

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 817**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12	(2006.01) C12N 1/19	(2006.01)
A61K 39/35	(2006.01) C12P 21/08	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)	
A61P 11/02	(2006.01)	
A61P 11/06	(2006.01)	
A61P 17/04	(2006.01)	
A61P 27/14	(2006.01)	
A61P 37/08	(2006.01)	
C07K 14/435	(2006.01)	
C07K 16/18	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2005 E 05730025 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 1743941**

54 Título: **Nuevo alérgeno de ácaro**

30 Prioridad:

09.04.2004 JP 2004116089

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.09.2014

73 Titular/es:

**NIPPON ZENYAKU KOGYO CO., LTD. (100.0%)
1-1 Aza-Tairanoue, Sasagawa Asaka-machi,
Koriyama-shi
Fukushima 963-0196, JP**

72 Inventor/es:

**TSUKUI, TOSHIHIRO;
TSUJIMOTO, HAJIME y
IWABUCHI, SHIGEHIRO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 494 817 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevo alérgeno de ácaro

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a alérgenos recombinantes de ácaro que tienen actividad alérgica y en particular se refiere a alérgenos de ácaro que causan atopía en perros. La presente invención se refiere adicionalmente a genes que codifican los alérgenos, vectores de expresión que posibilitan la expresión de los genes, transformantes obtenidos por transformación usando vectores de expresión, un método para producir los alérgenos recombinantes de ácaro, agentes terapéuticos para enfermedades alérgicas a ácaros, y agentes de diagnóstico para enfermedades alérgicas a ácaros.

15 Técnica antecedente

Los ácaros del polvo doméstico son conocidos como causas principales de enfermedades alérgicas tales como dermatitis atópica y asma bronquial. Convencionalmente, la terapia de desensibilización que usa sustancias causantes de alergias como agentes terapéuticos para enfermedades alérgicas se considera como el remedio básico más importante. En particular, la terapia de desensibilización se realiza ampliamente para enfermedades tales como polinosis, alergia al polvo doméstico, y alergias a hongos, que se inducen por antígenos tales como alérgenos inhalantes que son difíciles de evitar. Sin embargo, la terapia de desensibilización implica el riesgo de anafilaxis debido a la acción de antígenos sensibilizantes, de modo que se requiere la administración de antígenos terapéuticos seguros. Dichos antígenos seguros de sensibilización están en investigación.

Con respecto a enfermedades alérgicas a ácaros, se ha informado de tipos de ácaros, *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*, como fuentes alérgicas en el polvo doméstico (véanse los documentos no de patente 1 y 2). Los alérgenos principales de ácaro se han fraccionado a partir de estos ácaros. Se sabe que estos alérgenos de ácaro son una glucoproteína (pl 4,6 a 7,2) con un peso molecular entre 24 kD y 28 kD y/o una proteína (pl 5 a 7,2) con un peso molecular entre 14,5 kD y 20 kD contenida en la excreción de ácaros y/o cuerpos de ácaros (véanse los documentos no de patente 3 a 7).

Respecto a los genes del alérgeno del ácaro, *Der p 1* (peso molecular: 25.371) y *Der p 2* (peso molecular: 14.131) que son alérgenos principales de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Der f 1* (peso molecular: 25.191) y *Der f 2* (peso molecular: 14.021) que son alérgenos principales de *Dermatophagoides farinae* se han clonado y también se han determinado las secuencias de nucleótidos de los mismos (véanse los documentos no de patente 8 a 15). También se han preparado alérgenos recombinantes basados en estos alérgenos, y ha progresado la investigación referente a los mismos. Además, también se ha presentado la secuencia de nucleótidos de *Der f 3*, un alérgeno con un peso molecular de aproximadamente 30.000 (véase el documento no de patente 16). Además, como alérgenos de ácaro, ma 10, ma 3, ma 15, ma 29, ma 44, ma 50, ma 113, ma 114, y ma 115 (véase el documento de patente 1) también se han presentado. Además, ma 124, que ejerce reactividad cruzada fuerte con un suero anti-*Der f 2*, también se ha presentado (véase el documento de patente 2).

Además, se ha informado con respecto a perros que *Der f 15* de 98 kDa, *Der f 15* de 109 kDa (véase el documento no de patente 17), y *Der f 18* de 60 kDa (véase el documento no de patente 18) son alérgenos con los que reacciona fuertemente IgE.

Como método para diagnosticar enfermedades alérgicas a ácaros, se ha usado convencionalmente un ensayo de reacción intradérmica como método dominante, que se basa en el historial del paciente y usa extractos de polvo doméstico y/o extractos de cuerpos de ácaro. Este método (ensayo) se ha usado en combinación con un método RAST (ensayo radio alérgicoabsorbente) que implica la medición del título de anticuerpos IgE en suero (valor relativo), un ensayo de inducción por inhalación, un ensayo de provocación de membrana mucosa nasal, y similares. Sin embargo, ha seguido siendo considerablemente difícil diagnosticar directamente enfermedades alérgicas a ácaros.

Se ha realizado convencionalmente un método terapéutico de desensibilización para asma bronquial, que usa un extracto de polvo doméstico y un ácaro de polvo doméstico como alérgeno específico. Sin embargo, la composición del polvo doméstico no se ha analizado suficientemente. Además, el polvo doméstico contiene muchos tipos de impurezas que pueden inducir anafilaxis. Por tanto, las dosis de polvo doméstico en dichos casos son extremadamente limitadas. Por consiguiente, el tratamiento de desensibilización convencional puede tener efectos a niveles extremadamente bajos. Por lo tanto, se han deseado antígenos más eficaces y más seguros para el tratamiento de desensibilización. Se ha sabido convencionalmente que los alérgenos eficaces para el tratamiento de desensibilización están presentes en fracciones de excreciones de ácaros en bruto de alto peso molecular. A partir de dichas fracciones, ha sido imposible obtener alérgenos de ácaro en cantidades suficientes para el tratamiento de desensibilización. Por lo tanto, con métodos que implican la extracción y purificación de alérgenos de ácaro a partir de productos obtenidos por la cría de ácaros, es difícil conseguir un suministro estable de antígenos para tratamiento. Además, como se ha descrito anteriormente, se ha informado convencionalmente de diversos alérgenos recombinantes de ácaro con el uso de técnicas de recombinación génica. Sin embargo, no puede decirse que estos

alérgenos sean siempre eficaces para el tratamiento real. Se ha deseado la provisión de un alérgeno recombinante de ácaro con actividad más eficaz, nueva, y mayor de alérgeno de ácaro.

- 5 Documento de patente 1 publicación de patente JP (Kokai) Nº 7-112999 A (1995)
- Documento de patente 2 publicación de patente JP (Kokai) Nº 7-278190 A (1995)
- Documento no de patente 1 Allerg. Asthma, 10, 329-334 (1964)
- Documento no de patente 2 J. Allergy, 42, 14-28 (1968)
- Documento no de patente 3 J. Immunol., 125, 587-592 (1980)
- Documento no de patente 4 J. Allergy Clin. Immunol., 76, 753-761 (1985)
- 10 Documento no de patente 5 Immunol., 46, 679 - 687 (1982)
- Documento no de patente 6 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 81, 214-223 (1986)
- Documento no de patente 7 J. Allergy Clin. Immunol., 75, 686-692 (1985)
- Documento no de patente 8 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 85, 127-129 (1988)
- Documento no de patente 9 J. Exp. Med., 167, 175-182 (1988)
- 15 Documento no de patente 10 J. Exp. Med., 170, 1457-1462 (1989)
- Documento no de patente 11 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 91, 118-123 (1990)
- Documento no de patente 12 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 91, 124-129 (1990)
- Documento no de patente 13 Jpn. J. Allergol., 39, 557-561 (1990)
- Documento no de patente 14 Clinical and Experimental Allergy, 21, 25-32 (1991)
- 20 Documento no de patente 15 Clinical and Experimental Allergy, 21, 33-37 (1991)
- Documento no de patente 16 FEBS Lett., 377, 62-66 (1995)
- Documento no de patente 17 Vet. Immunol. Immunopathol, 78, 231-247 (2001)
- Documento no de patente 18 J. Allergy Clin. Immunol, 112, 79-86 (2003)

25 Descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar alérgenos recombinantes de ácaro eficaces que no contengan impurezas que induzcan anafilaxis como agentes terapéuticos o agentes de diagnóstico para enfermedades alérgicas a ácaros. Más específicamente, los objetivos de la presente invención son proporcionar genes derivados de cuerpos de ácaro y proporcionar vectores de expresión que posibiliten la expresión de los genes. Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar nuevos alérgenos de ácaro que tengan actividad alérgica, que se obtengan por expresión de genes derivados de cuerpos de ácaro. Objetivos adicionales de la presente invención son proporcionar nuevos agentes terapéuticos para enfermedades alérgicas a ácaros que contengan alérgenos recombinantes de ácaro como principios activos y proporcionar nuevos agentes de diagnóstico para enfermedades alérgicas a ácaros que contengan alérgenos recombinantes de ácaro.

