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 7
- b. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 8
- c. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 9
- d. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 10
- e. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 11
- f. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 12
- g. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 13
- h. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 14

En un tercer aspecto, la secuencia de aminoácidos de la invención se produce, pero sin limitamos a cualquiera de las siguientes técnicas:

- a. Técnicas recombinantes
- b. Síntesis química y
- c. Purificación sustancial a partir de nematodos de la familia *Anisakidae*

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un péptido, polipéptido o proteína que comprende dos o más de las secuencias de aminoácidos de la invención.

ES 2 294 935 A1

Un quinto aspecto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico sintética o recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos de la invención.

5 Un sexto aspecto de la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico o aminoácidos aislada de la invención, marcada con una molécula de señalización. En una realización preferida de la invención, dicha molécula marcadora se selecciona, pero sin limitamos a cualquiera de las moléculas de señalización del siguiente grupo:

10 a. Radiactivas

b. Enzimáticas

c. Fluorescentes

15 d. Luminiscentes

e. Quimioluminiscentes

20 f. Coloreadas

En una realización preferida de la invención, la molécula de marcaje se selecciona, pero sin limitamos a cualquiera de las moléculas de señalización del siguiente grupo:

25 a. Biotina o sus derivados

b. Derivados de nitrofenol

c. Oro coloidal

30 d. Látex

e. Fluoresceína

35 Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo (denominado en lo sucesivo anticuerpo de la invención) capaz de interactuar con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la invención. También forman parte de la presente invención las secuencias de ácido nucleico capaces de codificar cualquiera de los anticuerpos de la invención.

40 En una realización preferida, dicho anticuerpo de la invención es el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma con el número de depósito DSM ACC2793 depositado el 15 de junio de 2006 en el "German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ)" (de aquí en adelante anticuerpo UA3)

Una realización adicional se refiere a la línea celular de hibridoma con número de depósito DSM ACC2793 con fecha de depósito 15 de junio de 2006 depositada en la institución DSMZ.

45 Una realización adicional de la invención se refiere a las secuencias de reconocimiento de antígenos de cualquiera de los anticuerpos de la invención, particularmente las secuencias de reconocimiento de antígenos del anticuerpo UA3.

50 Otro aspecto de la invención proporciona una secuencia de aminoácidos aislada de la invención, donde dicha secuencia de aminoácidos está fusionada o acoplada químicamente a un péptido, polipéptido o proteína adicional.

Otro aspecto de la invención se refiere a un vector de expresión o sistema de expresión (denominado en lo sucesivo sistema de expresión de la invención) que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención.

55 Otro aspecto de la invención proporciona una célula hospedadora procariota o eucariota aislada (denominada en lo sucesivo célula hospedadora de la invención) transformada o transfectada con una secuencia de ácido nucleico de la invención o con un vector o sistema de expresión de la invención.

60 Un octavo aspecto de la invención se refiere a un método para producir un péptido, polipéptido o proteína recombinante codificada por una secuencia de ácido nucleico de la invención, donde dicho método comprende cultivar una célula hospedadora de la invención en condiciones tales que se exprese y se produzca dicha secuencia de nucleótidos y después aislar dicho péptido, polipéptido o proteína.

65 Un noveno aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para detectar anticuerpos contra *Anisakis* spp. en una muestra biológica aislada, preferiblemente suero, que comprende:

ES 2 294 935 A1

- a. poner en contacto una muestra biológica con una secuencia de aminoácidos de la invención, en condiciones suficientes como para formar un complejo inmunológico entre dicho polipéptido y los anticuerpos de la muestra, y
- 5 b. detectar dicho complejo inmunológico.

En una realización preferida de la invención, el método *in vitro* es un inmunoensayo o un inmunoensayo enzimático.

10 Un décimo aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para detectar antígenos de *Anisakis* spp. en una muestra, preferiblemente una muestra biológica, o un extracto alimentario, que comprende:

- a. poner en contacto la muestra biológica o extracto alimentario con un anticuerpo de la invención, en condiciones suficientes para formar un complejo inmunológico entre dicho anticuerpo y los antígenos de la muestra y
- 15 b. detectar dicho complejo inmunológico.

20 En una realización preferida, el anticuerpo de la invención que se usa para detectar antígenos de *Anisakis* spp. en una muestra *in vitro* es el anticuerpo UA3.

25 Un aspecto preferido de la invención se refiere a un método *in vivo* para diagnosticar o pronosticar alergia a *Anisakis* spp. en un sujeto, que comprende someter al sujeto al péptido, polipéptido o proteína de la invención y controlar la reacción del sujeto.

Un aspecto aún más preferido del método *in vivo* de la invención para detectar anticuerpos contra *Anisakis* spp. es por medio del uso del ensayo *Prick*.

30 Otro aspecto preferido de la presente invención es un kit (en lo sucesivo kit de la invención) adecuado para la detección de antígenos de *Anisakis* spp. en una muestra biológica o un extracto alimentario, que comprende:

- a) al menos un anticuerpo de la invención o sus fragmentos y
- 35 b) un medio de detección para el complejo inmunológico.

También es un aspecto preferido de la presente invención un kit adecuado para la detección de anticuerpos anti-*Anisakis* spp. en una muestra biológica, preferiblemente suero, que comprende:

- a) al menos un péptido, polipéptido o proteína de la invención y
- 40 b) un medio de detección para el complejo inmunológico.

45 En una realización preferida, el medio de detección usado en el kit de la invención consta de anticuerpos secundarios marcados capaces de reconocer la formación del complejo inmunológico.

En una realización más preferida, el medio de detección usado en el kit de la invención es un reactivo secundario marcado capaz de reconocer la formación del complejo inmunológico.

50 Otro aspecto más de la invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cualquier tipo de reacción alérgica a *Anisakis* spp. Una realización preferida de la invención se refiere a la composición farmacéutica tal cual.

55 Como se usa en este documento, “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refiere a cualquier polímero de nucleótidos compuesto por dos o más subunidades que son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, unidas entre sí por puentes fosfodiéster. “Ácidos nucleicos” o “moléculas de ácido nucleico” incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos y fragmentos generados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por otros métodos tales como ligamiento, escisión, acción de endonucleasas y acción de exonucleasas. Como se usa en este documento, el término “nucleótido” significa una unidad monomérica de ADN o ARN que contiene un resto de azúcar (pentosa), un fosfato y una base heterocíclica nitrogenada. Las cuatro bases del ADN son adenina (‘‘A’’), guanina (‘‘G’’), citosina (‘‘C’’) y timina (‘‘T’’). Las cuatro bases del ARN son A, G, C y uracilo (‘‘U’’).

60 Como se usa en este documento, una “molécula de ácido nucleico aislada” es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Dicha molécula de ácido nucleico puede separarse del ADN genómico de una célula, puede producirse usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, amplificación por PCR, clonación, etc.) o puede sintetizarse químicamente. La molécula de ácido nucleico aislada puede obtenerse de su fuente natural como gen completo o una parte del mismo capaz de formar un híbrido estable con ese gen. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria.

ES 2 294 935 A1

Como se usa en este documento, “cebador” se refiere a un oligonucleótido natural o sintético (que varía preferiblemente de 15 a 40 nucleótidos de longitud) que puede hibridar con un molde de ADN o ARN complementario para formar un dúplex entre el cebador y el molde. Típicamente, un cebador es un oligodesoxirribonucleótido monocatenario, y sirve como punto de inicio de la síntesis de ácido nucleico por una polimerasa después de la hibridación con una cadena de ADN o ARN.

Como se usa en este documento, la expresión “secuencia de nucleótidos que codifica” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que dirige la expresión de un péptido, polipéptido o proteína específica. Las secuencias de ácido nucleico comprenden la secuencia de la cadena de ADN que se transcribe en ARN y también la secuencia de ARN que se traduce en una proteína. Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención incluyen tanto secuencias de ácido nucleico de longitud completa como secuencias truncadas (que no tienen la longitud completa) derivadas de la proteína de longitud completa. También están comprendidas las variantes de la secuencia de nucleótidos que codifican el mismo péptido, polipéptido o proteína que la secuencia nativa, que puede construirse para proporcionar una preferencia de codones en una célula hospedadora específica.

Como se usa en este documento, “el complemento de” se refiere al concepto de una correspondencia inversa entre regiones de dos cadenas polinucleotídicas o entre dos nucleótidos a través de la formación de pares de bases. En consecuencia, una “secuencia de bases complementarias” se refiere a una cadena polinucleotídica en la que todas las bases pueden formar pares de bases con una secuencia de bases en otra cadena polinucleotídica. Como se sabe, un nucleótido de adenina puede formar pares de bases con timina (A-T) o uracilo (A-U), mientras que un nucleótido de citosina puede formar pares de bases con guanina (C-G).

Como se usa en este documento, un “vector de expresión” se refiere a un conjunto que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia o gen de interés. De acuerdo con la presente invención, el vector de expresión puede ser cualquier vector de expresión de ADN o ARN capaz de expresar antígenos de *Anisakis* spp., tal como un plásmido o un fago. Preferiblemente, el vector de expresión de acuerdo con la presente invención es un plásmido (por ejemplo, pQE 31 y pTARGET).

Como se usa en este documento, el término “plásmido” se refiere a cualquier molécula de ADN circular autónoma capaz de replicarse en una célula independientemente del ADN cromosómico, e incluye tanto los tipos de expresión como los tipos de no expresión.

Como se usa en este documento, el término “recombinante” se refiere a una molécula de ADN compuesta preparada fuera de células vivas uniendo artificialmente fragmentos de ADN naturales o sintéticos a moléculas de ADN que pueden replicarse en una célula viva, o moléculas que son el resultado de su replicación. El término “recombinante” también se refiere en este documento a un péptido, polipéptido o una proteína que se expresa usando una molécula de ADN recombinante.

Los términos “polipéptido” y “proteína” se usan de forma indistinta en este documento para designar una secuencia lineal de aminoácidos conectados entre sí por enlaces amida entre el grupo alfa-amino de un aminoácido y un grupo alfa-carboxi del aminoácido adyacente. Los polipéptidos con una longitud de veinticinco aminoácidos o menos se consideran “péptidos”. Preferiblemente, un polipéptido que está codificado por un cistron se considera una “proteína”.

Como se usa en este documento, la expresión “fragmento de la secuencia de aminoácidos” significa una porción de aminoácidos contiguos del péptido, polipéptido, proteína o secuencia de aminoácidos especificada.

Como se usa en este documento, un “péptido, polipéptido o proteína aislada” es un péptido, polipéptido o proteína que está esencialmente exenta de contaminantes celulares, tales como lípidos, carbohidratos u otras impurezas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Un péptido, polipéptido o proteína aislada puede purificarse de su medio natural por técnicas cromatográficas convencionales. Los péptidos, polipéptidos y proteínas aisladas también pueden obtenerse por métodos recombinantes, o por síntesis química. Típicamente, se obtiene un “polipéptido sustancialmente purificado” cuando se separa de al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 75% y aún más preferiblemente al menos el 90% de otros polipéptidos con los que coexiste de forma natural en una célula, tejido u organismo.

Como se usan en este documento, los términos “aminoácido” y “aminoácidos” se refieren a todos los L-alfa-aminoácidos de origen natural o sus restos. La siguiente Tabla (Tabla 1) muestra el código de tres letras y el código de una letra (recomendado por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB) para la denominación de los aminoácidos naturales:

| | | | | | | |
|----|-----|---|-----------------|-----|---|--------------|
| | Asp | D | ácido aspártico | Ile | I | isoleucina |
| | Thr | T | treonina | Leu | L | leucina |
| 5 | Ser | S | serina | Tyr | Y | tirosina |
| | Glu | E | ácido glutámico | Phe | F | fenilalanina |
| | Pro | P | prolina | His | H | histidina |
| | Gly | G | glicina | Lys | K | lisina |
| 10 | Ala | A | alanina | Arg | R | arginina |
| | Cys | C | cisteína | Trp | W | triptófano |
| | Val | V | valina | Gln | Q | glutamina |
| 15 | Met | M | metionina | Asn | N | asparagina |

Como se usa en este documento, el término “mamífero” se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, ratones, ratas, mamíferos marinos y animales domésticos y de granja. Preferiblemente, el mamífero en este documento es el ser humano.

Como se usa en este documento, el término “anticuerpo” se refiere a glicoproteínas de la familia de las inmunoglobulinas, caracterizadas porque tienen propiedades de unión a antígenos, y se producen por células plasmáticas. El término “anticuerpo” incluye anticuerpos tanto monoclonales como policlonales que pertenecen a cualquier clase de anticuerpos, por ejemplo, IgG, IgD, IgM, IgA, IgE o derivados de los mismos.

Como se usa en este documento, la expresión “anticuerpo monoclonal” se refiere a una composición de anticuerpos que tiene una población de anticuerpos homogénea. No pretende limitarse a una fuente particular del anticuerpo o a la forma en la que se produce, e incluye anticuerpos y fragmentos de los mismos producidos por fusión celular o por técnicas recombinantes.

Como se usa en este documento, el término “antígeno” se refiere a cualquier molécula o agente capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos cuando se introduce en un hospedador inmunocompetente. Como se usa en este documento, el término “antígeno” también se refiere a cualquier molécula o agente susceptible de reconocerse por un anticuerpo específico. Típicamente, pueden reconocerse como antígenos péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos o combinaciones de estas moléculas. Estos antígenos también pueden contener grupos químicos orgánicos e inorgánicos unidos.

Como se usa en ese documento, el término “epítopo” se refiere a la porción de un antígeno que se reconoce por un anticuerpo (monoclonal o policlonal) o por el receptor con especificidad de antígeno de una célula. Cuando el antígeno es un péptido, polipéptido o una proteína, sus epítomos pueden ser fragmentos de al menos 5 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos primaria, pero también regiones expuestas en la superficie de la proteína plegada madura (estructura terciaria tridimensional) compuestas por 5 o más aminoácidos. Típicamente, los epítomos pueden clasificarse como epítomos de células B y epítomos de células T basándose en los tipos de respuesta inmune que provocan.

Como se usa en este documento, el término “muestra biológica” se aplica a cualquier muestra de tejido o fluido biológico que contiene uno o más de los ácidos nucleicos, anticuerpos, péptidos, polipéptidos o proteínas de la presente invención. En la presente invención, el término “muestra biológica” también se aplica a cualquier muestra de tejido o fluido biológico que pueda usarse como fuente para la determinación de anticuerpos anti-*Anisakis*. Dichas muestras incluyen, pero sin limitación, tejidos aislados, sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido ascítico, líquido sinovial, saliva, orina o heces. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como secciones congeladas tomadas para fines histológicos. Una muestra biológica puede obtenerse a partir de cualquier organismo eucariota, y preferiblemente de un mamífero tal como una rata, ratón, conejo, mamíferos marinos, o un ser humano.