Como resultado de estudios intensivos para conseguir los objetivos anteriores, los presentes inventores han descubierto nuevos alérgenos de ácaro y también han descubierto que los alérgenos ejercen excelentes efectos en el tratamiento de desensibilización. Por tanto, los presentes inventores han completado la presente invención.

Específicamente, la presente invención es como se describe a continuación.

[1] El siguiente alérgeno recombinante de ácaro (a) a (c) que tiene actividad alérgica de ácaro:

- 45 (a) un alérgeno recombinante de ácaro que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID Nº 35;
- (b) un alérgeno recombinante de ácaro que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 35, excepto en que están delecionados de 1 a 10 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID Nº 35; o
- 50 (c) un alérgeno recombinante de ácaro que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 35 calculada usando BLAST usando parámetros por defecto.

[2] Un gen que (1) codifica el siguiente alérgeno de ácaro (a) a (c) que tiene actividad alérgica de ácaro:

- 55 (a) un alérgeno de ácaro que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID Nº 35;
- (b) un alérgeno de ácaro que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 35, excepto en que están delecionados de 1 a 10 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID Nº 35; o
- 60 (c) un alérgeno recombinante de ácaro que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 35 calculada usando BLAST usando parámetros por defecto: o
- (2) comprende el siguiente ADN (d) o (e):
- (d) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID Nº 34; o
- 65 (e) un ADN que codifica una proteína que tiene actividad alérgica de ácaro e hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende una secuencia complementaria a la del ADN que comprende la

secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 34, donde el ADN (1) hibrida en presencia de NaCl 0,7 M a 1,0 M a 68 °C usando un filtro en que se inmoviliza el ADN y lavando con el uso de solución SSC 0,1 a 2 x a 68 °C, o (2) puede formar un híbrido cuando se transfiere a e inmoviliza en una membrana de nitrocelulosa por el método de transferencia de Southern y después se deja reaccionar durante una noche a 42 °C en un tampón de hibridación de formamida al 50 %, SSC 4 x, HEPES 50 mM (pH 7,0), solución de Denhardt 10 x y 10 µg/ml de ADN de esperma de salmón.

[3] El alérgeno de ácaro de acuerdo con [1] parte (c) o el gen de acuerdo con [2] parte (c), donde el nivel de homología es de al menos el 90 %.

[4] El alérgeno de ácaro o gen que codifica [3], donde el nivel de homología es de al menos el 95 %.

[5] El alérgeno de ácaro o gen de acuerdo con [3], donde el nivel de homología es de al menos el 97 %.

[6] Un vector recombinante, que contiene el gen de acuerdo con uno cualquiera de [2] a [5].

[7] Una proteína de fusión, que está compuesta por el alérgeno de ácaro de acuerdo con uno cualquiera de [1] y [3] a [5] y otra proteína.

[8] Una célula bacteriana, de levadura, de insecto, o animal, que se transforma usando el vector de expresión de acuerdo con [6].

[9] Un método para producir un alérgeno recombinante de ácaro, que comprende cultivar la célula bacteriana, de levadura, de insecto o animal de acuerdo con [8] en condiciones en que pueda expresarse el gen, causar que la célula produzca un alérgeno recombinante de ácaro, y después recoger el alérgeno recombinante de ácaro.

[10] Un método para producir un alérgeno recombinante de ácaro, que comprende cultivar una célula bacteriana, de levadura, de insecto o animal que está transformada con un vector recombinante que contiene un gen que codifica una proteína de fusión entre el alérgeno de ácaro de uno cualquiera de [2] - [5] y otra proteína en condiciones en que pueda expresarse el gen, causar que la célula produzca un alérgeno recombinante de ácaro de fusión, recoger el alérgeno recombinante de ácaro de fusión, y después eliminar la otra proteína fusionada al alérgeno.

[11] Un agente terapéutico para enfermedades alérgicas a ácaros, que contiene como principio activo el alérgeno recombinante de ácaro de acuerdo con uno cualquiera de [1] y [3] a [5], o la proteína de fusión de acuerdo con [7].

[12] Un agente de diagnóstico para enfermedades alérgicas a ácaros, que contiene como principio activo el alérgeno recombinante de ácaro de acuerdo con uno cualquiera de [1] y [3] a [5], o la proteína de fusión de acuerdo con [7].

[13] Un anticuerpo contra el alérgeno de ácaro de acuerdo con uno cualquiera de [1] y [3] a [5].

[14] El anticuerpo contra el alérgeno de ácaro de acuerdo con [13], que es un anticuerpo monoclonal.

[15] Un hibridoma, que produce el anticuerpo monoclonal de acuerdo con [14].

[16] Un método de inmunoensayo para un alérgeno de ácaro en el polvo doméstico, que usa el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [13] a [15].

[17] El método de inmunoensayo para un alérgeno de ácaro en el polvo doméstico de acuerdo con [16], que es el método ELISA.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una fotografía que muestra el resultado de electroforesis de una cadena FcεRIα de perro recombinante.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra la unión de una cadena FcεRIα de perro recombinante con IgE.

La Fig. 3 muestra el resultado de detectar IgE específica de *Dermatophagoides farinae*.

La Fig. 4 es una fotografía que muestra los resultados del análisis de transferencia de Western usando una cadena FcεRIα de perro recombinante.

La Fig. 5 es una fotografía que muestra un patrón de electroforesis 2-D (bidimensional) de un antígeno extraído de *Dermatophagoides farinae*.

La Fig. 6 muestra fotografías que muestran los resultados de electroforesis 2-D (bidimensional) y análisis de transferencia de Western de una proteína alergénica de *Dermatophagoides farinae*.

La Fig. 7-1 muestra la secuencia de nucleótidos parcial y la secuencia de aminoácidos de un gen Zen1.

La Fig. 7-2 muestra la secuencia de nucleótidos parcial y la secuencia de aminoácidos del gen Zen1 (continuación de la Fig. 7-1).

La Fig. 8-1 muestra la secuencia de nucleótidos de ADNc de longitud completa y la secuencia de aminoácidos del gen Zen1.

La Fig. 8-2 muestra la secuencia de nucleótidos de ADNc de longitud completa y la secuencia de aminoácidos del gen Zen1 (continuación de la Fig. 8-1).

La Fig. 8-3 muestra la secuencia de nucleótidos de ADNc de longitud completa y la secuencia de aminoácidos del gen Zen1 (continuación de la Fig. 8-2).

La Fig. 8-4 muestra la secuencia de nucleótidos de ADNc de longitud completa y la secuencia de aminoácidos del gen Zen1 (continuación de la Fig. 8-3).

La Fig. 9 es una fotografía que muestra el resultado de SDS-PAGE de Zen1 recombinante preparado usando *Escherichia coli* y después purificado.

La Fig. 10 es una fotografía que muestra el resultado de una reacción analizada por transferencia de Western de un anticuerpo policlonal anti-Zen1. El carril 1 muestra el resultado con respecto a Zen1 recombinante y el Carril 2

muestra el resultado con respecto a un cuerpo de ácaro.

La Fig. 11 es un gráfico que muestra la reactividad de Zen1 recombinante con IgE analizada por ELISA.

Mejor modo de realizar la invención

5

La presente invención se describirá en detalle del siguiente modo.

(1) Aislamiento de una proteína Zen1 alergénica de ácaro y determinación de secuencias parciales de la misma

10 Un alérgeno de ácaro se especifica usando IgE específica de alérgeno de ácaro obtenida de un animal clínicamente diagnosticado como que tiene alergia a ácaros. Específicamente, un alérgeno de ácaros se identifica por transferencia de Western usando suero que contiene IgE específica de alérgeno de ácaro, un extracto de ácaro, y un receptor de IgE que reconoce IgE específica de alérgeno, por ejemplo. Un alérgeno puede identificarse por un método conocido.

15

El nuevo alérgeno de ácaro identificado de este modo de la presente invención, que es una proteína Zen1, tiene un peso molecular entre 150 kDa y 200 kDa.

20

El alérgeno de ácaro identificado puede aislarse realizando electroforesis y después extrayendo el alérgeno de ácaro de una mancha de alérgeno de ácaro. En ese momento, se desea realizar electroforesis 2-D (bidimensional) para la separación completa de otras proteínas.

25

Las secuencias parciales pueden determinarse por un método conocido usando el alérgeno de ácaro extraído de este modo. Ejemplos de métodos conocidos para determinar secuencias parciales incluyen la secuenciación *de novo* basada en MS/MS y mapeo de péptidos.

(2) Preparación de clon de ADNc por RT-PCR

30

Un ADN que codifique el alérgeno de ácaro de la presente invención puede obtenerse extrayendo ARNm de un ácaro, sintetizando un ADNc de alérgeno de ácaro usando el ARNm como molde, construyendo una biblioteca de ADNc, y después seleccionando la diana.

35

Una fuente de suministro de dicho ARNm es un cuerpo de ácaro, y el ácaro es preferiblemente *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, o similares, que son ácaros del polvo doméstico. Sin embargo, los ejemplos no se limitan a ellos. Dicho ARNm puede prepararse mediante técnicas generalmente empleadas. El ARNm obtenido de este modo se usa como molde, se diseñan cebadores basados en la información de secuencia obtenida en (1) anterior, y después se sintetiza un fragmento de ADNc que codifica un alérgeno de ácaro. El fragmento obtenido de este modo se sub-clona en un vector apropiado tal como pGEM (producido por Promega). La secuencia de nucleótidos después se determina mediante un método convencional tal como un método de secuenciación cíclica.

40

Las secuencias parciales de aminoácidos del alérgeno de ácaro de la presente invención se muestran en las SEC ID N° 3 a 19. De estas, las secuencias mostradas en las SEC ID N° 3 a 7 se determinaron por secuenciación *de novo*. Se muestra una secuencia de aminoácidos N-terminal en la SEC ID N° 19. Las secuencias mostradas en las SEC ID N° 8 a 18 se determinaron por mapeo de péptidos.

45

En este documento se describe un alérgeno de ácaro que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos mostrada en las SEC ID N° 3 a 19 que representan fragmentos de la proteína Zen1, que es un alérgeno de ácaro.

50

Una secuencia de nucleótidos parcial del ADNc del gen Zen1 que codifica la proteína Zen1 se muestra en la SEC ID N° 1, y la secuencia de nucleótidos de longitud completa de la misma se muestra en la SEC ID N° 34. Una secuencia parcial de aminoácidos de la proteína Zen1 se muestra en la SEC ID N° 2, y la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la misma se muestra en la SEC ID N° 35.

55

Siempre que una proteína que comprenda dicha secuencia de aminoácidos tenga actividad alergénica de ácaro, pueden tener lugar mutaciones tales como delección, sustitución, o adición de al menos uno, y preferiblemente uno o varios, aminoácidos en la secuencia de aminoácidos.

60

Por ejemplo, puede deleccionarse al menos uno, y preferiblemente uno o varios (por ejemplo, 1 a 10 y más preferiblemente 1 a 5), aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 2 o SEC ID N° 35. Puede añadirse al menos uno, y preferiblemente uno o varios (por ejemplo, 1 a 10 y más preferiblemente 1 a 5), aminoácidos a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 2. Como alternativa, puede sustituirse al menos uno, y preferiblemente uno o varios (por ejemplo, 1 a 10 y más preferiblemente 1 a 5), aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 2 con otro u otros aminoácidos.

65

Ejemplos de dicha secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 o SEC ID N° 35 por delección, sustitución, o adición de uno o varios aminoácidos incluyen secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 85 % o más, preferiblemente un 90 % o más, más preferiblemente un 95 % o más, y particularmente preferible un 97 % o más de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 o SEC ID N° 35 calculada usando BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica del National Center for Biological Information) usando parámetros por defecto para la configuración inicial, por ejemplo.

Una proteína que tiene dicha secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 o SEC ID N° 35 por delección, sustitución, o adición de uno o varios aminoácidos es sustancialmente igual a la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 o SEC ID N° 35.

Además, ejemplos del gen de la presente invención también incluyen un ADN que es capaz de hibridar en las siguientes condiciones con un ADN que comprende una secuencia complementaria a la de un gen que tiene la secuencia de ADN mostrada en la anterior SEC ID N° 34 y que codifica una proteína que tiene actividad alergénica de ácaro. Específicamente, dichas condiciones posibilitan la identificación por hibridación en presencia de NaCl 0,7 M a 1,0 M a 68 °C usando un filtro en que se inmoviliza un ADN y lavando con el uso de una solución SSC 0,1 a 2 X (SSC 1 X comprende NaCl 150 mM y citrato sódico 15 mM) a 68 °C. Como alternativa, el gen de la presente invención es un ADN que puede formar un híbrido cuando transfiere a e inmoviliza en una membrana de nitrocelulosa por el método de transferencia de Southern y después se deja reaccionar durante una noche a 42 °C en un tampón de hibridación (formamida al 50 %, SSC 4 X, HEPES 50 mM (pH 7,0), solución de Denhardt 10 X, y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón).

También se describe un ARN que corresponde al anterior ADN o un ARN capaz de hibridar en condiciones rigurosas con el ARN y que codifica una proteína que tiene actividad alergénica de ácaro.

El vector recombinante de la presente invención es como se expone en las reivindicaciones y puede obtenerse ligando (insertando) el gen de la presente invención en un vector apropiado. Los vectores para su uso en la inserción del gen de la presente invención no están particularmente limitados siempre que puedan replicarse en hospedadores tales como células bacterianas, de levadura o animales. Ejemplos de dichos vectores incluyen un ADN plasmídico y un ADN fágico. Un ADN vector que se usa para la construcción de un vector de expresión se disemina ampliamente y se obtiene fácilmente. Ejemplos de dicho ADN vector incluyen pUC19 y pTV118 N (producidos por Takana Shuzo), pUEX2 (producido por Amersham), pGEX-4T y pKK233-2 (producidos por Pharmacia), y pMAM-neo (producido por Clontech).

Un método para construir dicho vector de expresión de la presente invención no está particularmente limitado y puede realizarse de acuerdo con un método convencional. Por ejemplo, puede insertarse un fragmento de ADNc de alérgeno de ácaro digerido con *EcoR* I en el sitio *EcoR* I en el sitio de clonación múltiple del plásmido pUC19. Además, el fragmento puede ligarse al sitio *EcoR* I del vector plasmídico pGEX-4T, de modo que pueda obtenerse un vector de expresión.