Como se usa en este documento, el término “muestra alimentaria” se refiere a cualquier muestra obtenida de la amplia gama de materiales comestibles. Estas muestras incluyen, pero sin limitación, trozos de pescado crudo, ahumado y cocinado y alimentos que tienen materiales de pescado en su composición. El término “muestra alimentaria” también incluye alimentos para la nutrición de niños.

Como se usa en este documento, la expresión “anticuerpos anti-*Anisakis*” se refiere a cualquier clase o subclase de anticuerpos presentes en una muestra capaz de reconocer al menos un epítopo que esté presente en los antígenos de cualquiera de las especies del género *Anisakis*. La expresión incluye anticuerpos producidos durante infecciones naturales o experimentales de seres humanos y animales con el parásito, así como anticuerpos monoclonales y policlonales producidos después de la inmunización de seres humanos o animales con antígenos recombinantes o sintéticos no purificados o sustancialmente purificados, obtenidos a partir de especies del género *Anisakis*. La expresión tam-

bién incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos producidos por técnicas recombinantes, síntesis química o técnicas equivalentes.

Como se usa en este documento, la expresión “porcentaje de identidad” se refiere al porcentaje de aminoácidos o nucleótidos que ocupan la misma posición relativa cuando dos secuencias de aminoácidos, o dos secuencias de ácido nucleico se alinean una al lado de la otra. Para los fines de la presente invención, un método adecuado para calcular el porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos es usar el programa *lalign* de William Pearson que aplica el algoritmo de Huang y Miller, publicado en *Adv. Appl. Math.* (1991) 12: 337-357, e incorporado en este documento como referencia. Este programa puede procesarse *on line* en la dirección: [http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html].

Como se usa en este documento, el término “inmunoensayo” se refiere a un método para detectar un analito en una muestra por medio de una reacción antígeno-anticuerpo. Los analitos pueden ser moléculas pequeñas (haptenos) o moléculas grandes, tales como muchas proteínas plasmáticas. Con mucha frecuencia, el analito es un anticuerpo que puede detectarse por medio de la unión específica entre el anticuerpo y un ligando. Como se usa en este documento, el término “inmunoensayo enzimático” (EIA) se refiere a un tipo amplio de inmunoensayos, caracterizados porque al menos uno de los reactivos está marcado con una enzima. Son EIA típicos los ensayos de inmunoabsorción vinculados a enzimas (ELISAs) de los cuales hay una serie de variantes. Si se desea una clasificación, o una descripción detallada de formatos de inmunoensayo, véase: Price y Newman (1997) *Principles and Practice of Immunoassay*, Macmillan Reference LTD, New York; Tijssen (1985) *Practice and theory of enzyme immunoassays*, En: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (R.H. Burdon and PH van Knippenberg, eds), Elsevier, Amsterdam; Deshpande (1996) *Enzyme immunoassays, from concept to product development*, Chapman & Hall, New York.

Como se usa en este documento, una “composición farmacéutica” se refiere a una composición química o biológica que es adecuada para administrarse a un individuo mamífero. Típicamente, una composición farmacéutica comprende una cantidad de un agente activo farmacológicamente eficaz y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describen ejemplos de vehículos y formulaciones farmacéuticas adecuadas en Remington’s *Pharmaceutical Sciences*, 20ª edición, Mack Publishing Company, Easton, 2000. Una composición farmacéutica puede formularse específicamente para la administración por diferentes vías incluyendo, pero sin limitación, la vía oral, parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intranasal, sublingual y similares.

Como se usa en este documento, la expresión “método de diagnóstico” se refiere a un método para la identificación de un estado patológico en un animal o en un individuo. Cuando dicho estado patológico se produce por un agente infeccioso, frecuentemente el diagnóstico puede realizarse usando un inmunoensayo (véase anteriormente) que permite la detección de los antígenos liberados por el patógeno, o de los anticuerpos inducidos en el hospedador por dicho patógeno. Los métodos de diagnóstico de la presente invención incluyen ensayos *in vitro* (tales como un ensayo ELISA, o el test de liberación de histamina de los basófilos) y ensayos *in vivo* tales como las pruebas cutáneas, por ejemplo, pero sin limitación, el ensayo de pinchazo en la piel (*prick-test*), intradermorreacciones, o las pruebas epicutáneas (por ejemplo, el ensayo de parche), que se usan frecuentemente para el diagnóstico de alergias. La expresión “métodos de diagnóstico” también incluye a las pruebas de provocación, consistentes en la administración controlada y gradual de la sustancia sospechosa de provocar un cuadro alérgico a través de diferentes vías: oral, conjuntival, nasal, bronquial, etc., para comprobar su tolerancia. Una descripción más detallada de estos últimos métodos, puede verse en: Comité de Reacciones Adversas a Alimentos: Metodología diagnóstica en la alergia a alimentos. *Alergología e Inmunología Clínica*, 14: 50-52 (1999), así como en diversos manuales de la especialidad de Alergología e Inmunología Clínica.

Como se usa en este documento, la expresión “repeticiones de secuencia” se refiere a motivos repetitivos en la secuencia de una proteína dada o de una molécula de ácido nucleico. Las repeticiones de secuencia en las secuencias polipeptídicas de la presente invención se realizaron usando el programa RADAR (véase el Ejemplo N° 12).

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un especialista habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. En la práctica de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento. A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones, la palabra “comprende” y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para los especialistas en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención.

60 Ejemplos

Ejemplo 1

Aislamiento de ARNm y construcción de una biblioteca de expresión a partir de Anisakis simplex

Se extrajeron manualmente larvas de *Anisakis simplex* en la fase larvaria L3 (L3) de las vísceras y cavidad peritoneal de la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) y se almacenaron en nitrógeno líquido antes de comenzar la construcción de la biblioteca de ADNc. Se obtuvo el ARN mensajero (ARNm) total a partir de 1 g de larvas L3

ES 2 294 935 A1

de *Anisakis simplex* congeladas usando el kit de aislamiento de ARNm Fast Track 2.0 (Invitrogen S.A., Barcelona, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se usaron cinco microgramos del ARN poli (A)+ obtenido para construir la biblioteca de ADNc de *Anisakis* usando el kit ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (Stratagene, La Jolla, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. De acuerdo con las instrucciones proporcionadas, el ARN poli (A)+ de *Anisakis simplex* se convirtió primero en ADNc bicatenario, después se ligó al vector de expresión lambda-ZAP y el vector se empaquetó usando extractos de empaquetamiento Gigapack III. Se usó como hospedador la cepa XL1-Blue MRF' de *E. coli*. La biblioteca resultante se amplificó, y contenía aproximadamente $1,3 \times 10^{10}$ pfu/ml y un 1% de fagos no recombinantes.

Exploración de la biblioteca de ADNc de *Anisakis simplex*

Una vez amplificada, la biblioteca de ADNc de *A. simplex* se sometió a un cribado inmunológico usando anticuerpos monoclonales UA3. Siguiendo las recomendaciones proporcionadas en el ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (Stratagene), se dejaron crecer células hospedadoras XL1-Blue MRF' en caldo LB con suplementos, se centrifugaron a $1000 \times g$, y el sedimento se resuspendió en sulfato de magnesio 10 mM. A esta suspensión se le añadió una alícuota de los fagos recombinantes y la mezcla se incubó 15 minutos a 37°C para permitir que los fagos se unieran a las células. Después, la suspensión celular con los fagos adheridos se mezcló con agar NZY fundido (enfriado a aproximadamente 55°C), y la mezcla se extendió uniformemente sobre una placa de 150 mm de diámetro, que contenía agar NZY recién vertido. Después de un tiempo de incubación de aproximadamente 3 h a 42°C para permitir que comenzaran a formarse placas de fagos, se indujo la expresión de proteínas recombinantes recubriendo las placas con filtros de nitrocelulosa previamente impregnados en isopropil tio-beta-D-galactósido (IPTG) 10 mM en agua (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Después, las placas se incubaron a 37°C durante 3,5 h, después de lo cual se retiraron cuidadosamente los filtros de nitrocelulosa que contenían las placas de fago adsorbido y se bloquearon con BSA al 3% en TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) a 37°C durante 30 minutos y después se incubaron con anticuerpos monoclonales (AcM) IgGilkappa UA3 (dilución 1:10.000 en TBS) a 4°C durante una noche. Los filtros de nitrocelulosa se lavaron en TBS que contenía Tween 20 al 0,05% (TBS-T), y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con IgG de cabra anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina a 1:10.000 (Pierce, Rockford, IL, USA). Después de lavar otra vez, se visualizaron los complejos inmunes usando NBT (nitroazul de tetrazolio) y BCIP (fosfato de *p*-toluidina-5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) (Sigma Chemical Corp., St Louis, MO, USA).

Escisión *in vivo* de un único clon y secuenciación de ADNc

Después de identificar un ADNc que codificaba una proteína reconocida por el AcM UA3 mediante el cribado inmunológico sobre el vector lambda-ZAP intacto, se purificó la placa de fago correspondiente (clon UAR-H5). De acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (Stratagene), se transfirió la porción central de las placas positivas para el fago seleccionadas a un tubo de microcentrifuga y se liberaron las partículas de fago recombinante en tampón SM. Después, se realizó la escisión *in vivo* del fagémido pBluescript del vector lambda-ZAP mediante coinfección de células hospedadoras XL1-Blue MRF' con el fago recombinante y el fago auxiliar ExAssist proporcionado con el kit. Al final de este procedimiento, el fagémido pBluescript escindido, obtenido empaquetado como partículas de fago filamentosas, se usó para infectar células hospedadoras SOLR. Se obtuvieron colonias de células SOLR transfectadas que contenían el fagémido pBluescript bicatenario con el inserto de ADN donado de interés dejando crecer las células en placas de agar Luria-Bertani (LB) que contenían ampicilina (100 microgramos/ml). Se dejaron crecer colonias bacterianas individuales en caldo LB-ampicilina y se purificó el ADN del fagémido pBluescript usando un kit Perfectprep Plasmid Maxi (Eppendorf). Se usaron los cebadores M13 directo (5' SEC ID N° 19 3') e inverso (5' SEC ID N° 20 3') de la secuencia de pBluescript SK, así como varios cebadores internos, para la secuenciación automática del ADN del fagémido usando el Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems, Foster City, CA) y un secuenciador de ADN Applied Biosystems 377 (PE Biosystems). Se realizaron comparaciones de la secuencia de ADN y de la secuencia deducida de aminoácidos con los bancos de datos EMBL y SWISS-PROT usando el paquete de software ExpASy (el Expert Protein Analysis System), servidor World Wide Web (<http://www.expasy.org/>), del Swiss Institute of Bioinformatics (Gasteiger *et al.*, 2003). La secuencia de nucleótidos descrita comprende una secuencia de 3288 nucleótidos, representada por la secuencia de la SEC ID N°: 1, y codifica una secuencia de aminoácidos deducida de 1096 aminoácidos representada por la SEC ID N°: 2.

Ejemplo 2

Subclonación de un fragmento de la secuencia de ADNc (SEC ID N°: 1) de *Anisakis simplex* en el vector pQE-31

En una realización preferida, se subclonó un fragmento de ADN recombinante interno (SEC ID N°: 15) que corresponde a las posiciones de nucleótidos 1303 y 2139 de la SEC ID N° 1, que codifica una secuencia polipeptídica de 279 aminoácidos (SEC ID N°: 16), en el vector de expresión pQE-31 usando un kit QIAexpress Type IV (Qiagen, IZASA S.A., Barcelona, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y usando los sitios de restricción *Sal*I y *Hind*III en el sitio de clonación múltiple de pQE-31. Está disponible otra metodología similar en manuales tales como: Molecular Cloning: a Laboratory Manual (Sambrook *et al.*, 2001) o Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1998).

ES 2 294 935 A1

Antes de la clonación, se amplificó la secuencia del fragmento de ADNc que corresponde a la SEC ID N°: 15 mediante PCR, y los extremos de la secuencia se modificaron usando el fagémido pBluescript recombinante como molde y un conjunto de cebadores directo (5' SEC ID N° 21 3') e inverso (5' SEC ID N° 22 3'), que contenían sitios de restricción *Sal I* y *Hind III*. Esta modificación mediante PCR proporcionó secuencias de nucleótidos específicas para las enzimas de restricción *Sal I* y *Hind III* para que el inserto recombinante tuviera extremos cohesivos con respecto al plásmido digerido. Las condiciones de PCR para la amplificación y modificación de la secuencia del fragmento de ADN correspondiente a la SEC ID N°: 15 comprendió: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 4 minutos seguido por 35 ciclos de (30 s de desnaturalización a 94°C; 30 s de hibridación a 55°C; y un minuto de elongación a 72°C), y un ciclo de elongación final de 72°C durante 7 minutos. Después de que acabara la PCR, se purificó el ADN recombinante de *Anisakis* amplificado usando un kit de purificación en gel QiaQuick (Qiagen). A continuación, un microgramo del ADN plasmídico y 2 microgramos del ADN que codificaba el fragmento a insertar se digirieron con las enzimas de restricción *Sal I* y *Hind III*, de acuerdo con el tampón y las condiciones de incubación recomendadas por el fabricante (Invitrogen S.A., Barcelona, España). Finalmente, tanto el vector digerido como el inserto de ADN se purificaron con el kit de purificación en gel QiaQuick (Qiagen) y se ligaron en una proporción 1:3 entre el vector y el inserto, usando ADN ligasa de T4 a 16°C durante una noche. La inserción del ADN recombinante de *Anisakis simplex* de la SEC ID N°: 15 entre los sitios *Sal I* y *Hind III* del sitio de clonaje múltiple de pQE-31 originó un marco abierto de lectura (ORF) plasmídico de 915 nucleótidos (SEC ID N°: 3), que codificó la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4, la cual incluye la SEC ID N°: 16 de *Anisakis* (porción central) y dos secuencias de aminoácidos adicionales (colas): SEC ID N° 23 y SEC ID N° 24, localizadas, respectivamente, en las porciones amino y carboxilo terminales de la secuencia de *Anisakis* clonada. La presencia de la señal de 6 x Histidina en la porción amino del polipéptido codificado puede facilitar la purificación de polipéptidos recombinantes, pero también pueden usarse otros vectores y métodos de purificación según convenga.