Las células bacterianas, de levadura o animales transformadas con dicho vector de expresión de la presente invención no están particularmente limitadas, siempre que puedan expresar el gen de la presente invención. Ejemplos de dichas bacterias incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Ejemplos de dichas levaduras incluyen *Saccharomyces cerevisiae* y similares. Ejemplos de dichas células animales incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células Sf21 y Sf9 que son células de ovario de *Mamestra brassicae*, células COS de mono, y fibroblastos de ratón.

Ejemplos del alérgeno recombinante de ácaro de la presente invención incluyen, además de los alérgenos de ácaro que se expresan directamente, aquellos expresados como proteínas de fusión con otras proteínas como se expone en las reivindicaciones. A partir de ahora en este documento, dichas proteínas de fusión se mencionan como alérgenos recombinantes de ácaro de fusión. Ejemplos de otras proteínas que forman dichas proteínas de fusión incluyen, aunque sin limitación particular, β-galactosidasa, glutatión S-transferasa, proteína A, y una proteína de unión a maltosa.

También se describe en este documento un fragmento peptídico que consta únicamente de una región esencial para la actividad alergénica o un fragmento peptídico que comprende una región esencial para la actividad alergénica. Además, a parte de un producto obtenido por expresión de una proteína alergénica de ácaro solamente, dicho alérgeno recombinante de ácaro puede obtenerse a partir de un producto expresado como proteína de fusión eliminando la otra u otras proteínas.

Específicamente, el alérgeno recombinante de ácaro de la presente invención se obtiene por expresión de un gen derivado de un cuerpo de ácaro y es una proteína que tiene actividad alergénica de ácaro. Aquí, "que tiene actividad alergénica de ácaro" significa que es capaz de inducir una reacción alérgica en un mamífero.

El alérgeno de ácaro de la presente invención puede producirse por los siguientes métodos. Después de completarse el cultivo de la cepa transformante anterior, se recogen los cuerpos microbianos, se suspenden en un

tampón que contiene diversos inhibidores de proteasa, y después se alteran por ultrasonificación. Se extrae una proteína localizada en membrana en los desechos celulares usando un tampón que contiene un inhibidor de proteasa tal como fluoruro de fenilmetanosulfonilo, ácido monoiodoacético, pepstatina A, o ácido etilendiaminatetraacético y un tensioactivo tal como lauril sulfato sódico (SDS), tritón X-100, o Nonidet P40. Se purifica una proteína de fusión compuesta por el alérgeno de ácaro y glutatión S-transferasa obtenida del extracto o el concentrado de cultivo por cromatografía de afinidad usando glutatión inmovilizado, cromatografía de afinidad usando anticuerpo anti-cuerpo de ácaro inmovilizado, o similares. Además, un vehículo en que se ha inmovilizado glutatión es un vehículo producido por Pharmacia. Además, un vehículo en que se ha inmovilizado un anticuerpo anti-cuerpo de ácaro es un vehículo preparado por unión covalente de un anticuerpo de conejo anti-cuerpo de ácaro contra un vehículo de Tresyl activado (por ejemplo, gel Tresyl GM (producido por Kurita Water Industries), Tresil Toyopearl (producido por Tosoh), y Tresil sepharose (producido por Pharmacia)). Además, puede obtenerse una proteína de fusión compuesta por alérgeno de ácaro y una marca His (por ejemplo, 6X His), seguido por purificación usando perlas de afinidad en las cuales se ha inmovilizado un metal, o similares.

El alérgeno recombinante de ácaro de fusión purificado se digiere con proteasa y después se fracciona por un único método o una combinación de métodos de purificación conocidos incluyendo cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía hidrófoba, cromatografía de enfoque, un método de enfoque isoelectrico, y un método de electroforesis en gel mientras tiene lugar un control con ELISA y un ensayo de liberación de histamina de leucocitos para pacientes con enfermedad alérgica a ácaros (Allergy 37, 725 (1988)).

La presente invención también abarca un agente terapéutico para enfermedades alérgicas a ácaros que contiene un alérgeno de ácaro como principio activo como se expone en las reivindicaciones. Dicho agente terapéutico se usa como agente terapéutico para diversos tipos de enfermedades alérgicas a ácaros. Aquí, "enfermedades alérgicas a ácaros" significa todas las enfermedades alérgicas que están causadas por antígenos específicos de ácaro, tales como asma bronquial atópica, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, y dermatitis atópica.

El agente terapéutico para enfermedades alérgicas a ácaros de la presente invención puede prepararse secando un alérgeno recombinante de ácaro o un fragmento peptídico del mismo purificado por el método anterior, recogiendo dicho alérgeno o fragmento peptídico en una forma de polvo, y después preparando un agente terapéutico desensibilizante para enfermedades alérgicas a ácaros, por ejemplo. Sin embargo, el método no está particularmente limitado a ello. Cuando el agente terapéutico para enfermedades alérgicas a ácaros de la presente invención se usa como agente terapéutico desensibilizante, el agente puede usarse directamente o, si fuera necesario, usarse como fármaco de combinación suplementado por un método convencional con un adyuvante usado generalmente y diversos agentes aditivos tales como un agente estabilizante, un excipiente, un agente solubilizante, un agente emulsionante, un agente tamponante, un agente calmante, un conservante, y un agente colorante. Por ejemplo, se disuelve un alérgeno recombinante de ácaro purificado en una forma de polvo en solución salina fisiológica suplementada con fenol y después se usa como solución madre para un antígeno para tratamiento de desensibilización.

El agente terapéutico para enfermedades alérgicas a ácaros de la presente invención puede administrarse por vías generales de administración tales como métodos de administración percutánea, oral, intracutánea, subcutánea, intramuscular, e intraperitoneal. Además, el agente terapéutico de la presente invención también puede usarse en un fármaco percutáneo o transmucosa tal como un trocisco, un comprimido sublingual, un colirio, un agente de pulverización intranasal, una cataplasma, una crema, y una loción. Además, la dosis y la cantidad de veces de administración del agente terapéutico para enfermedades alérgicas a ácaros de la presente invención se seleccionan apropiadamente dependiendo de la vía de administración, los síntomas, y similares, de modo que la dosis esté dentro de un intervalo de aproximadamente 20 µg o menos por vez de administración para un adulto. La administración se realiza una o varias veces a la semana.

Además, el agente terapéutico para enfermedades alérgicas a ácaros de la presente invención es útil no solamente como agente terapéutico contra enfermedades alérgicas a ácaros, sino también como agente profiláctico contra las mismas. Además, el agente terapéutico para enfermedades alérgicas a ácaros de la presente invención puede usarse de forma segura en organismos humanos sin ejercer acción inductora de anafilaxis.

El agente de diagnóstico para enfermedades alérgicas a ácaros de la presente invención es como se expone en las reivindicaciones y se usa como reactivo para diagnosticar reacciones intracutáneas contra enfermedades alérgicas a ácaros o un reactivo de titulación para diagnosticar alergias a ácaros. Cuando el agente de diagnóstico se usa como reactivo para diagnosticar reacciones intracutáneas, el reactivo se obtiene preparando un alérgeno recombinante de ácaro o un fragmento peptídico del mismo purificado por el método anterior de acuerdo con un método convencional. Por ejemplo, se seca y pulveriza un alérgeno recombinante de ácaro, se disuelve el polvo y se diluye en solución salina fisiológica que contiene fenol, y después se usa. Se emplea un método que usa el agente de diagnóstico como reactivo para diagnosticar reacciones intracutáneas de acuerdo con un método convencional.

Además, cuando el agente de diagnóstico se usa como reactivo de titulación para diagnosticar alergias a ácaros, el reactivo se prepara de forma similar por un método convencional. Por ejemplo, se disuelve apropiadamente un

alérgeno recombinante de ácaro o un fragmento peptídico del mismo y se diluye en un tampón de Hank, de modo que se usa el resultante como reactivo para titulación de liberación de histaminas. Este método se realiza generalmente por los siguientes procedimientos. Específicamente, se suspende sangre de un paciente con enfermedad alérgica a ácaros o una fracción de las células sanguíneas obtenidas por centrifugación de la sangre del paciente en un tampón. Se somete una cantidad fija de la suspensión de células sanguíneas a titulación usando un alérgeno recombinante de ácaro como reactivo de titulación. Se mide la cantidad de histamina que se libera de los vasófilos por estimulación alérgica usando HPLC [Allergy 37, 725 (1988)].