25 Ejemplo 3

Transformación de células M15 (pREP4) con pQE-31 recombinante

La transformación de células M15 [pREP4] de *E. coli* con el vector pQE-31 recombinante se realizó de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el manual (The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins) del fabricante (Qiagen). De acuerdo con este protocolo, se incubaron una alícuota de células M15 competentes preparadas previamente y una alícuota de la mezcla de ligamiento en hielo durante 20 minutos y después se incubaron a 42°C durante 90 minutos. Después de dichas incubaciones, las células se resuspendieron en caldo Psi y se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Después, las células M15 se sembraron en placas de agar LB que contenían 25 microgramos por mililitro de kanamicina y 100 microgramos de ampicilina y se incubaron durante una noche a 37°C. Una colonia positiva se dejó crecer en caldo LB suplementado con kanamicina y penicilina, se centrifugó y las células sedimentadas se almacenaron en medio SOB que contenía glicerol a -80°C.

40 Ejemplo 4

Expresión del polipéptido recombinante de Anisakis simplex

Para producir el polipéptido recombinante de *Anisakis* recombinante del Ejemplo 2, las células M15 transformadas se descongelaron y dejaron crecer a 37°C en caldo LB, complementado con kanamicina y ampicilina, con agitación orbital (200 r.p.m.) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5. Después se indujo la expresión del polipéptido añadiendo IPTG 1 mM, y las células se incubaron durante 4 h adicionales a 37°C con las mismas condiciones de agitación. Posteriormente, las células se centrifugaron a 5000 x g y se almacenaron congeladas a -30°C hasta la purificación del polipéptido expresado, según se describe en el Ejemplo 5. En estas condiciones de cultivo, las células M15 producen el polipéptido recombinante de la SEC ID N°: 4 precipitado en forma de cuerpos de inclusión.

Ejemplo 5

Purificación de polipéptido recombinante de Anisakis simplex

En una realización preferida, los cuerpos de inclusión de las células M15 sedimentadas, obtenidas a partir de un cultivo de 250 ml, se purificaron de acuerdo con las siguientes etapas: a) el sedimento bacteriano se resuspendió en 15 ml de reactivo B-PER (Pierce, Rockford, IL, USA) y se agitó suavemente durante 10 minutos; b) la muestra se centrifugó a 15.000 x g y el sobrenadante, que contenía proteínas solubles, se desechó; c) el sedimento que contenía los cuerpos de inclusión se resuspendió en otros 15 ml de B-PER y a la suspensión celular se le añadió lisozima a una concentración final de 200 microgramos (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y se incubó a TA durante 5 minutos; d) la suspensión se diluyó con 100 ml de una dilución 1:10 de B-PER y las células se resuspendieron empleando un agitador *vortex*; e) la suspensión celular se centrifugó a 15.000 x g durante 15 minutos y el sedimento se resuspendió en otros 100 ml de B-PER y se agitó en el *vortex*; f) la suspensión que contenía B-PER diluido se centrifugó a 15.000 x g y el sedimento se resuspendió en 50 ml de un tampón de desnaturalización que constaba de NaH₂PO₄ 100 mM, Tris.Cl 10 mM y Urea 6 M, pH 8,0, y después se agitó en el *vortex*; g) la sus-

ES 2 294 935 A1

5 pensión se centrifugó a 15.000 x g durante 20 minutos y se disolvió en 10 ml de un tampón de desnaturalización que constaba de NaH₂PO₄ 100 mM, Tris.Cl 10 mM y Urea 8 M, pH 8,0 (tampón de carga); h) a la solución que contenía el péptido, se le añadieron 2,5 ml de una suspensión de resina Ni- NTA al 50% (Qiagen) y la mezcla se agitó en un agitador orbital durante 30 minutos a TA. Después la suspensión de resina se cargó en una columna vacía, y se lavó con dos volúmenes del tampón de carga; i) los polipéptidos retenidos se eluyeron con una solución que contenía Tris.Cl 0,15 M, pH 10,5, que contenía imidazol 250 mM, y se almacenó congelada a -30°C hasta su uso.

10 Ejemplo 6

Subclonación del fragmento de la secuencia de ADNc de Anisakis simplex de la SEC ID N°: 17 en el vector pTARGET y transformación de células JM109 competentes

15 En otra realización preferida, un fragmento interno de 834 aminoácidos (SEC ID N°: 17) correspondiente a las posiciones de nucleótidos 1306-2139 de la SEC ID N°:1, que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido representado por la SEC ID N°: 18, se subclonó en el vector pTARGET (Promega). Para ello, la SEC ID N°: 17 se amplificó mediante PCR empleando un conjunto de cebadores directo (5' SEC ID N° 25 3') y reverso (5' SEC ID N° 26 3') y el vector pQE-31 transformado del Ejemplo 3 como molde. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de (45 segundos de desnaturalización a 94°C; 45 segundos de hibridación a 55°C; y 1,5 minutos de elongación a 72°C), y un ciclo de elongación final de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2% y después se donaron en el vector pTARGET. El ligamiento de pTARGET y el inserto de *Anisakis*, y la transformación de células JM109 competentes se realizaron como se indica en las instrucciones del uso del producto. Se seleccionaron transformantes JM 109 positivos por selección de colonias blancas usando placas de agar LB suministradas con ampicilina/IPTG/X-Gal como se describe por el fabricante.

20 En las condiciones experimentales descritas, la Subclonación de la secuencia de ADNc correspondiente a la SEC ID N°: 17 en el vector pTARGET originó un ORF plasmídico de 846 nucleótidos (SEC ID N°: 5) que codifica para la secuencia de 282 aminoácidos de la SEC ID N°: 6, que incluye el polipéptido de *Anisakis* de la SEC ID N°: 17, y una secuencia adicional de 4 aminoácidos (SEC ID N°: 24) situada en la porción carboxilo terminal de la SEC ID N°: 17.

35 Ejemplo 7

Aislamiento del ADN del plásmido recombinante de células JM109 y vacunación de ratones con ADNplasmídico

40 Se dejó crecer una colonia positiva de células JM109 en caldo LB-ampicilina, se centrifugó a 15.000 x g durante 15 minutos y el sedimento se usó para la extracción del ADN plasmídico usando el kit Plasmid Maxi (Qiagen). Se inoculó un total de 50 microlitros (concentración de un microgramo por microlitro) de ADN plasmídico sin endotoxinas en el músculo cuádriceps de las dos patas de ratones Balb/c de 10-20 semanas de edad. Las inoculaciones se realizaron usando una jeringa de insulina como se describe por Leiro *et al.* (2002).

45 Ejemplo 8

Inmunoensayos para la determinación de anticuerpos anti-Anisakis en sueros de pacientes infectados

50 Un inmunoensayo de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier inmunoensayo capaz de detectar la presencia de anticuerpos anti-*Anisakis* en cualquier fluido biológico procedente de un individuo o especie animal.

55 Los ejemplos de tipos de inmunoensayos incluyen inmunoensayos en fase líquida y fase sólida, e inmunoensayos competitivos y no competitivos en un formato directo o indirecto.

Típicamente, la medición de los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis* específicos en un fluido biológico, como por ejemplo en suero o plasma, puede realizarse por métodos ELISA, como son los métodos ELISA descritos en este ejemplo.

60 a) Muestras de suero

65 Las muestras de suero usadas en los métodos ELISA de este ejemplo se obtuvieron a partir de individuos no infectados (donantes de sangre sanos) y de individuos infectados con el parásito *Anisakis simplex*. Los sueros se consideraron positivos cuando se obtuvieron a partir de individuos que tenían una historia reciente de haber comido pescado crudo y la presencia del parásito pudo confirmarse por examen endoscópico.

ES 2 294 935 A1

b) ELISA de captura con antígenos *O*-desglicosilados y anticuerpos monoclonales UA3

Se describe un método ELISA de captura (UA3-ELISA) basado en la captura de antígenos *O*-desglicosilados de *Anisakis* spp. específicos por anticuerpos monoclonales UA3 inmovilizados.

El antígeno *O*-desglicosilado usado en este inmunoensayo se obtuvo como se ha descrito previamente, y se basa en el tratamiento de antígenos de *Anisakis* enteros con NaOH 0,02 M a 50°C durante 16 h, y neutralización adicional del pH con HCl.

Para realizar el ELISA de captura, se realizaron las siguientes etapas: a) acoplamiento de anticuerpos monoclonales UA3 purificados (100 microlitros/pocillo; concentración de anticuerpos de 10 microgramos/ml) durante una noche; b) aspiración, y después lavado de la placa ELISA con PBS tres veces; c) aspiración, y después bloqueo de los pocillos de ELISA durante 1 h a 37°C con una solución de PBS que contenía leche descremada en polvo al 3% y Tween-20 al 0,2% (PBS-TM); d) aspiración, y después incubación durante 1,5 h a 37°C con 100 microlitros de suero humano no diluido; e) lavado tres veces con 200 microlitros por pocillo de PBS que contenía Tween-20 al 0,2% (PBS-T); f) incubación con 100 microlitros de una dilución 1:2500 de anticuerpos monoclonales anti-IgE humana marcados con FITC (Ingenasa, Madrid, España; el marcaje con FITC se llevó a cabo de acuerdo con el método de Liddel y Cryer, 1991); g) aspiración y lavado 3 veces con 200 microlitros/pocillo de PBS-T; h) aspiración, e incubación con 100 microlitros de una dilución 1:1.500 de anticuerpos de conejo anti-FITC conjugados con peroxidasa (Dako, Barcelona, España); i) aspiración, y lavado con 200 microlitros por pocillo de PBS-T; j) aspiración, e incubación con sustrato para peroxidasa (Sigma Fast OPD, Sigma); k) lectura de densidades ópticas (DO) a 492 nm en lector multipocillo (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

c) ELISA indirecto con el polipéptido recombinante de *Anisakis* expresado en células M15 transformadas

En una realización preferida, el polipéptido recombinante de la SEC ID N°: 4 se usó para realizar un ELISA indirecto para medir anticuerpos anti-*Anisakis* en sueros de individuos infectados con *Anisakis*.

En este ejemplo se describe un método ELISA para la determinación de anticuerpos IgE en muestras de suero humano, pero también pueden medirse otras clases (IgA, IgG, IgM) y subclases (IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) de anticuerpos cambiando la especificidad de los anticuerpos anti-humano secundarios. Del mismo modo, el inmunoensayo también puede adaptarse para determinaciones de anticuerpos en fluidos biológicos de otras especies animales (por ejemplo, otros mamíferos, aves o peces) eligiendo los anticuerpos secundarios anti-especie apropiados.

En una realización preferida, el método para realizar el ELISA indirecto (rUA3-ELISA) del presente ejemplo se realizó de acuerdo con las siguientes etapas: a) acoplamiento de las placas de ELISA con el antígeno recombinante de *Anisakis* de la SEC ID N°: 4 en Tris.Cl 0,1 M, pH 10,5; b) aspiración, y después lavado de la placa de ELISA con PBS tres veces; c) aspiración, y después bloqueo de los pocillos de ELISA durante 1 h a 37°C con una solución de solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía leche descremada en polvo al 3% y Tween-20 al 0,2% (TBS-TM); d) aspiración, y después incubación de las placas durante 1,5 h a 37°C con 100 microlitros de suero humano no diluido; e) lavado tres veces con 200 microlitros por pocillo de TBS que contenía Tween-20 al 0,2% (TBS-T); f) incubación con 100 microlitros de una dilución 1:2500 de anticuerpos monoclonales anti-IgE humana marcados con FITC (Ingenasa; marcado con FITC de acuerdo con el método de Liddel y Cryer, 1991); g) aspiración, y después lavado 3 veces con 200 microlitros/pocillo de TBS-T; h) aspiración, y después incubación con 100 microlitros de una dilución 1:1500 de anticuerpos de conejo anti-FITC conjugados con peroxidasa (Dako); i) aspiración, y después lavado con 200 microlitros por pocillo de PBS-T; j) aspiración, e incubación con sustrato para peroxidasa (Sigma Fast OPD, Sigma); k) lectura de las densidades ópticas (DO) a 492 nm en lector multipocillo (Molecular Devices).

La siguiente Tabla I muestra la comparación de los valores de IgE obtenidos para 22 muestras de suero positivas de pacientes infectados con el nematodo *Anisakis simplex*, ensayadas por los métodos de ELISA de captura (UA3-ELISA) y ELISA indirecto (rUA3-ELISA) descritos en el Ejemplo 8 de la presente invención. La tabla muestra los valores medios de absorbancia, medidos a 492 nm, para cada suero. Los valores de corte (*cut-off*) para las determinaciones de IgE fueron DO = 0,105 para el método UA3-ELISA y DO = 0,049 para el método rUA3-ELISA. Nótese que la muestra 2 fue sólo positiva por el método rUA3-ELISA. Estos resultados demuestran que tanto el método UA3-ELISA (sensibilidad del 95,45%) como el método rUA3-ELISA (sensibilidad del 100%) son métodos válidos para serodiagnóstico de infecciones humanas por *Anisakis* spp.

TABLA I

| | | Densidad Óptica (492 nm) | |
|----|-------------------|--------------------------|-------------------|
| | | Método UA3-ELISA | Método rUA3-ELISA |
| 5 | | | |
| | Muestra 1 | 1,5 | 1,04 |
| 10 | Muestra 2 | 0,067 | 0,068* |
| | Muestra 3 | 0,48 | 0,43 |
| | Muestra 4 | 0,68 | 0,9 |
| 15 | Muestra 5 | 0,9 | 0,5 |
| | Muestra 6 | 0,12 | 0,06 |
| | Muestra 7 | 0,11 | 0,1 |
| 20 | Muestra 8 | 0,11 | 0,35 |
| | Muestra 9 | 0,83 | 0,55 |
| | Muestra 10 | 0,45 | 0,36 |
| | Muestra 11 | 0,39 | 0,12 |
| 25 | Muestra 12 | 1,49 | 1,3 |
| | Muestra 13 | 1,82 | 1,16 |
| | Muestra 14 | 0,177 | 0,24 |
| | Muestra 15 | 0,6 | 0,35 |
| 30 | Muestra 16 | 0,17 | 0,06 |
| | Muestra 17 | 0,21 | 0,149 |
| | Muestra 18 | 0,84 | 0,55 |
| 35 | Muestra 19 | 0,22 | 0,11 |
| | Muestra 20 | 0,28 | 0,79 |
| | Muestra 21 | 0,6 | 0,28 |
| 40 | Muestra 22 | 0,88 | 0,83 |

Ejemplo 9

45 *Producción de anticuerpos en ratones transfectados con el vector pTARGET recombinante que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 6*

50 En este ejemplo, se extrajo sangre de ratones transfectados con *pTARGET* recombinante que codificaba el polipéptido de la SEC ID N°: 6 (véase el Ejemplo 7) con anestesia, y el suero obtenido se ensayó en ELISA indirecto para determinar la presencia de anticuerpos IgG1 reactivos con el polipéptido de la SEC ID N°: 4 inmovilizado en la placa de ELISA. El método ELISA fue el mismo descrito en el Ejemplo 8b, con la excepción de que se usaron anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón marcados con peroxidasa (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA; dilución 1:3000) en lugar de reactivos anti-humano secundarios. En este ejemplo, se ensayaron sueros de ratón a una dilución 1:100.