En la titulación de liberación de histaminas, se determina la cantidad de histamina que se libera basándose en el 50 % (punto de inflexión de la curva de titulación) de la cantidad máxima de liberación. Específicamente, esta titulación se caracteriza porque: (1) se mide directamente la sensibilidad al alérgeno de un paciente basándose en un título de una suspensión de células sanguíneas; y (2) después de la pre-reacción del plasma sanguíneo con un alérgeno recombinante de ácaro, el valor (valor de la curva de titulación en sangre) obtenido por titulación de la suspensión de células sanguíneas con la solución de reacción es habitualmente mayor que el valor (valor de la curva de titulación de la suspensión de células sanguíneas) obtenido titulando la suspensión de células sanguíneas con el alérgeno recombinante de ácaro. Esto se debe a la presencia de un anticuerpo IgG (anticuerpo de bloqueo) capaz de neutralizar el alérgeno en plasma sanguíneo. Por lo tanto, el título del anticuerpo de bloqueo puede obtenerse del grado al cual se ha desplazado la curva de titulación en sangre desde la curva de titulación de suspensión de células sanguíneas. La sensibilidad al alérgeno y este título de anticuerpo de bloqueo posibilitan un diagnóstico de alergia a ácaros preciso factible. Este ensayo de titulación de liberación de histaminas también es útil para controlar el efecto del tratamiento de desensibilización.

La presente invención también abarca un anticuerpo contra el alérgeno de ácaro de la presente invención o un fragmento peptídico del mismo como se expone en las reivindicaciones. Dicho anticuerpo puede obtenerse como anticuerpo policlonal o anticuerpo monoclonal por un método conocido. Dicho anticuerpo puede usarse para medir la presencia, ausencia, o similares de un alérgeno de ácaro en polvo doméstico, por ejemplo. Dicha medición puede realizarse por un método inmunológico conocido tal como ELISA. Después de dicha medición, se extrae una proteína del polvo doméstico y después se mide.

Además, se expresa la proteína alérgica recombinante de ácaro de la presente invención. Realizando un ensayo tal como un ensayo de reacción de IgE específico o un ensayo de reacción intracutáneo con un perro paciente con alergia a ácaros usando la proteína recombinante expresada de este modo, pueden confirmarse las funciones de proteína alérgica de la proteína alérgica de ácaro de la presente invención.

La presente invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos. Los ejemplos no pretender limitar el alcance de la invención.

Además, los reactivos usados en cada ejemplo fueron reactivos comerciales adquiridos de Nacalai Tesque, Wako Pure Chemical Industries, Sigma, Difco, o similares, salvo que se especifique de otro modo. Además, los reactivos para ingeniería genética, tales como enzimas de restricción se adquirieron de Takara Shuzo, Toyobo, Invitrogen, o similares y después se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[Ejemplo 1] Establecimiento de un sistema de detección de IgE

Se amplificó la región extracelular de un ADNc de cadena α de receptor de IgE (Fc ϵ R1 α) de alta afinidad de perro, excluyendo su sitio de péptido señal y que tenía sitios de las enzimas de restricción *Eco*R I y *Xho* I añadidos a la misma, por PCR. El resultante se ligo en los sitios *Eco*R I y *Xho* I del vector plasmídico de expresión de *Escherichia coli* pGEX4T-1 (producido por Amersham Biosciences) usando ADN ligasa T4. Se transformó una cepa de *E. coli* TOP10 (producida por Invitrogen) con el plásmido recombinante obtenido de este modo. La cepa transformada se cultivó a 37 °C durante una noche en un medio LB que contenía ampicilina (100 μ g/ml). Posteriormente, se subcultivó una pequeña cantidad de la cepa en un nuevo medio LB hasta que la DO a 600 nm alcanzó 1,0. A continuación, se añadió IPTG (isopropil-1-tio- β -D-galactósido) a una concentración final de 1 mM. Tres horas después, las células se recogieron y después se lavaron una vez con PBS (pH 7,4). Las células regidas de nuevo se lisaron por ultrasonificación en PBS (pH 7,4), se retiraron las fracciones insolubles por centrifugación, y después se recogieron las fracciones solubles que contenían Fc ϵ R1 α de perro fusionada a glutatión S-transferasa (GST). Posteriormente, se obtuvo Fc ϵ R1 α de perro fusionada a de las fracciones solubles usando una columna de glutatión sepharose 4B (producida por Amersham Biosciences). Se obtuvieron 1,0 mg de la proteína de fusión (GST-Fc ϵ R1 α) de 10 litros de la solución de cultivo. Se confirmó que la GST-Fc ϵ R1 α purificada obtenida mostraba una única banda de 45 kDa como resultado de SDS-PAGE (Fig. 1). La IgE recombinante de perro (producida por BETHYL) y la IgG purificada de perro se inmovilizaron en una inmunoplaaca (producida por Nalge Nunc International) con dilución en serie de factor 2 de 1,0 μ g, 0,1 μ g, 0,05 μ g, 0,025 μ g, 0,0125 μ g, y después 0,00625 μ g, para confirmar la reactividad de la GST-Fc ϵ R1 α purificada. Se confirmó que la GST-Fc ϵ R1 α purificada reaccionaba con IgE pero no reaccionaba con IgG (Fig. 2). Se inmovilizaron 4,0 μ g de un antígeno extraído de *Dermatophagoides farinae* (producido por GREER) en una inmunoplaaca (producida por Nalge Nunc International). Se hizo reaccionar suero de perro *Dermatophagoides-farinae*-positivo (suero de perro que daba positivo en ensayo para

Dermatophagoides farinae confirmado por una reacción intracutánea usando una solución antigénica de *Dermatophagoides farinae* (producida por GREER) diluida 50 veces usando solución salina fisiológica) con el antígeno. Después se añadió GST-FcεRIα marcada con biotina. Además, basándose en la reacción de desarrollo de color resultante de la adición de estreptavidina conjugada con peroxidasa (producida por Jackson Immuno Research) y un sustrato, se confirmó que GST-cadena FcεRIα reconocía IgE específica de alérgeno de ácaro (Fig. 2). Además, se inmovilizaron 4,0 µg de un antígeno extraído de *Dermatophagoides farinae* (producido por GREER) en una inmunoplaqueta (producida por Nalge Nunc International). El suero de perro obtenido por inmunización con el antígeno extraído de *Dermatophagoides farinae* se hizo reaccionar con el antígeno. Se confirmó que GST-FcεRIα no reaccionaba ni con suero de perro *Dermatophagoides-farinae*-positivo sometido a tratamiento por calor a 56 °C durante 1 hora ni con IgG de perro purificada, pero reaccionaba con la IgE recombinante de perro (producida por BETHYL). Se consideró que GST-FcεRIα reconocía IgE específica de alérgeno (Fig. 3). En la Fig. 3, "-" indica suero no tratado a 56 °C durante 1 hora, "+" indica suero tratado a 56 °C durante 1 hora, y "cont." indica suero no inmunizado.

[Ejemplo 2] Análisis de un alérgeno de ácaro principal por transferencia de Western

Se realizó análisis de transferencia de Western usando los sueros y muestras de plasma sanguíneo de ocho perros. Los ocho perros habían desarrollado dermatitis atópica y se les había diagnosticado con alergias a ácaros basándose en reacciones intracutáneas usando la solución de un antígeno extraído de un alérgeno de *Dermatophagoides farinae* (producido por GREER) y el método ELISA usando la cadena FcεRIα recombinante de perro establecida en el Ejemplo 1. Se añadió β-mercaptoetanol a 100,0 µl de la solución de un antígeno extraído de *Dermatophagoides farinae* hasta una concentración final de 50,0 µl/ml. Se añadieron 200 µl del tampón de muestra de Laemmli preparado de este modo (producido por BIO-RAD), seguido de tratamiento por calor a 100 °C durante 5 minutos. El resultante se aplicó a gel de poliacrilamida (PAGEL; producido por ATTO) con una concentración de gel entre el 5 % y el 20 %, y después se realizó electroforesis. Después de completarse la electroforesis, el resultante se transfirió a una membrana de PVDF (Hybond-P; producida por Amersham Biosciences). La membrana se dejó en reposo at 4 °C durante una noche en una solución de bloqueo (PBST (preparada añadiendo Tween20 a PBS hasta una concentración final del 0,1 %) suplementada con leche desnatada al 5 %). Después de que la membrana se hubiera lavado en PBST durante 10 minutos, cada muestra de suero o plasma sanguíneo de perro se diluyó 10 veces en una solución de bloqueo. Cada muestra en solución diluida se añadió a la membrana, seguido de 3 horas de reacción a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados (10 minutos cada uno) con PBST. Se diluyó FcεRIα de perro marcada con biotina con una solución de bloqueo y después la solución diluida se añadió a la membrana, seguido de 2 horas de reacción a temperatura ambiente. Después de 3 lavados (10 minutos cada uno) con PBST, se añadió un conjugado de estreptavidina-HRP (producido por Amersham Biosciences) diluido 10.000 veces con PBST a la membrana, seguido de 1 hora de reacción a temperatura ambiente. Después de 5 lavados (10 minutos cada uno) con PBST, se añadió una solución de reacción para un sistema de detección de transferencia de Western ECL Plus (producido por Amersham Biosciences) a la membrana, seguido de 5 minutos de reacción a temperatura ambiente. Después se detectaron las señales usando película de rayos X (Hyperfilm ECL; producido por Amersham Biosciences). Como resultado, se detectó una proteína que mostraba una fuerte reacción entre una banda correspondiente a un peso molecular de 150 kDa y una banda correspondiente a la misma de 250 kDa (Fig. 4). En la Fig. 4, una banda indicada con una flecha corresponde a la proteína que muestra una fuerte reacción y que tiene un peso molecular entre 150 kDa y 250 kDa. En la Fig. 4, los números 1 a 8 por separado indican ocho perros, y "ct." indica un suero negativo.

[Ejemplo 3] Análisis de una proteína alergénica de ácaro por electroforesis 2-D (bi-dimensional)

Se aisló una proteína alergénica con un peso molecular entre 150 kDa y 250 kDa, con que IgE había reaccionado fuertemente, se aisló por electroforesis 2-D (bi-dimensional). La electroforesis 2-D (bi-dimensional) se realizó usando una célula Protean IEF (producida por BIO-RAD). Se disolvieron 1,0 mg de un antígeno extraído de *Dermatophagoides farinae* (producido por GREER) en 1,0 ml de un tampón de hinchamiento (kit 2-D starter; producido por BIO-RAD). Se hincharon 300 µl de la solución obtenida de este modo en condiciones activas (50 V, 20 °C, y 12 horas) usando gel IPG Ready strip de 17 cm de longitud (pH 4-7; producido por BIO-RAD) y una cubeta de enfoque. Después del hinchamiento, se realizó el enfoque en las siguientes condiciones. En primer lugar, se realizó un procedimiento para retirar el exceso de sales en la etapa 1 (250 V, 20 minutos, y 20 °C). En la etapa 2, se elevó la tensión de 250 V a 10.000 V durante 6 horas. En la etapa 3, se realizó el enfoque con una tensión de 10.000 V y sumando las horas de tensión 60.000 VH. Antes de la electroforesis 2-D (bi-dimensional), se agitó suavemente el gel IPG ready strip durante 10 minutos usando tampón de equilibrado de SDS-PAGE I (urea 6 M, Tris 0,375 M pH 8,8, SDS al 2 %, glicerol al 20 %, y DTT al 2 % (p/v); producido por BIO-RAD). Posteriormente, el gel adicionalmente se agitó suavemente durante 10 minutos usando tampón de equilibrado de SDS-PAGE II (urea 6 M, Tris 0,375 M pH 8,8, SDS al 2 %, glicerol al 20 %, y yodoacetamida al 2,5 % (p/v); producido por BIO-RAD), realizando de este modo el equilibrado. Se hizo que el gel IPG ready strip equilibrado se adhiriera estrechamente a gel PII ready (8-16 %; producido por BIO-RAD) usando agarosa de baja fusión al 1 % (v/w) (producida por BIO-RAD). La electroforesis se realizó con una corriente constante de 40 mA (con tensión inicial de 135 V y tensión final de 400 V) durante aproximadamente 3 horas. Después de la electroforesis, el gel se tiñó usando Bio-Safe (producido por BIO-RAD), de modo que pudo hacerse el análisis de patrones para la mancha de proteína (Fig. 5).

[Ejemplo 4] Identificación de una mancha de alérgeno por análisis de transferencia de Western

Después de la electroforesis 2-D (bi-dimensional), la mancha de proteína se transfirió a una membrana de PVDF (Hybond-P; producida por Amersham Biosciences). La membrana se dejó en reposo a 4 °C durante una noche en una solución de bloqueo (PBST (preparada añadiendo Tween20 a PBS hasta una concentración final del 0,1 %) suplementada con leche desnatada al 5 %). Después de haber lavado la membrana con PBST durante 10 minutos, se diluyó 10 veces una muestra de suero o plasma sanguíneo de perro usando una solución de bloqueo. La solución diluida de este modo se añadió a la membrana, seguido de 3 horas de reacción a temperatura ambiente. Después de 3 lavados (10 minutos cada uno) con PBST, se diluyó FcεRIα de perro marcada con biotina con una solución de bloqueo. La FcεRIα de perro marcada con biotina diluida se añadió a la membrana, seguido de 2 horas de reacción a temperatura ambiente. Después de 3 lavados (10 minutos cada uno) con PBST, se añadió un conjugado de estreptavidina-HRP (producido por Amersham Biosciences) diluido 10.000 veces con PBST a la membrana. Se realizó una hora de reacción a temperatura ambiente. Después de 5 lavados (10 minutos cada uno) con PBST, se añadió una solución de reacción para un sistema de detección de transferencia de Western ECL plus (producido por Amersham Biosciences) a la membrana, seguido de 5 minutos de reacción a temperatura ambiente. Las señales se detectaron usando película de rayos X (Hyperfilm ECL; producido por Amersham Biosciences). Como resultado, se detectó una mancha que mostraba una fuerte reacción entre una banda correspondiente a un peso molecular de 150 kDa y una banda correspondiente a la misma de 250 kDa y a un pH de aproximadamente 4,5. Por tanto, se obtuvo la mancha correspondiente a la proteína alérgica (Zen1) de la presente invención (Fig. 6). En la Fig. 6: la Fig. 6-1 izquierda superior muestra el patrón de electroforesis 2-D (bi-dimensional) (pH 4 a 7) de *Dermatophagoides farinae*; la Fig. 6-2 derecha superior muestra el resultado de análisis de transferencia de Western (pH 4 a 7) usando el suero *Dermatophagoides farinae*-positivo de un perro paciente que desarrolló dermatitis atópica; la Fig. 6-3 izquierda inferior muestra el patrón de electroforesis 2-D (bi-dimensional) (pH 3,9 a 5,1) de *Dermatophagoides farinae*; y la Fig. 6-4 derecha inferior muestra la mancha de reacción (donde la mancha aparece como una mancha circular negra sobre la parte superior en la figura y se indica con una flecha) obtenida por análisis de transferencia de Western (pH 3,9 a 5,1) usando el suero *Dermatophagoides farinae*-positivo de un perro paciente que desarrolló dermatitis atópica, en comparación con el patrón de electroforesis 2-D (bi-dimensional). Se observó una fuerte reacción para la mancha indicada con la flecha.