55 La siguiente Tabla II muestra la respuesta de anticuerpos IgG1 obtenida en ratones BALB/c después de la vacunación (por vía parenteral) con 100 microgramos/ratón del plásmido *p-TARGET* recombinante que contenía el inserto de ADN de *Anisakis simplex* que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 6. La extracción de sangre de los ratones se hizo un mes después de la inmunización. La tabla muestra los valores medios de absorbancia \pm SD para cada suero, medidos a 492 nm (tres determinaciones independientes).

60 Estos resultados demuestran que una vacuna de ADN recombinante que contiene una secuencia de ADN de *Anisakis* (mostrado en este experimento por la SEC ID N°: 6 de la presente invención) puede ser útil para la inducción de anticuerpos anti-*Anisakis in vivo*. La inducción *in vivo* de anticuerpos por vacunas es de interés para: a) la inducción de protección inmunológica contra agentes infecciosos, y b) para la prevención de reacciones alérgicas.

TABLA II

| | Absorbancia a 492 nm |
|--|----------------------|
| Ratón 1 (<i>p</i> TARGET sin inserto de <i>Anisakis</i>) | 0,0 ± 0,01 |
| Ratón 2 (<i>p</i> TARGET más inserto de <i>Anisakis</i> de la SEC ID N°: 5) | 0,27 ± 0,05 |
| Ratón 3 (<i>p</i> TARGET más inserto de <i>Anisakis</i> de la SEC ID N°: 5) | 0,45 ± 0,07 |

Ejemplo 10

Marcaje y aplicaciones de péptidos y polipéptidos recombinantes de Anisakis simplex de la presente invención

El marcaje de los péptidos y polipéptidos de la presente invención con una biomolécula o molécula química detectable es útil para fines tales como diagnóstico *in vivo* e *in vitro* e investigación de laboratorio. Hay muchos marcadores y métodos diferentes para el marcaje conocidos por los especialistas en la técnica (por ejemplo, Kessler (Ed). Non-radioactive labeling and detection of biomolecules. Springer-Verlag, Berlin 1992); Walker (Ed). The protein protocols handbook. Humana Press, Totowa, New Jersey (1996)).

Los ejemplos de los tipos de marcadores que pueden usarse en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, compuestos bioluminiscentes y sustancias cromogénicas incluyendo partículas coloreadas tales como oro coloidal y partículas de látex.

En una realización preferida, los péptidos y polipéptidos de la presente invención están radiomarcados con, pero sin limitación, ³²P, ¹⁴C, ³H, ³⁵S, ¹²⁵I o ¹³¹I. Los péptidos marcados pueden detectarse por métodos tales como recuento de centelleo, espectrometría de rayos gamma o autorradiografía.

En otra realización preferida, los péptidos y polipéptidos de la presente invención pueden marcarse con la luciferina de luciérnaga. El compuesto bioluminiscente puede estar unido covalentemente al péptido o polipéptido seleccionado por métodos convencionales, y el péptido o polipéptido marcado se puede detectar cuando una enzima, por ejemplo, luciferasa, cataliza una reacción con ATP que hace que la molécula bioluminiscente emita fotones de luz.

Los fluorógenos también son de amplio uso como marcadores. Los ejemplos de fluorógenos incluyen fluoresceína y derivados, rodamina, Rojo Texas, ficoeritrina, ficocianina y otros. Generalmente, las moléculas de fluorógeno se detectan por un detector de fluorescencia.

En otra realización preferida, los péptidos y polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, el polipéptido de la SEC ID N°: 4) pueden marcarse con biotina y capturarse en un soporte sólido por un ligando de biotina específico como avidina o estreptavidina. Una vez que se ha inmovilizado el polipéptido marcado en el soporte sólido (por ejemplo, el pocillo de una placa de ELISA), puede usarse para detectar anticuerpos contra el polipéptido seleccionado realizando las incubaciones típicas y etapas de lavado como las descritas en el Ejemplo 8b de la presente invención.

Como alternativa, los péptidos y polipéptidos de la presente invención pueden marcarse con enzimas (por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa alcalina y otras enzimas que proporcionan una reacción cromogénica o fluorogénica después de la adición del sustrato apropiado). Pueden usarse péptidos y polipéptidos marcados con enzimas seleccionadas, por ejemplo, para detectar anticuerpos específicos que reconocen dichos péptidos o polipéptidos en un método ELISA de captura, donde el anticuerpo a detectar se captura primero por otro anticuerpo inmovilizado en un soporte sólido y el péptido o polipéptido marcado, más el sustrato apropiado, se usan para revelar que tuvo lugar la unión anticuerpo-polipéptido.

En otra realización preferida más, los péptidos y polipéptidos de la presente invención pueden marcarse con oro coloidal para su uso en ensayos de inmunocromatografía de flujo lateral, de acuerdo con métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, se describen métodos para producir partículas de oro de diversos tamaños y para la conjugación de oro con proteínas en: Dykstra (Ed). A manual of applied techniques for biological electron microscopy. Plenum Press. New York (1993).

Además, en otra realización preferida, la molécula de marcaje puede ser micropartículas magnéticas y el sistema inmovilizado un imán.

Ejemplo 11

Marcaje y aplicaciones de moléculas de ácido nucleico de Anisakis simplex de la presente invención

5 Pueden usarse moléculas de ácido nucleico marcadas como sondas para detectar secuencias diana complementarias en una mezcla de ácido nucleico compleja por métodos de hibridación específicos tales como transferencia de Southern, de Northern, slot blot y dot blot, hibridación *in situ* (ISH) y micromatrices (*microarrays*). Los métodos para marcar moléculas de ácido nucleico son bien conocidos en la técnica y pueden realizarse usando diferentes agentes de marcaje incluyendo, pero sin limitación: agentes radiactivos, colorantes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes; 10 micropartículas; enzimas; marcadores colorimétricos (tales como, por ejemplo, colorantes, oro coloidal y similares); marcadores magnéticos y haptenos (tales como, por ejemplo, biotina, dioxigenina (DIG) y otros para los que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales).

15 Las sondas marcadas de la presente invención pueden usarse como herramientas de diagnóstico, por ejemplo, para la detección de ADN de *Anisakis* spp. en tejidos humanos y/o animales infectados, y para investigación.

En una realización preferida, las secuencias de ácido nucleico seleccionadas de la presente invención pueden marcarse con DIG por amplificación por PCR usando nucleótidos marcados con DIG (Boehringer-Mannheim, Alemania).

20 Como ejemplo, puede obtenerse una sonda de secuencia de nucleótidos marcada con DIG seleccionada (482 pares de bases), que corresponde a las posiciones de los nucleótidos 1490 y 1971 de la SEC ID N°: 1, usando el vector pQE-31 transformado del Ejemplo 3 como molde, y un conjunto de cebadores directo (5' SEC ID N°: 27 3') e inverso (5' SEC ID N°: 28 3'). Las muestras tisulares a analizar, obtenidas a partir de biopsias humanas o de animales infectados, pueden fijarse en paraformaldehído al 4%, y después analizarse para detectar la presencia de ADN de *Anisakis* 25 spp. usando métodos ISH y la sonda marcada con DIG anterior. Una descripción detallada de un método para realizar el ISH del presente ejemplo ha sido descrita por Leiro *et al.* (2001), que se incorporó en este documento como referencia.

30 Ejemplo 12

Análisis de secuencias peptídicas sintéticas que inhiben la unión de anticuerpo monoclonal UA3 con péptidos y polipéptidos de Anisakis simplex de la presente invención

35 En un aspecto de la presente invención, se describen secuencias peptídicas que se reconocen por el anticuerpo monoclonal UA3. Dichas secuencias peptídicas se reconocieron como "repeticiones" de aminoácidos analizando la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 usando el programa RADAR <http://www.ebi.ac.uk/Radar/> en el EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute). Se sintetizaron químicamente secuencias seleccionadas de 12 aminoácidos a partir de estas "repeticiones" y se ensayaron en ELISA competitivo con respecto a la inhibición de la unión de anticuerpos monoclonales UA3 con el polipéptido recombinante de la SEC ID N°: 4, inmovilizado en los pocillos de una placa de ELISA. 40

La actividad inhibidora de péptidos que corresponden a las secuencias de aminoácidos N°: 7-11 se ensayaron en un ELISA de captura, siguiendo las siguientes etapas típicas: a) unión del polipéptido de la SEC ID N°: 4 a los pocillos 45 de una placa de ELISA durante una noche; b) aspiración, y después bloqueo de los pocillos de ELISA durante 1 h a 37°C con tampón TBS que contenía leche descremada en polvo al 3% y Tween-20 al 0,2% (TBS-TM); d) aspiración, y después incubación durante 2 h a 37°C con 100 microlitros de la dilución apropiada de mA3 preincubado con el péptido inhibidor a ensayar; d) lavado 3 veces con 200 microlitros/pocillo de TBS que contenía Tween-20 al 0,2% (TBS-T); e) incubación con 100 microlitros de una dilución 1:3000 en PBS-TM de IgG de cabra anti-ratón conjugada 50 con peroxidasa (Nordic Immunological Laboratory, Tilburg, The Netherlands); f) aspiración, y lavado 3 veces con 200 microlitros/pocillo de TBS-T; g) aspiración, y lavado con 200 microlitros/pocillo de PBS-T; h) aspiración, e incubación con sustrato para peroxidasa (Sigma Fast OPD, Sigma); i) lectura de las densidades ópticas (DO) a 492 nm en lector multipocillo (Molecular Devices).

55 La siguiente Tabla III muestra los valores de inhibición obtenidos para los péptidos sintéticos de las SEC ID N°: 7-11 (ensayados a tres concentraciones) sobre la unión del anticuerpo monoclonal UA3 al polipéptido de la SEC ID N°: 4 inmovilizado en una placa de ELISA. Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición para cada dilución de péptido con respecto al control (sin inhibición). ND: No hecho. Como se dedujo de los resultados observados, el anticuerpo monoclonal UA3 tiene preferencia por péptidos de las SEC ID N°: 7 y 8, que difiere solamente en un 60 aminoácido.

65

TABLA III

| | Concentración de péptidos | | |
|----------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | $2 \times 10^{-3} \text{M}$ | $7.4 \times 10^{-5} \text{M}$ | $8.23 \times 10^{-6} \text{M}$ |
| (SEC ID N° 7) | 98,45 | 89,79 | 73,25 |
| (SEC ID N° 8) | 97,79 | 79,75 | 63,63 |
| (SEC ID N° 9) | 76,75 | 17,96 | 3,42 |
| (SEC ID N° 10) | ND | 11,42 | 0 |
| (SEC ID N° 11) | 26,04 | 0 | 0 |

Ejemplo 13

Importancia de las secuencias de aminoácidos sintéticas de las SEC ID N°: 7-11 como diana para anticuerpos IgE anti-Anisakis presentes en sueros de pacientes infectados

En otra realización preferida, se ensayó la actividad inhibidora de las secuencias de aminoácidos (SEC ID N°: 7-11) sobre la unión de anticuerpos IgE humanos anti-*Anisakis* al polipéptido de la SEC ID N°: 4 en un ELISA indirecto competitivo del siguiente modo: a) unión del polipéptido de la SEC ID N°: 4 a los pocillos de una placa de ELISA durante una noche; b) aspiración, y después bloqueo de los pocillos de ELISA durante 1 h a 37°C con tampón TBS que contiene leche descremada en polvo al 3% y Tween-20 al 0,2% (TBS-TM); d) aspiración, y después incubación durante 2 h a 37°C con 100 microlitros de una dilución 1:1 del suero del paciente correspondiente y la solución peptídica en TBS ($1,5 \times 10^{-3} \text{M}$, concentración final para cada uno de los péptidos anteriores); d) lavado 3 veces con 200 microlitros/pocillo de TBS que contiene Tween-20 al 0,2% (TBS-T); e) incubación con 100 microlitros de una dilución 1:2500 de anticuerpos monoclonales anti-IgE humana marcados con FITC; f) aspiración, y después lavado 3 veces con 200 microlitros/pocillo de TBS-T; g) aspiración, y después incubación con 100 microlitros de una dilución 1:1500 de anticuerpos de conejo anti-FITC conjugados con peroxidasa (Dako); h) aspiración, y después lavado con 200 microlitros/pocillo de PBS-T; i) aspiración, e incubación con sustrato para peroxidasa (Sigma Fast OPD, Sigma); j) lectura de las densidades ópticas (DO) a 492 nm en un lector multipocillo (Molecular Devices).

La siguiente Tabla IV muestra la actividad inhibidora de una mezcla de los péptidos sintéticos que corresponden a las SEC ID N°: 7-11 sobre la unión de anticuerpos IgE presentes en sueros de cinco pacientes infectados al polipéptido de la SEC ID N° 4 inmovilizado en placas de ELISA. La mezcla peptídica se ensayó a una concentración final de $1,5 \times 10^{-3} \text{M}$ para cada péptido. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la mezcla peptídica con respecto al control (inhibido con una mezcla de péptidos irrelevantes a la misma concentración final). Como se observó en la Tabla, las secuencias ensayadas fueron dianas para un intervalo del 25-74 por ciento de todos los anticuerpos IgE anti-*Anisakis* presentes en los sueros de pacientes infectados. Sin embargo, se entiende que probablemente otros péptidos y polipéptidos recombinantes o sintéticos que comprenden un tramo contiguo de 8 o más aminoácidos de la SEC ID N°: 2, o repeticiones de dichas secuencias, también pueden reconocerse por anticuerpos anti-*Anisakis* de varios isotipos que están presentes en sueros de pacientes infectados.

TABLA IV

| | Porcentaje de inhibición |
|------------|--------------------------|
| Paciente 1 | 53,5 |
| Paciente 2 | 74,1 |
| Paciente 3 | 35,0 |
| Paciente 4 | 30,4 |
| Paciente 5 | 25,4 |

Ejemplo 14

Caracterización de antígenos de larvas de Anisakis en tejidos biológicos

5 En una realización preferida, los péptidos o polipéptidos de la presente invención pueden usarse para inmunizar un mamífero (tal como, por ejemplo, conejos, ovejas, cabras, ratones o ratas) y los anticuerpos policlonales específicos obtenidos pueden usarse para revelar la presencia de larvas de *Anisakis* en tejidos infectados de seres humanos o animales. Típicamente, el procedimiento para revelar antígenos de *Anisakis* en tejidos con parásitos puede realizarse siguiendo un método de inmunohistoquímica convencional de acuerdo con las siguientes etapas generales: a) preparación de los portaobjetos que contienen las secciones de tejidos incluidos en parafina; b) bloqueo de los tejidos con TBS-TM o cualquier otro reactivo de bloqueo; c) etapa de lavado; d) incubación con anticuerpos policlonales anti-*Anisakis*; e) etapa de lavado; f) incubación con anticuerpos secundarios marcados que reconocen anticuerpos IgG de la especie animal usada para la inmunización (en este ejemplo, la molécula de marcaje preferida es la enzima peroxidasa, pero puede usarse cualquier otro marcador tal como, por ejemplo, los indicados en el Ejemplo 10 de la presente invención, para el marcaje de anticuerpos secundarios); g) etapa de lavado; h) incubación con el sustrato enzimático apropiado (tal como, por ejemplo H₂O₂ + DAB); i) observación al microscopio.

En otra realización preferida, puede revelarse la presencia de proteínas de *Anisakis* spp. que comprenden las secuencias de aminoácidos de la presente invención en tejidos infectados de seres humanos o animales usando el anticuerpo monoclonal UA3 como anticuerpo primario, usando métodos de inmunohistoquímica convencionales.

Ejemplo 15

25 *Detección de la presencia de antígenos de Anisakis en extractos alimentarios empleando anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales de la presente invención*

En otra realización preferida, los AcMs (ejemplo el AcM UA3) y los anticuerpos policlonales obtenidos frente a los péptidos, polipéptidos o proteínas de la presente invención pueden ser utilizados para diseñar un método ELISA captura destinado a detectar la presencia de antígenos de *Anisakis* en extractos alimentarios que contengan pescado en su composición.

En una realización todavía más preferida, el método ELISA captura para la determinación de antígenos de *Anisakis* en un extracto alimentario se puede llevar a cabo de acuerdo con las siguientes etapas: a) acoplamiento de anticuerpos policlonales anti-*Anisakis* (100 microlitros/pocillo; concentración de anticuerpos de 10 microgramos/ml) durante una noche; b) aspiración, y después lavado de la placa ELISA con PBS tres veces; c) aspiración, y después bloqueo de los pocillos de ELISA durante 1 h a 37°C con una solución de PBS que contenga leche descremada en polvo al 3% y Tween-20 al 0,2% (PBS-TM); d) aspiración, y después incubación durante una noche a 4°C y agitación orbital, con 100 microlitros del correspondiente extracto alimentario (sobrenadante obtenido por homogenización de la muestra en PBS y posterior centrifugación a 3.000 g durante 30 minutos); e) lavado tres veces con 200 microlitros por pocillo de PBS que contenga Tween-20 al 0,2% (PBS-T); f) incubación con 100 microlitros de una dilución 1:2500 de anticuerpos monoclonales UA3 marcados con biotina (marcaje realizado según se describe en la referencia Walker (1996)); g) aspiración y lavado 3 veces con 200 microlitros/pocillo de PBS-T; h) aspiración, e incubación con 100 microlitros de una dilución 1:1.500 avidina-peroxidasa (Pierce, Rockford, IL, USA); i) aspiración, y lavado con 200 microlitros por pocillo de PBS-T; j) aspiración, e incubación con sustrato para peroxidasa (Sigma Fast OPD, Sigma); k) lectura de densidades ópticas (DO) a 492 nm en lector multipocillo (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Bibliografía

50 **Akao, N., Yoshimura, H. (1989).** Latex agglutination test for immunodiagnosis of gastric anisakiasis. En: Gastric anisakiasis in Japan. Epidemiology, diagnosis, treatment. (Eds. Ishikura, H. y Namiki, M.), *Springer-Verlag*, Tokyo, pp.: 97-102.

55 **Asaishi, K.; Nishino, C., Hayasaka, H. (1989).** Passive hemagglutination test (Boyden). En: Intestinal anisakiasis in Japan. Infected fish, sero-immunological diagnosis, and prevention. (Eds. Ishikura, H. y Kikuchi, K.) *Springer-Verlag, Tokyo*, pp.: 167-172.

60 Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (Eds) (1998). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons Inc. New York.

Baeza, M. L., Rodríguez, A., Matéu, V., Rubio, M., Tornero, P., de Barrio, M., Herrero, T., Santaolalla, M., Zubeldia, J. M. (2004). Characterization of allergens secreted por *Anisakis simplex* parasite: clinical relevance in comparison with somatic allergens. *Clinical and Experimental Allergy* 34: 296-302.

65 **Campana-Rouget, Y., Biocca, E. (1955).** A new species of *Anisakis* in a Mediterranean seal. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparé* 30: 477-480.

- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Cabanas, R., Suarez-de-Parga, J. M., López-Serrano M. C. (2000). Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease-clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism por *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105: 176-81.
- 5 Del Pozo, M. D., Moneo, I., Fernández de Corres, L., Audicana, M. T., Muñoz, D., Fernández, E., Navarro, J. A., García, M. (1996). Laboratory determinations in *Anisakis simplex* allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 97: 977-984.
- 10 Desowitz, R. S.; Raybourne, R. B., Ishikura, H., Kliks, M. M. (1985). The radioallergosorbent test (RAST) for the serological diagnosis of human anisakiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 256-259.
- 15 Deshpande S. S. (1996) Enzyme immunoassays, from concept to product development, Chapman & Hall, New York.
- Dykstra, M. J. (Ed). (1993). A manual of applied techniques for biological electron microscopy. *Plenum Press*. New York.
- 20 Dollfus, R. (1966). Helminthofauna de *Kogia breviceps* (de Blainville, 1838) cetace odeontocete. *Annales de la Société des Sciences Naturelles de la Carente-Maritime* 4: 3-6.
- 25 García, M., Moneo, I., Audicana, M. T., Del Pozo, M. D., Muñoz, D., Fernández, E., Díez, J., Etxenagusia, M. A., Ansotegui, I. J., Fernández de Corres, L. (1997). The use of IgE immunoblotting as a diagnostic tool in *Anisakis simplex* allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99: 497-501.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R. D., Bairoch A. (2003). *ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis*. *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788.
- 30 Huang, X., Miller, M. (1991). A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics* 12: 337-357 (1991).
- Kessler, C. (1992) Nonradiative labeling and detection of biomolecules. *Springer-Verlag*, Berlin (1992);
- 35 Leiro J, Iglesias R, Ubeira F M, Sanmartín M L. (2001). Non-isotopic detection of *Tetramicra brevifilum* (Microspora) DNA in turbot tissues. *Journal of Parasitology*, 87: 1488-90.
- 40 Leiro J, Siso M I, Iglesias R, Ubeira F M, Sanmartín M L. (2002). Mouse antibody response to a microsporidian parasite following inoculation with a gene coding for parasite ribosomal RNA. *Vaccine*, 20: 2648-55.
- Liddell, J. E., Cryer, A. (1991). Characterization, purification and labelling. In: A practical guide to monoclonal antibodies. Wiley & Sons, Chichester, pp.: 105-138.
- 45 Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Santos, C. P., Costa, G., Di Benedetto, A. P., Ramos, R., Argyrou, M., Cianchi, R., Bullini, L. (2002). Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1960): larval identification and genetic relationship with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: *Anisakidae*). *Systematic Parasitology* 51: 159-170.
- 50 Mattiucci, S., Nascetti, G., Dailey, M., Webb, S. C., Barros, N. B., Cianchi, R., Bullini, L. (2005). Evidende for a new species of *Anisakis* (Dujardin, 1845): morphological description and genetic relationship between congeners (Nematoda: *Anisakidae*). *Systematic Parasitology* 61: 157-171.
- 55 Nascetti, G., Paggi, L., Orecchia, P., Smith, J. W., Mattiucci, S., Bullini, L. (1998). Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex complex* (Ascaridida: *Anisakidae*) from the mediterranean and North East Atlantic. *International Journal for Parasitology* 16: 633-640.
- 60 Oshima, T. (1972). *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent area. En: Progress of Medical Parasitology in Japan, Vol. IV. (Eds. Morishita, K.; Kojima, Y. and Matsubayashi, H.), Meguro Parasitological Museum, Tokyo, pp.: 301-393.
- Paggi, L., Nascetti, G., Webb, S. C., Mattiucci, S., Cianchi, R., Bullini, L. (1998). A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, *Anisakidae*) from beaked whales (Ziphiidae): allozyme and morphological evidence. *Systematic Parasitology* 40: 161-174.
- 65 Petithory, J. C.; Lapierre, J., Rousseau, M., Clique, M. T. (1986). Diagnostic sérologique de l'anisakiase (granulome éosinophile digestif) par précipitation en milieu gélatiné (Ouchterlony, électrosynérèse, immunoélectrophorèse). *Médecine et Maladies Infectieuses*, 3: 157-162.

ES 2 294 935 A1

Poggensee, U.; Schomme, G.; Jansen-Rosseck, R., Feldemeier, H. (1989). Immunodiagnosis of human anisakiasis por use of larval excretory-secretory antigen. *Zentralblatt für Bakteriologie and Microbiologie and Hygiene*, **A270**: 503-510.

5 **Rodero, M., Jiménez, A., Cuellar, C. (2002).** Evaluation por ELISA of *Anisakis simplex* larval antigen purified por affinity chromatography. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **97**: 247-52.

Price, C. P., Newman, D. J. (Eds) (1997). Principles and Practice of Immunoassay, Macmillan Reference LTD, New York.

10 Sambrook, J., Russel, D. W. (Eds). (2001). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

15 **Tatusova, T. A., Madden, T. L. (1999).** Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiological Letters*. **174**: 247-250.

Tijssen P. (1985) Practice and theory of enzyme immunoassays, In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (R.H. Burdon and PH van Knippenberg, eds), Elsevier, Amsterdam.

20 **Tsuji, M. (1989).** Serological and immunological studies. En: Gastric anisakiasis in Japan. Epidemiology, diagnosis, treatment. (Eds. Ishikura, H. y Namiki, M.), *Springer-Verlag*, Tokyo, pp.: 89-95.

25 **Tsuji, M. (1990).** Ouchterlony test and immunoelectrophoresis. En: Intestinal anisakiasis in Japan. Infected fish, sero-immunological diagnosis, and prevention. (Eds. Ishikura, H. y Kikuchi, K.) *Springer-Verlag*, Tokyo, pp.: 183-186.

Ubeira, F. M., Iglesias, R. (2000). Monoclonal antibodies in the study of *Anisakis simplex*. *Allergy* **55** (Suppl 59): 18-28.

30 Van **Thiel P H. (1960).** A nematode parasitic to herring causing acute abdomen syndromes in man. *Tropical and Geographical Medicine* **2**: 97-113.

Walker, J. M. (1996). The protein protocols handbook. *Humana Press*, Totowa, New Jersey.

35 **Yagihashi, A., Sato, N., Takahashi, S., Ishikura, H., Kikuchi, K. (1990).** A serodiagnostic assay por micro-enzyme-linked immunosorbent assay for human anisakiasis using a monoclonal antibody specific for *Anisakis* larvae antigen. *The Journal of Infectious Diseases*, **161**: 995-998.

40 **Yamamoto, Y.; Nakata, H., Yamamoto, Y. (1990).** Detection of anti-*Anisakis* antibody of IgE type in sera of patients with intestinal anisakiasis. En: Intestinal anisakiasis in Japan. Infected fish, sero-immunological diagnosis, and prevention. (Eds. Ishikura, H. y Kikuchi, K.) *Springer-Verlag*, Tokyo, pp.: 205-216.

45

50

55

60

65

ES 2 294 935 A1

REIVINDICACIONES

1. Secuencia de ácido nucleico aislada seleccionada de cualquiera de las siguientes:

- 5
- a. Un ácido nucleico que comprende la SEC ID N° 1
 - b. Un ácido nucleico que comprende el complemento de la SEC ID N° 1
 - 10 c. Un fragmento del ácido nucleico de la SEC ID N° 1 que comprende la SEC ID N° 15 o la SEC ID N° 17.
 - d. Un ácido nucleico que comprende un fragmento de la SEC ID N° 1 que codifica para cualquiera de las SEC ID N° 4 o 7-14.
 - 15 e. Un ácido nucleico que tiene una identidad de al menos el 70% con cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas previamente.

2. Polipéptido, péptido o proteína aislada codificada por cualquiera de las secuencias de ácido nucleico aisladas de la reivindicación 1, seleccionado entre el siguiente grupo:

- 20
- a. Un polipéptido, proteína o péptido que comprende la SEC ID N° 2
 - b. Un fragmento de la SEC ID N° 2 que comprende la SEC ID N° 16 o la SEC ID N° 18.
 - 25 c. Un fragmento de la SEC ID N° 2 que comprende cualquiera de las SEC ID N° 4 o 7-14.
 - d. Un polipéptido, péptido o proteína que tiene una identidad de al menos el 70% con cualquiera de las secuencias de polipéptidos, proteínas o péptidos descritas previamente.

30 3. El péptido, polipéptido o proteína aislada de acuerdo con la reivindicación 2(a)-2(d) o la secuencia de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1(a)-1(e), que presente una identidad de al menos el 80% con cualquiera de estas secuencias.

35 4. El polipéptido, péptido o proteína aislada de acuerdo con la reivindicación 2(a)-2(d) o en la secuencia de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1(a)-1(e), que presente una identidad de al menos el 90% con cualquiera de estas secuencias.

5. Péptido, polipéptido o proteína aislada que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2(c)-2(d), 3 ó 4, seleccionada entre el siguiente grupo:

- 40
- a. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 7
 - b. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 8
 - 45 c. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 9
 - d. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 10
 - e. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 11
 - 50 f. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 12
 - g. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 13
 - 55 h. Una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N° 14.

6. Una secuencia de ácido nucleico aislada capaz de codificar cualquiera de los péptidos de la reivindicación anterior.

60 7. Un péptido, polipéptido o proteína que comprende dos o más de las secuencias de aminoácidos de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5.

8. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido, polipéptido o proteína de la reivindicación 7.

65 9. Un anticuerpo o un fragmento del mismo capaz de reconocer cualquier péptido, polipéptido o proteína de cualquiera de las reivindicaciones 2-5.