[Ejemplo 5] Análisis de proteoma de la proteína Zen1

La mancha de la proteína Zen aislada por electroforesis 2-D (bi-dimensional) se escindió del gel y después se realizó análisis MS/MS. Pudieron obtenerse muchos datos MS/MS, pero no se confirmaron aciertos. Cinco péptidos que se consideraba que eran nuevas proteínas se sometieron al método de secuenciación *de novo*, de modo que se determinaron las secuencias de aminoácidos (SEC ID N° 3 a 7) (Tabla 1). Se realizó una búsqueda BLAST para estas secuencias de aminoácidos, pero no se obtuvieron aciertos claros.

Tabla 1

Secuencia parcial 415	: MKSLLNEANELLK
Secuencia parcial 445	: SAQDVLEK
Secuencia parcial 847	: FMQSSLNEADELLR
Secuencia parcial 448	: LPDSDLKDELAK
Secuencia parcial 491	: LPDSDLKNELAEK
Secuencias parciales de aminoácidos de Zen1 determinadas por el método de secuenciación <i>de novo</i> .	

[Ejemplo 6] Análisis de mapeo de péptidos de la proteína Zen1

La mancha de la proteína Zen1 aislada por electroforesis 2-D (bi-dimensional) se escindió del gel. Se preparó un mapa de péptidos y después se realizó la secuenciación de aminoácidos para 8 picos. Como resultado, se determinaron las secuencias (SEC ID N° 8 a 18) de 11 fragmentos de aminoácidos (Tabla 2). Se realizó una búsqueda BLAST, pero no se obtuvieron aciertos claros.

Tabla 2

Secuencia parcial 21	: MYNHFLEAY
Secuencia parcial 28	: IAHFLELE
Secuencia parcial 32	: IAHFELE
Secuencia parcial 23-1	: KFQSSLNEAN
Secuencia parcial 23-2	: IAHLESE(T)
Secuencia parcial 24	: KFQSSLN(E)A
Secuencia parcial 22	: DAQLEXE
Secuencia parcial 9-1	: SAQDVSL
Secuencia parcial 9-2	: RNEMNE
Secuencia parcial 20-1	: MFQSSLNKADFD

Secuencia parcial 20-2 : DLARDVXL

Secuencias de aminoácidos correspondientes a picos
obtenidos por mapeo de péptidos de Zen 1

[Ejemplo 7] Análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal de la proteína Zen1

- 5 La mancha de proteína Zen1 aislada por electroforesis 2-D (bi-dimensional) se escindió del gel. La secuencia de aminoácidos N-terminal (SEC ID N° 19) de la proteína Zen1 se determinó por un método convencional usando un sistema de secuenciación de proteínas HP G1005A (Tabla 3). Se realizó una búsqueda BLAST para la secuencia, pero no se obtuvieron aciertos claros.

Tabla 3

Secuencia N-terminal : DNRDDVLKQTEE
Secuencia de aminoácidos N-terminal de Zen1

10

[Ejemplo 8] Extracción del ARN total de ácaro y separación del ARNm poli(A) de ácaro

- 15 Se colocaron cuerpos de ácaro sin tratar obtenidos por cultivo y crecimiento de *Dermatophagoides farinae* de acuerdo con un método convencional en aproximadamente 2,0 l de una solución salina saturada. La solución se agitó bien y después se dejó en reposo durante 30 minutos. Los cuerpos de ácaro en el sobrenadante se depuraron usando un colador, se lavaron usando solución salina fisiológica, y después se secaron. Se sometieron 1,0 g de cuerpos de ácaro a extracción de ARN total y separación de ARNm poli(A) de ácaro usando un kit FastTrack 2.0 (producido por Invitrogen) de acuerdo con el manual del kit.

20 [Ejemplo 9] Síntesis de ADNc de ácaro

Se realizó reacción de transcripción inversa usando 100 ng del ARNm poli(A) de ácaro separado en el Ejemplo 8 como molde y un kit de síntesis de ADNc (ReverTraAce- α -; producido por Toyobo) de acuerdo con el manual del kit.

25 [Ejemplo 10] Amplificación del gen Zen 1 por PCR

- Basándose en la secuencia de aminoácidos N-terminal de la proteína Zen1, se diseñaron los cebadores N-1 (5' - GAYGAYGTNTTAAARCACACNGARGAR - 3' (SEC ID N° 20): Y = C o T, N = A o C o G o T, y R = A o G) y N-2 (5' - GAY GAY GTN CTN AAR CAR ACN GAR GAR - 3' (SEC ID N° 21): Y = C o T, N = A o C o G o T, y R = A o G) como cebadores con sentido. Además, se diseñaron 12 cebadores (SEC ID N° 22 a 33) basándose en las secuencias de aminoácidos obtenidas por el método de secuenciación *de novo* (Tabla 4) como cebadores inversos. Con el uso de 10 μ g del ADNc de ácaro sintetizado en el Ejemplo 9 como molde, polimerasa Ex taq (producida por TaKaRa Bio), y cada muestra preparada de acuerdo con el manual, se realizó tratamiento de desnaturalización térmica a 94 °C durante 2 minutos y se realizaron 35 ciclos de reacción, cada uno de los cuales constaba de 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 2 minutos, y 72 °C durante 3 minutos. Después de realizar reacción adicional a 72 °C durante 9 minutos, la muestra se almacenó a 4 °C. Se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 1.000 pb cuando se realizó PCR usando un cebador inverso 415-4 (5' - RTTNAGNAGRTCYTTNGCRCTCYTT - 3' (SEC ID N° 25): N = A o C o G o T, R = A o G, e Y = C o T). Se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 880 pb cuando se realizó PCR usando 491-2 (5' - RTT RTC NGC NAG RTC YTT RTT - 3' (SEC ID N° 29): N = A o C o G o T, R = A o G, e Y = C o T).

Tabla 4

N-1	: 5' - GAY GAY GTN TTR AAR CAR ACN GAR GAR - 3'
N-2	: 5' - GAY GAY GTN CTN AAR CAR ACN GAR GAR - 3'
415-1	: 5' - RTT RAA RAA RTC YTT NGC RTC YTT RAA - 3'
415-2	: 5' - RTT NAG RAA RTC YTT NGC RTC YTT - 3'
415-3	: 5' - RTT RAA NAG RTC YTT NGC RTC YTT - 3'
415-4	: 5' - RTT NAG NAG RTC YTT NGC RTC YTT - 3'
445-1	: 5' - RTT RTC RAA NAC YTC RTG NGC - 3'
445-2	: 5' - RTT RTC NAG NAC YTC RTG NGC - 3'
491-1	: 5' - RTT RTC NGC RAA RTC YTT RTT - 3'
491-2	: 5' - RTT RTC NGC NAG RTC YTT RTT - 3'
448-1	: 5' - RTT NGC RAA RTC YTC RTT RAA YTC - 3'
448-2	: 5' - RTT NGC NAG RTC YTC RTT RAA YTC - 3'
448-3	: 5' - RTT NGC RAA RTC YTC RTT NAG YTC - 3'
448-4	: 5' - RTT NGC NAG RTC YTC RTT NAG YTC - 3'