ES 2 294 935 A1

10. Un anticuerpo según la reivindicación anterior, donde dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal UA3 producido por la línea celular de hibridoma con el número de depósito DSM ACC2793.
11. Línea celular de hibridoma con número de depósito DSM ACC2793 **caracterizado** porque produce el anticuerpo monoclonal UA3 específico frente a la SEC ID N° 2.
12. Una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos aislada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde dicha secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos está marcada con una molécula de señalización.
13. La secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos aislada de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicha molécula de marcaje se selecciona entre el siguiente grupo:
- Radiactiva
 - Enzimática
 - Fluorescente
 - Luminiscente
 - Quimioluminiscente
 - Haptenos
 - Coloreada.
14. La secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos aislada de acuerdo con la reivindicación anterior, donde dicha molécula de marcaje se selecciona entre el siguiente grupo:
- Biotina o sus derivados
 - Derivado de nitrofenol
 - Oro coloidal y
 - Látex.
15. Un péptido, polipéptido o proteína aislada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, fusionada o unida químicamente a un péptido, polipéptido o proteína adicional.
16. Un vector de expresión o sistema de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-4, 6 o 8.
17. Una célula hospedadora procariota o eucariota aislada transformada o transfectada con una secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-4, 6, o 8 ó con el vector o sistema de expresión de la reivindicación 16.
18. Un método para elaborar un péptido, polipéptido o proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, por cualquiera de las siguientes técnicas:
- Técnicas recombinantes
 - Síntesis química
 - Purificación sustancial de nematodos de la familia *Anisakidae*.
19. Un método para elaborar un péptido, polipéptido o proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 17 en condiciones tales que se exprese dicha secuencia de nucleótidos, y producir y después aislar dicho péptido, polipéptido o proteína.
20. Un método *in vitro* para detectar anticuerpos contra *Anisakis* spp. en una muestra biológica que comprende:
- poner en contacto la muestra biológica, preferiblemente suero, con un péptido, polipéptido o proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, 7 ó 13, en condiciones suficientes para formar un complejo inmunológico entre dicho polipéptido y los anticuerpos de la muestra, y
 - detectar dicho complejo inmunológico.

ES 2 294 935 A1

21. El método de la reivindicación 20, en el que dicho método es un inmunoensayo o un inmunoensayo enzimático.

22. Un método *in vitro* para detectar antígenos de *Anisakis* spp. en una muestra biológica o en un extracto alimentario que comprende:

5

a. poner en contacto la muestra biológica, o el extracto alimentario con un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en condiciones suficientes para formar un complejo inmunológico entre dicho anticuerpo y los antígenos de la muestra, y

10

b. detectar dicho complejo inmunológico.

23. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el anticuerpo usado para formar un complejo inmunológico es UA3.

15

24. Una composición inmunológica que comprende un péptido, polipéptido o proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, 7 o una secuencia de nucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-4, 6, 8 ó 10.

20

25. Uso de un péptido, polipéptido o proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o 7, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de alergia a *Anisakis* spp.

26. Un kit adecuado para la detección de anticuerpos anti-*Anisakis* spp. en una muestra biológica que comprende un péptido, polipéptido o proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-5, 7 ó 13.

25

27. Un kit adecuado para la detección de antígenos de *Anisakis* spp en una muestra biológica, o en un extracto alimentario que comprende un anticuerpo o fragmentos del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-10.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 294 935 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidade de Santiago de Compostela
- 5 <120> Secuencias peptídicas y nucleotídicas de *Anisakis* spp., anticuerpos que reconocen dichas secuencias, y usos de los mismos.
- <130> ES1596.2
- 10 <160> 28
- <170> PatentIn version 3.3
- 15 <210> 1
<211> 3288
<212> DNA
- 20 <213> *Anisakis* spp.
- <220>
<221> misc_feature
- 25 <222> (1)..(3288)
<223> Región codificante de la secuencia antigénica de la SEQ ID n° 2 de *Anisakis*
- <400> 1
- 30 gcgaaat acg gaagccaatt ctgtaagaat cttcttgcaa attgcttgtc ttctacgggt 60
gcaacactac cgatgcaatc accatggcag ataccgccg ttgtttcttc atgcataacc 120
35 tcaggaatgg cgaaaggaac tgaccataat aaaaaagacg tgatggcaac gtgcatacaa 180
agatatggtg cagacttttg taagaacatg gtgggatcat gcgctgcatt gactgatgtg 240
actcttacat cttatggaat tggttcagta ctaccacaag ttattgtcga ctgcatgacc 300
40 tcggagatgt ctagtccgag cataatgtgg caatgtgtgc agaagtatgg tactgaattt 360
tgcaagaaac tgctgcaaga ttgttctgct tctacgggtg catccttatc tccccaagca 420
ccttggctca taccaagtgt gatcgctgaa tgtatggcca aaggatggt caatggagga 480
45 cggcaagctg atgacacaat ggcaatttgc atccaaaaat acggcatcaa attttgcaac 540
atcataggag ctgctgctc agtgtaaca caagtgccat tcttcccaca actgcctggg 600
50 actgtgcagc aattaccatc agaacttcgt gcatgctgac gatcggagac ccaaaaacca 660
aacgtgatga ccaaatgcgt ggagaaatat ggcacggaat tttgtagtag cctgttgcaa 720
agttgttctg catcaaccgg tgcaatatta cctctgagc aaccgtggaa gataccgcac 780
55 ccgattgcag actgtatgta tgcaggtatg aatccagaat ctaaagaaga ccgtggaggt 840
ataatgtcga aatgcatcag acgttatggt tttgatttct gcaagaagat gttggaatcc 900
tgttcggcat taactagtgt acagcatgac tcacgaaaca ctaactacgc atcacttcca 960
60 caagtattga aggattgtat ggcatcagaa atggatagtc cgagcgtaat gttcgaatgc 1020
gtgcaaagat atggtacacc attttgcaag ggcctcttgg aaacatgcac tgagaaaaca 1080
cgggcatccc tctcaccaca ggcgccgtgg ttgatacaca ctgcaattgc acaatgcatg 1140
65 cgtcaaggaa tgaaccaagg agatgaaaag aagacattga tgtcgttgtg tgaagaaga 1200
tatggggctg attactgcaa caatctggca gcagcctgtt ctgttcttac caatttaccg 1260

ES 2 294 935 A1

ttcttcccac agacacctcc atctgaacaa aatctaccac caatgatgca caaatgctta 1320
 aagtcggaaa tggaaaatcc tggattatg tccacatgtg ttcaaagata tggactcag 1380
 5 ttttgaaga acttactgaa ctcgtgcaca gcgtaaccg gtatgcatct tccgtacgat 1440
 gcaccttggga aaatacccga gccaatcgct gcttgcattg cccaaggaat gaatggtggt 1500
 10 gaccacaaac ctaaggagga tgcgatggcg agatgcatac gtaaataatgg tgtcacttac 1560
 tgcaacaaca tgctagcatc ttgttctgta ttgaccaatg taaattatga ccctagtggc 1620
 ggtcaaatgc cgggaatatt atcggaatgc gtgactgcag aaacggatga accgagtgca 1680
 15 atgtgccaat gcgttcaaaa gtacggtact gaattctgca agaaacgcct tgcattcgtgt 1740
 attgcttcta cgggtatgaa tcttcccgcc actacacat ggaaactgcc tccacctgtg 1800
 gctcgtgca tgcagcacgg gtcacctaata gacaaccgcg gacagggaca gggttcaaat 1860
 20 gacgtaatgt ctcaatgtat tgctagatac ggagccgaat tttgtcaacg gtttagcgaga 1920
 ttctgttatg caatgaacag ttacaatat ccaggagaga cttttgatcc acagcaacag 1980
 25 actccaacac aagtagcaag atgcatgaag tcagaaatgg atagtccgct cgtaatgtgg 2040
 cactgtgtgc agaaatattg tcaagaattt tgtaacaagt tagctgccac ctgctcgaca 2100
 gaaacgaaca cacctcttcc gcaacaggat ccttggcgat taccgcaacc aataatcgcc 2160
 30 tgcatgttag gaaaaatgaa taatcctaata ccaacatcca aacctcagag tgtaatgtca 2220
 cagtgcacag ccagatatgg tgatgatttc tgcttgagtc tcggaaaagc ttgtgctgaa 2280
 35 ctcaacaatg taccatctc catgataagt ctttctgcac agcaattacc ccaaccagtt 2340
 tccagttgta tgaaagcggg aatgaacaac ccgagtgcac tgtggcagtg tatacagcaa 2400
 tacggcatag aattttgcaa gaaattaaga gatgcttggt ctgcaatgac tggcgcatct 2460
 40 ctttccacta caactcctg gattttgccg caaccagtat caaactgtat gagaaacgag 2520
 atgaataatc caagtgcaat gtggctttgc atccagaaat atggcattga attctgcaat 2580
 45 agactagcgt cggcttgtgc gatgatcaag aaggttacta tgcccacagt gaccataaat 2640
 ctaccagaaa taatagcaag ctgctgcgct tcagagaatt cgcaggcaat gtgctacgcc 2700
 cgtaaaggac ctgaacaatg taaaacagaa gaaaacatct gtcggaatcc gaacaatcct 2760
 50 ccagggagcc cgttgactat tccggagacg gagtgcattg agagtcaggt tgcaatggcc 2820
 acatgccaga agaaattcgg atcagagtgt gttgctctc aacaagaatg tgttgctgga 2880
 55 actggagcgc ctctgttac gattggtgcg agaggagcgt tcatgttggc cacagcactt 2940
 cgttcatgta tcttcaacgg aggcgttatt ggtagtgtg ttctgtatca cccaccatct 3000
 caatgtgacc agtgggtcca gcaatgtgcc actgactgc aaacatcagc tgggtgtaact 3060
 60 gttgcgggcg gttatcgcca gctatctccc ccgatggcag tatgtgtcgc atcacaggat 3120
 ttgatgacaa gatgcatgac gagattgggc caaggaactt gtcaacaggc agtcaaaaac 3180
 tgcaagcgaa gattcaacac accttcttca agacttccgg gaaggttgtg gtcgctgtcg 3240
 65 tcagaactaa tcaattgctt atatcgtcct gtgaacagag ctagcaac 3288

ES 2 294 935 A1

<210> 2
 <211> 1096
 <212> PRT
 5 <213> *Anisakis* spp.

 <220>
 <221> Peptide
 10 <222> (1)..(1096)
 <223> Secuencia aminoácídica deducida de la SEQ ID N° 1

 <400> 2
 15 Ala Lys Tyr Gly Ser Gln Phe Cys Lys Asn Leu Leu Ala Asn Cys Leu
 1 5 10 15
 20 Ser Ser Thr Gly Ala Thr Leu Pro Met Gln Ser Pro Trp Gln Ile Pro
 20 25 30
 25 Pro Val Val Ser Ser Cys Ile Thr Ser Gly Met Ala Lys Gly Thr Asp
 35 40 45
 30 His Asn Lys Lys Asp Val Met Ala Thr Cys Ile Gln Arg Tyr Gly Ala
 50 55 60
 35 Asp Phe Cys Lys Asn Met Val Gly Ser Cys Ala Ala Leu Thr Asp Val
 65 70 75 80
 40 Thr Leu Thr Ser Tyr Gly Ile Gly Ser Val Leu Pro Gln Val Ile Val
 85 90
 45 Asp Cys Met Thr Ser Glu Met Ser Ser Pro Ser Ile Met Trp Gln Cys
 100 105 110
 50 Val Gln Lys Tyr Gly Thr Glu Phe Cys Lys Lys Leu Leu Gln Asp Cys
 115 120 125
 55 Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Leu Ser Pro Gln Ala Pro Trp Leu Ile
 130 135 140
 60 Pro Ser Val Ile Ala Glu Cys Met Ala Lys Gly Met Val Asn Gly Gly
 145 150 155 160
 65 Arg Gln Ala Asp Asp Thr Met Ala Ile Cys Ile Gln Lys Tyr Gly Ile
 165 170 175
 70 Lys Phe Cys Asn Ile Ile Gly Ala Ala Cys Ser Val Leu Thr Gln Val
 180 185 190
 75 Pro Phe Phe Pro Gln Leu Pro Gly Thr Val Gln Gln Leu Pro Ser Glu
 195 200 205
 80 Leu Arg Ala Cys Val Arg Ser Glu Thr Gln Lys Pro Asn Val Met Thr
 210 215 220

ES 2 294 935 A1

Lys Cys Val Glu Lys Tyr Gly Thr Glu Phe Cys Ser Ser Leu Leu Gln
 225 230 235 240

5
 Ser Cys Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ile Leu Pro Leu Arg Glu Pro Trp
 245 250 255

10
 Lys Ile Pro His Pro Ile Ala Asp Cys Met Tyr Ala Gly Met Asn Pro
 260 265 270

15
 Glu Ser Lys Glu Asp Arg Gly Gly Ile Met Ser Lys Cys Ile Arg Arg
 275 280 285

20
 Tyr Gly Phe Asp Phe Cys Lys Lys Met Leu Glu Ser Cys Ser Ala Leu
 290 295 300

25
 Thr Ser Val Gln His Asp Ser Arg Asn Thr Asn Tyr Ala Ser Leu Pro
 305 310 315 320

30
 Gln Val Leu Lys Asp Cys Met Ala Ser Glu Met Asp Ser Pro Ser Val
 325 330 335

35
 Met Phe Glu Cys Val Gln Arg Tyr Gly Thr Pro Phe Cys Lys Gly Leu
 340 345 350

40
 Leu Glu Thr Cys Thr Glu Lys Thr Arg Ala Ser Leu Ser Pro Gln Ala
 355 360 365

45
 Pro Trp Leu Ile Pro Thr Ala Ile Ala Gln Cys Met Arg Gln Gly Met
 370 375 380

50
 Asn Gln Gly Asp Glu Lys Lys Thr Leu Met Ser Leu Cys Val Arg Arg
 385 390 395 400

55
 Tyr Gly Ala Asp Tyr Cys Asn Asn Leu Ala Ala Ala Cys Ser Val Leu
 405 410 415

60
 Thr Asn Leu Pro Phe Phe Pro Gln Thr Pro Pro Ser Glu Gln Asn Leu
 420 425 430

65
 Pro Pro Met Met His Lys Cys Leu Lys Ser Glu Met Glu Asn Pro Gly
 435 440 445

70
 Ile Met Ser Thr Cys Val Gln Arg Tyr Gly Thr Gln Phe Cys Lys Asn
 450 455 460

75
 Leu Leu Asn Ser Cys Thr Ala Ser Thr Gly Met His Leu Pro Tyr Asp
 465 470 475 480

80
 Ala Pro Trp Lys Ile Pro Glu Pro Ile Ala Ala Cys Met Ala Gln Gly
 485 490 495

85
 Met Asn Gly Gly Asp His Lys Pro Lys Glu Asp Ala Met Ala Arg Cys

ES 2 294 935 A1

| | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5 | Ile | Arg | Lys | Tyr | Gly | Val | Thr | Tyr | Cys | Asn | Asn | Met | Leu | Ala | Ser | Cys |
| | | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | |
| 10 | Ser | Val | Leu | Thr | Asn | Val | Asn | Tyr | Asp | Pro | Ser | Gly | Gly | Gln | Met | Pro |
| | | 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | |
| 15 | Gly | Ile | Leu | Ser | Glu | Cys | Val | Thr | Ala | Glu | Thr | Asp | Glu | Pro | Ser | Ala |
| | 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 |
| 20 | Met | Cys | Gln | Cys | Val | Gln | Lys | Tyr | Gly | Thr | Glu | Phe | Cys | Lys | Lys | Arg |
| | | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | |
| 25 | Leu | Ala | Ser | Cys | Ile | Ala | Ser | Thr | Gly | Met | Asn | Leu | Pro | Ala | Thr | Thr |
| | | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | |
| 30 | Pro | Trp | Lys | Leu | Pro | Pro | Pro | Val | Ala | Arg | Cys | Met | Gln | His | Gly | Ser |
| | | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | |
| 35 | Pro | Asn | Asp | Asn | Arg | Gly | Gln | Gly | Gln | Gly | Ser | Asn | Asp | Val | Met | Ser |
| | | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | |
| 40 | Gln | Cys | Ile | Ala | Arg | Tyr | Gly | Ala | Glu | Phe | Cys | Gln | Arg | Leu | Ala | Arg |
| | 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 |
| 45 | Phe | Cys | Tyr | Ala | Met | Asn | Ser | Leu | Gln | Tyr | Pro | Gly | Glu | Thr | Phe | Asp |
| | | | | | 645 | | | | | 650 | | | | | 655 | |
| 50 | Pro | Gln | Gln | Gln | Thr | Pro | Thr | Gln | Val | Ala | Arg | Cys | Met | Lys | Ser | Glu |
| | | | | 660 | | | | | 665 | | | | | 670 | | |
| 55 | Met | Asp | Ser | Pro | Ser | Val | Met | Trp | His | Cys | Val | Gln | Lys | Tyr | Gly | Gln |
| | | | 675 | | | | | 680 | | | | | 685 | | | |
| 60 | Glu | Phe | Cys | Asn | Lys | Leu | Ala | Ala | Thr | Cys | Ser | Thr | Glu | Thr | Asn | Thr |
| | | 690 | | | | | 695 | | | | | 700 | | | | |
| 65 | Pro | Leu | Pro | Gln | Gln | Asp | Pro | Trp | Arg | Leu | Pro | Gln | Pro | Ile | Ile | Ala |
| | 705 | | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 |
| 70 | Cys | Met | Leu | Gly | Lys | Met | Asn | Asn | Pro | Asn | Pro | Thr | Ser | Lys | Pro | Gln |
| | | | | | 725 | | | | | 730 | | | | | 735 | |
| 75 | Ser | Val | Met | Ser | Gln | Cys | Thr | Ala | Arg | Tyr | Gly | Asp | Asp | Phe | Cys | Leu |
| | | | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | |
| 80 | Ser | Leu | Gly | Lys | Ala | Cys | Ala | Glu | Leu | Asn | Asn | Val | Pro | Ser | Ser | Met |
| | | | 755 | | | | | 760 | | | | | 765 | | | |
| 85 | Ile | Ser | Leu | Ser | Ala | Gln | Gln | Leu | Pro | Gln | Pro | Val | Ser | Ser | Cys | Met |
| | 770 | | | | | | 775 | | | | | 780 | | | | |

ES 2 294 935 A1

Lys Ala Glu Met Asn Asn Pro Ser Ala Leu Trp Gln Cys Ile Gln Gln
 785 790 795 800
 5 Tyr Gly Ile Glu Phe Cys Lys Lys Leu Arg Asp Ala Cys Ser Ala Met
 805 810 815
 10 Thr Gly Ala Ser Leu Ser Thr Thr Thr Pro Trp Ile Leu Pro Gln Pro
 820 825 830
 15 Val Ser Asn Cys Met Arg Asn Glu Met Asn Asn Pro Ser Ala Met Trp
 835 840 845
 20 Leu Cys Ile Gln Lys Tyr Gly Ile Glu Phe Cys Asn Arg Leu Ala Ser
 850 855 860
 25 Ala Cys Ala Met Ile Lys Lys Val Thr Met Pro Thr Val Thr Ile Asn
 865 870 875 880
 30 Leu Pro Glu Ile Ile Ala Ser Cys Val Ala Ser Glu Asn Ser Gln Ala
 885 890 895
 35 Met Cys Tyr Ala Arg Lys Gly Pro Glu Gln Cys Lys Thr Glu Glu Asn
 900 905 910
 40 Ile Cys Arg Asn Pro Asn Asn Pro Pro Gly Ser Pro Leu Thr Ile Pro
 915 920 925
 45 Glu Thr Glu Cys Met Lys Ser Gln Val Ala Met Ala Thr Cys Gln Lys
 930 935 940
 50 Lys Phe Gly Ser Glu Cys Val Ala Leu Gln Gln Glu Cys Val Ala Gly
 945 950 955 960
 55 Thr Gly Ala Pro Pro Val Thr Ile Gly Ala Arg Gly Ala Phe Met Leu
 965 970 975
 60 Ala Thr Ala Leu Arg Ser Cys Ile Phe Asn Gly Gly Val Ile Gly Ser
 980 985 990
 65 Cys Val Leu Tyr His Pro Pro Ser Gln Cys Asp Gln Trp Val Gln Gln
 995 1000 1005
 70 Cys Ala Thr Ala Leu Gln Thr Ser Ala Gly Val Thr Val Ala Gly
 1010 1015 1020
 75 Gly Tyr Arg Gln Leu Ser Pro Pro Met Ala Val Cys Val Ala Ser
 1025 1030 1035
 80 Gln Asp Leu Met Thr Arg Cys Met Thr Arg Leu Gly Gln Gly Thr
 1040 1045 1050

ES 2 294 935 A1

Cys Gln Gln Ala Val Lys Asn Cys Lys Arg Arg Phe Asn Thr Pro
 1055 1060 1065

5 Ser Ser Arg Leu Pro Gly Arg Leu Trp Ser Leu Ser Ser Glu Leu
 1070 1075 1080

10 Ile Asn Cys Leu Tyr Arg Pro Val Asn Arg Ala Ser Asn
 1085 1090 1095

<210> 3

<211> 915

15 <212> DNA

<213> *Anisakis* spp.

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (1)..(915)

<223> OERF PQE31 (marco de lectura abierto del plásmido PQE31)

25 <400> 3

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| | atgagaggat | ctcaccatca | ccatcaccat | acggatccgc | atgcgagctc | ggtaccccgg | 60 |
| 30 | gtcgcacatga | tgcacaaatg | cttaaagtcg | gaaatggaaa | atcctggtat | tatgtccaca | 120 |
| | tgtgtttcaaa | gatatggtac | tcagttttgc | aagaacttac | tgaactcgtg | cacagcgtca | 180 |
| | accggtatgc | atcttccgta | cgatgcacct | tggaaaatac | ccgagccaat | cgctgcttgc | 240 |
| 35 | atggcccaag | gaatgaatgg | tggtgaccac | aaacctaagg | aggatgcat | ggcgagatgc | 300 |
| | atacgtaaatt | atgggtgtcac | ttactgcaac | aacatgctag | catcttgttc | tgtattgacc | 360 |
| 40 | aatgtaaatt | atgaccctag | tggcgggtcaa | atgccgggaa | tattatcgga | atgctgtgact | 420 |
| | gcagaaacgg | atgaaccgag | tgcaatgtgc | caatgcgttc | aaaagtacgg | tactgaattc | 480 |
| | tgcaagaaac | gccttgcac | gtgtattgct | tctacgggta | tgaatcttcc | cgccactaca | 540 |
| 45 | ccatggaaac | tgctccacc | tgtggctcgc | tgcattgcagc | acgggtcacc | taatgacaac | 600 |
| | cgcgacagag | gacaggggtc | aaatgacgta | atgtctcaat | gtattgctag | atacggagcc | 660 |
| | gaattttgtc | aacgggttagc | gagattctgt | tatgcaatga | acagtttaca | atatccagga | 720 |
| 50 | gagacttttg | atccacagca | acagactcca | acacaagtag | caagatgcat | gaagtcagaa | 780 |
| | atggatagtc | cgctccgtaat | gtggcactgt | gtgcagaaat | atgggtcaaga | atcttgtaac | 840 |
| 55 | aagtttagctg | ccacctgttc | gacagaaacg | aacacacctc | ttccgcaaca | ggatccttgg | 900 |
| | cgaagcttaa | ttagc | | | | | 915 |

60 <210> 4

<211> 305

<212> PRT

<213> *Anisakis* spp.

65 <220>

<221> PEPTIDE

ES 2 294 935 A1

<222> (1)..(305)

<223> Secuencia aminoácídica deducida de la SEQ ID N° 3

5 <400> 4

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | Met | Arg | Gly | Ser | His | His | His | His | His | His | Thr | Asp | Pro | His | Ala | Ser |
| | | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| 10 | Ser | Val | Pro | Arg | Val | Asp | Met | Met | His | Lys | Cys | Leu | Lys | Ser | Glu | Met |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| 15 | Glu | Asn | Pro | Gly | Ile | Met | Ser | Thr | Cys | Val | Gln | Arg | Tyr | Gly | Thr | Gln |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| 20 | Phe | Cys | Lys | Asn | Leu | Leu | Asn | Ser | Cys | Thr | Ala | Ser | Thr | Gly | Met | His |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| 25 | Leu | Pro | Tyr | Asp | Ala | Pro | Trp | Lys | Ile | Pro | Gln | Pro | Ile | Ala | Ala | Cys |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| 30 | Met | Ala | Gln | Gly | Met | Asn | Gly | Gly | Asp | His | Lys | Pro | Lys | Glu | Asp | Ala |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| 35 | Met | Ala | Arg | Cys | Ile | Arg | Lys | Tyr | Gly | Val | Thr | Tyr | Cys | Asn | Asn | Met |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| 40 | Leu | Ala | Ser | Cys | Ser | Val | Leu | Thr | Asn | Val | Asn | Tyr | Asp | Pro | Ser | Gly |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| 45 | Gly | Gln | Met | Pro | Gly | Ile | Leu | Ser | Glu | Cys | Val | Thr | Ala | Glu | Thr | Asp |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| 50 | Glu | Pro | Ser | Ala | Met | Cys | Gln | Cys | Val | Gln | Lys | Tyr | Gly | Thr | Glu | Phe |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| 55 | Cys | Asn | Lys | Arg | Leu | Ala | Ser | Cys | Ile | Ala | Ser | Thr | Gly | Met | Asn | Leu |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| 60 | Pro | Ala | Thr | Thr | Pro | Trp | Lys | Leu | Pro | Pro | Pro | Val | Ala | Arg | Cys | Met |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| 65 | Gln | His | Gly | Ser | Pro | Asn | Asp | Asn | Arg | Gly | Gln | Gly | Gln | Gly | Ser | Asn |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| 70 | Asp | Val | Met | Ser | Gln | Cys | Ile | Ala | Arg | Tyr | Gly | Ala | Glu | Phe | Cys | Gln |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| 75 | Arg | Leu | Ala | Arg | Phe | Cys | Tyr | Ala | Met | Asn | Ser | Leu | Gln | Tyr | Pro | Gly |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| 80 | Glu | Thr | Phe | Asp | Pro | Gln | Gln | Gln | Thr | Pro | Thr | Gln | Val | Ala | Arg | Cys |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| 85 | Met | Lys | Ser | Glu | Met | Asp | Ser | Pro | Ser | Val | Met | Trp | His | Cys | Val | Gln |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |

ES 2 294 935 A1

<400> 6

5 Met His Lys Cys Leu Lys Ser Glu Met Glu Asn Pro Gly Ile Met Ser
1 5 10

10 Thr Cys Val Gln Arg Tyr Gly Thr Gln Phe Cys Lys Asn Leu Leu Asn
20 30

15 Ser Cys Thr Ala Ser Thr Gly Met His Leu Pro Tyr Asp Ala Pro Trp
35 40 45

20 Lys Ile Pro Gln Pro Ile Ala Ala Cys Met Ala Gln Gly Met Asn Gly
50 55 60

25 Gly Asp His Lys Pro Lys Glu Asp Ala Met Ala Arg Cys Ile Arg Lys
65 70 75 80

30 Tyr Gly Val Thr Tyr Cys Asn Asn Met Leu Ala Ser Cys Ser Val Leu
85 90 95

35 Thr Asn Val Asn Tyr Asp Pro Ser Gly Gly Gln Met Pro Gly Ile Leu
100 105 110

40 Ser Glu Cys Val Thr Ala Glu Thr Asp Glu Pro Ser Ala Met Cys Gln
115 120 125

45 Cys Val Gln Lys Tyr Gly Thr Glu Phe Cys Asn Lys Arg Leu Ala Ser
130 135 140

50 Cys Ile Ala Ser Thr Gly Met Asn Leu Pro Ala Thr Thr Pro Trp Lys
145 150 155 160

55 Leu Pro Pro Pro Val Ala Arg Cys Met Gln His Gly Ser Pro Asn Asp
165 170 175

60 Asn Arg Gly Gln Gly Gln Gly Ser Asn Asp Val Met Ser Gln Cys Ile
180 185 190

65 Ala Arg Tyr Gly Ala Glu Phe Cys Gln Arg Leu Ala Arg Phe Cys Tyr
195 200 205

70 Ala Met Asn Ser Leu Gln Tyr Pro Gly Glu Thr Phe Asp Pro Gln Gln
210 215 220

75 Gln Thr Pro Thr Gln Val Ala Arg Cys Met Lys Ser Glu Met Asp Ser
225 230 235 240

80 Pro Ser Val Met Trp His Cys Val Gln Lys Tyr Gly Gln Glu Phe Cys
245 250 255

85 Asn Lys Leu Ala Ala Thr Cys Ser Thr Glu Thr Asn Thr Pro Leu Pro
260 265 270

90 Gln Gln Asp Pro Trp Arg Ser Leu Ile Ser

ES 2 294 935 A1

- <210> 7
<211> 12
<212> PRT
5 <213> *Anisakis*
- <220>
<221> Peptide
10 <222> (1)..(12)
<223> Péptido antigénico de *Anisakis*
- <400> 7
15
Cys Val Gln Lys Tyr Gly Thr Glu Phe Cys Asn Lys
1 5 10
- 20 <210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> *Anisakis* spp.
25
- <220>
<221> Peptide
<222> (1)..(12)
30 <223> Péptido antigénico de *Anisakis*
- <400> 8
35
Cys Val Gln Lys Tyr Gly Gln Glu Phe Cys Asn Lys
1 5 10
- 40 <210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> *Anisakis* spp.
45
- <220>
<221> Peptide
<222> (1)..(12)
50 <223> Péptido antigénico de *Anisakis*
- <400> 9
55
Cys Val Gln Arg Tyr Gly Thr Gln Phe Cys Lys Asn
1 5 10
- 60 <210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> *Anisakis* spp.
- <220>
65 <221> Peptide
<222> (1)..(12)

ES 2 294 935 A1

<223> Péptido antigénico de *Anisakis*

<400> 10

5 Cys Ile Arg Lys Tyr Gly Val Thr Tyr Cys Asn Asn
1 5 10

<210> 11

10 <211> 12

<212> PRT

<213> *Anisakis* spp.

15

<220>

<221> Peptide

<222> (1)..(12)

20 <223> Péptido antigénico de *Anisakis*

<400> 11

25 Cys Ile Ala Arg Tyr Gly Ala Glu Phe Cys Gln Arg
1 5 10

<210> 12

<211> 13

30

<212> PRT

<213> *Anisakis* spp.

35

<220>

<221> Peptide

<222> (1)..(13)

<223> Péptido antigénico de *Anisakis*

40

<400> 12

45 Cys Leu Gln Lys Tyr Gly Ala Glu Phe Cys Asn Lys Leu
1 5 10

<210> 13

<211> 11

50

<212> PRT

<213> *Anisakis* spp.

<220>

55

<221> Peptide

<222> (1)..(11)

<223> Péptido antigénico de *Anisakis*

60

<400> 13

Lys Tyr Gly Glu Gln Phe Cys Ser Ser Met Leu
1 5 10

65

<210> 14

<211> 9

ES 2 294 935 A1

<212> PRT
 <213> *Anisakis*

5 <220>
 <221> Peptide
 <222> (1)..(9)
 <223> Péptido antigénico de *Anisakis*

10
 <400> 14

Cys Asn Arg Leu Gly Ala Ala Cys Ser
 1 5

15
 <210> 15
 <211> 838

20 <212> DNA
 <213> *Anisakis* spp.

<220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (1)..(838)
 <223> Fragmento nucleotídico de la SEQ ID N° 1 que codifica la secuencia antigenica SEQ ID N° 16 de *Anisakis* spp

30 <400> 15

atgatgcaca aatgcttaaa gtcggaatg gaaaatcctg gtattatgtc cacatgtgtt 60
 caaagatgatg gtactcagtt ttgcaagaac ttactgaact cgtgcacagc gtcaaccggt 120
 atgcatcttc cgtacgatgc accttgaaa atacccgagc caatcgctgc ttgcatggcc 180
 40 caaggaatga atggtggtga ccacaaacct aaggaggatg cgatggcgag atgcatacgt 240
 aaatatggtg tcacttactg caacaacatg ctagcatctt gttctgtatt gaccaatgta 300
 aattatgacc ctagtggcgg tcaaatgccg ggaatattat cggaatgcgt gactgcagaa 360
 45 acggatgaac cgagtgcaat gtgccaatgc gttcaaaagt acggtactga attctgcaag 420
 aaacgccttg catcgtgtat tgcttctacg ggtatgaatc ttcccgccac tacaccatgg 480
 50 aaactgcctc cacctgtggc tcgctgcatg cagcacgggt cacctaata gaacccgcca 540
 cagggacagg gttcaaatga cgtaatgtct caatgtattg ctagatacgg agccgaattt 600
 tgtcaacggt tagcgagatt ctgttatgca atgaacagtt tacaatatcc aggagagact 660
 55 tttgatccac agcaacagac tccaacacaa gtagcaagat gcatgaagtc agaaatggat 720
 agtccgtccg taatgtggca ctgtgtgcag aatatgggtc aagaattttg taacaagtta 780
 60 gctgccacct gttcgacaga aacgaacaca cctcttccgc aacaggatcc ttggcga 837

<210> 16
 65 <211> 279
 <212> PRT
 <213> *Anisakis* spp.

ES 2 294 935 A1

<220>

<221> Peptide

<222> (1).(279)

5 <223> secuencia antigénica aminoácídica deducida de la SEQ ID N° 15

<400> 16

10 Met Met His Lys Cys Leu Lys Ser Glu Met Glu Asn Pro Gly Ile Met
1 5 10 15

Ser Thr Cys Val Gln Arg Tyr Gly Thr Gln Phe Cys Lys Asn Leu Leu
20 25 30

15 Asn Ser Cys Thr Ala Ser Thr Gly Met His Leu Pro Tyr Asp Ala Pro
35 40 45

20 Trp Lys Ile Pro Gln Pro Ile Ala Ala Cys Met Ala Gln Gly Met Asn
50 55 60

Gly Gly Asp His Lys Pro Lys Glu Asp Ala Met Ala Arg Cys Ile Arg
65 70 75 80

25 Lys Tyr Gly Val Thr Tyr Cys Asn Asn Met Leu Ala Ser Cys Ser Val
85 90 95

Leu Thr Asn Val Asn Tyr Asp Pro Ser Gly Gly Gln Met Pro Gly Ile
100 105 110

30 Leu Ser Glu Cys Val Thr Ala Glu Thr Asp Glu Pro Ser Ala Met Cys
115 120 125

35 Gln Cys Val Gln Lys Tyr Gly Thr Glu Phe Cys Asn Lys Arg Leu Ala
130 135 140

Ser Cys Ile Ala Ser Thr Gly Met Asn Leu Pro Ala Thr Thr Pro Trp
145 150 155 160

40 Lys Leu Pro Pro Pro Val Ala Arg Cys Met Gln His Gly Ser Pro Asn
165 170 175

45 Asp Asn Arg Gly Gln Gly Gln Gly Ser Asn Asp Val Met Ser Gln Cys
180 185 190

Ile Ala Arg Tyr Gly Ala Glu Phe Cys Gln Arg Leu Ala Arg Phe Cys
195 200 205

50 Tyr Ala Met Asn Ser Leu Gln Tyr Pro Gly Glu Thr Phe Asp Pro Gln
210 215 220

55 Gln Gln Thr Pro Thr Gln Val Ala Arg Cys Met Lys Ser Glu Met Asp
225 230 235 240

Ser Pro Ser Val Met Trp His Cys Val Gln Lys Tyr Gly Gln Glu Phe
245 250 255

60 Cys Asn Lys Leu Ala Ala Thr Cys Ser Thr Glu Thr Asn Thr Pro Leu
260 265 270

65 Pro Gln Gln Asp Pro Trp Arg
275

ES 2 294 935 A1

<210> 17
 <211> 834
 <212> DNA
 5 <213> *Anisakis* spp.

 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(834)
 <223> Fragmento nucleotídico de la SEQ ID N° 1 que codifica la secuencia antigénica SEQ ID N° 18 de *Anisakis* spp

 <400> 17
 15

 atgcacaaat gcttaaagtc ggaaatggaa aatcctggta ttatgtccac atgtgttcaa 60
 20 agatatggta ctcagttttg caagaactta ctgaactcgt gcacagcgtc aaccggtagt 120
 catcttccgt acgatgcacc ttggaaaata cccgagccaa tcgctgcttg catggcccaa 180
 ggaatgaatg gtggtgacca caaacctaag gaggatgcga tggcgagatg catacgtaaa 240
 25 tatggtgtca cttactgcaa caacatgcta gcatcttggt ctgtattgac caatgtaa at 300
 tatgacccta gtggcgggtca aatgccggga atattatcgg aatgcgtgac tgcagaaacg 360
 gatgaaccga gtgcaatgtg ccaatgcggt caaaagtacg gtactgaatt ctgcaagaaa 420
 30 cgccttgcac cgtgtattgc ttctacgggt atgaatcttc ccgccactac accatggaaa 480
 ctgcctccac ctgtggctcg ctgcatgcag cacgggtcac ctaatgacaa ccgcgacag 540
 35 ggacaggggt caaatgacgt aatgtctcaa tgtattgcta gatacggagc cgaattttgt 600
 caacggttag cgagattctg ttatgcaatg aacagtttac aatatccagg agagactttt 660
 gatccacagc aacagactcc aacacaagta gcaagatgca tgaagtcaga aatggatagt 720
 40 ccgtccgtaa tgtggcactg tgtgcagaaa tatggtcaag aattttgtaa caagttagct 780
 gccacctggt cgacagaaac gaacacacct cttccgcaac aggatccttg gcga 834

 45

 <210> 18
 <211> 278
 50 <212> PRT
 <213> *Anisakis* spp.

 <220>
 55 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(278)
 <223> secuencia antigénica aminoácídica deducida de la SEQ ID N° 17

 60

 65

ES 2 294 935 A1

<400> 18

1 Met His Lys Cys Leu Lys Ser Glu Met Glu Asn Pro Gly Ile Met Ser
 5 Thr Cys Val Gln Arg Tyr Gly Thr Gln Phe Cys Lys Asn Leu Leu Asn
 10 Ser Cys Thr Ala Ser Thr Gly Met His Leu Pro Tyr Asp Ala Pro Trp
 15 Lys Ile Pro Gln Pro Ile Ala Ala Cys Met Ala Gln Gly Met Asn Gly
 20 Tyr Gly Val Thr Tyr Cys Asn Asn Met Leu Ala Ser Cys Ser Val Leu
 25 Thr Asn Val Asn Tyr Asp Pro Ser Gly Gly Gln Met Pro Gly Ile Leu
 30 Ser Glu Cys Val Thr Ala Glu Thr Asp Glu Pro Ser Ala Met Cys Gln
 35 Cys Ile Ala Ser Thr Gly Met Asn Leu Pro Ala Thr Thr Pro Trp Lys
 40 Leu Pro Pro Pro Val Ala Arg Cys Met Gln His Gly Ser Pro Asn Asp
 45 Asn Arg Gly Gln Gly Gln Gly Ser Asn Asp Val Met Ser Gln Cys Ile
 50 Ala Arg Tyr Gly Ala Glu Phe Cys Gln Arg Leu Ala Arg Phe Cys Tyr
 55 Ala Met Asn Ser Leu Gln Tyr Pro Gly Glu Thr Phe Asp Pro Gln Gln
 60 Gln Thr Pro Thr Gln Val Ala Arg Cys Met Lys Ser Glu Met Asp Ser
 65 Pro Ser Val Met Trp His Cys Val Gln Lys Tyr Gly Gln Glu Phe Cys
 70 Asn Lys Leu Ala Ala Thr Cys Ser Thr Glu Thr Asn Thr Pro Leu Pro
 75 Gln Gln Asp Pro Trp Arg
 275

65 <210> 19

<211> 20

<212> DNA

ES 2 294 935 A1

| | | |
|----|--|----|
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 5 | <223> primer | |
| | <220> | |
| | <221> primer | |
| 10 | <222> (1)..(20) | |
| | <400> 19 | |
| 15 | ttgtaaacg acggccagtg | 20 |
| | <210> 20 | |
| | <211> 20 | |
| 20 | <212> DNA | |
| | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 25 | <223> primer | |
| | <220> | |
| | <221> primer | |
| 30 | <222> (1)..(20) | |
| | <400> 20 | |
| 35 | cctttgtcga tactggtact | 20 |
| | <210> 21 | |
| | <211> 37 | |
| 40 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 45 | <223> primer | |
| | <400> 21 | |
| 50 | gagagagagt cgacatgatg cacaaatgct taaagtc | 37 |
| | <210> 22 | |
| | <211> 36 | |
| 55 | <212> DNA | |
| | <213> secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 60 | <223> primer | |
| | <220> | |
| | <221> primer | |
| 65 | <222> (1)..(36) | |

ES 2 294 935 A1

<400> 22

gagagagaaa gctttcgcca aggatcctgt tgcgga

36

5

<210> 23

<211> 22

<212> PRT

10 <213> *Anisakis* spp.

<220>

<221> PEPTIDE

15 <222> (1)..(22)

<400> 23

20 Met Arg Gly Ser His His His His His His Thr Asp Pro His Ala Ser
1 5 10 15
Ser Val Pro Arg Val Asp
20

25

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

30 <213> *Anisakis* spp.

<220>

<221> PEPTIDE

35 <222> (1)..(4)

<400> 24

40 Ser Leu Ile Ser
1

<210> 25

45

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> primer

<220>

55

<221> primer

<222> (1)..(21)

<400> 25

60

tgcaaaatg cttaaagtgc g

21

<210> 26

65

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

ES 2 294 935 A1

| | | |
|----|----------------------------|----|
| | <220> | |
| | <223> primer | |
| 5 | <220> | |
| | <221> primer | |
| | <222> (1)..(20) | |
| 10 | <400> 26 | |
| | cagctaatta agcttcgcca | 20 |
| 15 | <210> 27 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> | |
| | <223> primer | |
| 25 | <220> | |
| | <221> primer | |
| | <222> (1)..(20) | |
| 30 | <400> 27 | |
| | tgaatggtgg tgaccacaaa | 20 |
| 35 | <210> 28 | |
| | <211> 21 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 40 | <220> | |
| | <223> primer | |
| 45 | <220> | |
| | <221> primer | |
| | <222> (1)..(21) | |
| 50 | <400> 28 | |
| | tggatcaaaa gtctctcctg g | 21 |
| 55 | | |
| 60 | | |
| 65 | | |



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 294 935

② Nº de solicitud: 200601879

③ Fecha de presentación de la solicitud: **13.07.2006**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | IGLESIAS R. et al. Monoclonal Antibodies against diagnostic Anisakis simplex antigens. Parasitology Research. 1997, Vol 83, páginas 755-761. Página 756, columna 1; página 757, columna 2, párrafo 3; página 759, columnas 1-2; página 760, columna 2. | 9-11 |
| Y | | 1-8,12-21, 24-26 |
| Y | PEREZ-PEREZ J. et al. Molecular Cloning of Paramyosin, a New Allergen of Anisakis simplex. Allergy and Immunology. 2000, Vol 123, páginas 120-129. Página 121, columna 2; página 122, columnas 1-2; página 126, columna 1. | 1-8,12-21, 24-26 |
| X | LORENZO S. et al. O-glicans as a source of cross-reactivity in determinations of human serum antibodies to Anisakis simplex antigens. Clinical and Experimental Allergy. 2000, Vol 30, páginas 551-559. Página 552, columnas 1-2; página 553, columnas 1-2; página 555, tabla 2; página 557, columnas 1-2. | 22-23,27 |

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

12.03.2008

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/18 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)