Mezcla de secuencias cebadoras sintetizadas para amplificación del gen Zen 1. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1000 pb cuando se realizó PCR usando N-1 y 415-4. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 880 pb cuando se realizó PCR

usando N-1 y 491-2.
N=A o C o G o T, R=A o G, Y=C o T

[Ejemplo 11] Clonación del gen Zen 1

El fragmento de ADN amplificado usando los cebadores N-1 y 415-4 en el Ejemplo 10 se recogió del gel de agarosa (SUPREC-O1 producido por TaKaRa). El fragmento de ADN se ligó al sitio de clonación del vector pGEM-T Easy (producido por Promega) usando la ADN ligasa T4, transformando de este modo el hospedador *Escherichia coli* TOP10 (producido por Invitrogen). Específicamente, se mezclaron células competentes de *Escherichia coli* y un plásmido y después la mezcla se sometió a tratamiento de temperatura en hielo durante 30 minutos, a 42 °C durante 30 segundos, y en hielo durante 2 minutos. El resultante después se suspendió en un medio SOC (triptona al 2 %, extracto de levadura al 0,5 %, NaCl al 0,05 %, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, y glucosa 20 mM), seguido de 1 hora de incubación a 37 °C. Posteriormente, las *Escherichia coli* transformadas se cultivaron a 37 °C durante una noche en un medio de agar LB (extracto de levadura al 1 %, triptona al 0,5 %, y NaCl al 1 %) suplementado con 50 µg/ml de ampicilina, obteniendo de este modo colonias de *Escherichia coli*. Se seleccionaron los clones blancos que se pensaba que contenían el fragmento insertado. Los clones se cultivaron durante una noche en un medio LB suplementado con 50 µg/ml de ampicilina. El ADN plasmídico se purificó usando un kit GFX (marca registrada) Micro Plasmid Prep (producido por Amersham Bioscience). La reacción de secuenciación se realizó usando un kit de secuenciación cíclica con cebador colorante (producido por Amersham) y después se realizó análisis de secuencia de nucleótidos usando un secuenciador de ADN de fluorescencia (producido por Shimadzu Corporation). Además, se hizo una determinación final cuando se halló que las secuencias de nucleótidos de 3 clones coincidían completamente tras el análisis de secuencia de nucleótidos de los mismos (Fig. 7-1 y Fig. 7-2).

[Ejemplo 12] Análisis del gen Zen1

El gen Zen1 clonado en el Ejemplo 11 se analizó usando el software Genetyx-win ver.6 (producido por Software Development). La cantidad de bases fue de 1020 pb y la cantidad de restos aminoácidos fue de 340 (Fig. 7-1, Fig. 7-2, y SEC ID N° 1 y 2). Se realizó una búsqueda BLAST para la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del gen, pero no se obtuvieron aciertos claros. Se pensó que el gen Zen1 era un nuevo gen.

[Ejemplo 13] Aislamiento del ADNc de Zen1 de longitud completa

Se aisló el ADNc de longitud completa por el método RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc). Se extrajo el ARN total de los cuerpos de ácaro usados en el Ejemplo 8 usando un kit de aislamiento de ARN total SV (producido por Promega). Se preparó un molde para RACE usando un kit GeneRacer (marca registrada) (producido por Invitrogen) de acuerdo con el manual del kit. Además, basándose en las secuencias parciales de Zen1 obtenidas en el Ejemplo 12, se sintetizaron cebadores para la 1ª PCR y la PCR anidada para amplificación de los extremos 5' y 3' (Tabla 5). La reacción de amplificación para los extremos 5' y 3' se realizó del siguiente modo. A 1,0 µl del molde para RACE preparado anteriormente, se añadieron 3,0 µl de cada uno de los cebadores 5' y 3' incluidos en un kit GeneRacer (marca registrada), 1,0 µl de una solución de mezcla de dNTP (10 mM cada uno), 5,0 µl de tampón de reacción de PCR de ADNc 10 x incluido en la mezcla de polimerasa de ADNc Advantage (producido por CLONTECH), 1,0 µl de mezcla de polimerasa de ADNc Advantage, y 1,0 µl de cada uno de los cebadores específicos de gen para la 1ª PCR sintetizados anteriormente y ajustados a 10 µM. Entonces se ajustó el volumen de la solución resultante a 50,0 µl usando agua destilada esterilizada. La amplificación génica se realizó usando un método de PCR Touchdown. La solución de muestra preparada se sometió a desnaturalización térmica a 94 °C durante 1 minuto, 5 ciclos de reacción, cada uno de los cuales constaba de 94 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 4 minutos, 5 ciclos de reacción, cada uno de los cuales constaba de 94 °C durante 30 segundos y 70 °C durante 4 minutos, 25 ciclos de reacción final, cada uno de los cuales constaba de 94 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 4 minutos, y después almacenamiento a 4 °C. Después de completarse la 1ª PCR, a 1,0 µl de cada una de las soluciones de reacción de amplificación del extremo 5' y 3', se añadieron 1,0 µl de cada cebador 5' y cebador 3' para la PCR anidada incluidos en un kit GeneRacer (marca registrada), 1,0 µl de una solución de mezcla de dNTP (10 mM cada uno), 5,0 µl de tampón de reacción de PCR de ADNc 10 x incluido en la mezcla de polimerasa de ADNc Advantage (producido por CLONTECH), 1,0 µl de mezcla de polimerasa de ADNc Advantage, y 1,0 µl de cada uno de los cebadores específicos de gen para la 1ª PCR sintetizados anteriormente y ajustados a 10 µM. Entonces se ajustó el volumen de la solución resultante a 50,0 µl usando agua destilada esterilizada. La amplificación génica se realizó usando el método de PCR Touchdown anterior. Los fragmentos amplificados obtenidos de este modo de los extremos 5' y 3' se confirmaron por electroforesis usando gel de agarosa al 1,0 %. Estos fragmentos se escindieron y después se recogieron (SUPREC-01 producido por TaKaRa). Los fragmentos se ligaron al sitio de clonación del vector pGEM-T Easy (producido por Promega) usando ADN ligasa T4, transformando de este modo el hospedador *Escherichia coli* TOP10 (producido por Invitrogen). Específicamente, se mezclaron células competentes de *Escherichia coli* y un plásmido y después la mezcla se sometió a tratamiento de temperatura en hielo durante 30 minutos, a 42 °C durante 30 segundos, y en hielo durante 2 minutos. El resultante después se suspendió en un medio SOC (triptona al 2 %, extracto de levadura al 0,5 %, NaCl al 0,05 %, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, y Glucosa 20 mM), seguido de 1 hora de incubación a 37 °C. Posteriormente, las *Escherichia coli* transformadas se cultivaron a 37 °C durante una noche en un medio de agar LB (extracto de levadura al 1 %, triptona al 0,5 %, y NaCl al 1 %)

suplementado con 50 µg/ml de ampicilina, obteniendo de este modo colonias de *Escherichia coli*. Se seleccionaron las colonias blancas que se pensaba que contenían los fragmentos insertados. Los clones se cultivaron durante una noche en un medio LB suplementado con 50 µg/ml de ampicilina. El ADN plasmídico se purificó usando un kit GFX (marca registrada) Micro Plasmid Prep (producido por Amersham Bioscience). La reacción de secuenciación se realizó usando un kit de secuenciación cíclica con cebador colorante (producido por Amersham) y después se realizó análisis de secuencia de nucleótidos usando un secuenciador de ADN de fluorescencia (producido por Shimadzu Corporation). Además, se hizo una determinación final cuando se halló que las secuencias de nucleótidos de 3 clones coincidían completamente tras el análisis de los mismos. Como resultado, pudo determinarse la secuencia de nucleótidos del extremo 5' y la del extremo 3' de Zen1 (Fig. 8-1 a Fig. 8-4 y SEC ID N° 34 y 35).

Tabla 5

Nombre del cebador	Secuencia	Propósito de uso
Zen1 RS-1 :	5' - AAT TAC AAA CAT GAG TTA GAA - 3'	3' RACE 1ª PCR
Zen1 RS-2 :	5' - GAA TTG TTG ACA ATG TTC AAA - 3'	3' RACE PCR anidada
Zen1 RR-1 :	5' - GAT TTC CAA TTT CAA ATC TGA - 3'	5' RACE 1ª PCR
Zen1 RR-2 :	5' - CTT TTC ACC TAC ATC CTG GGC - 3'	5' RACE PCR anidada

(Desde arriba, SEC ID N° 36, 37, 38, y 39)
Cebadores usados en el método RACE y las secuencias de los mismos

[Ejemplo 14] Purificación de Zen1 recombinante

El ADNc de Zen1 obtenido en el Ejemplo 13 al cual se habían añadido sitios para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I se amplificó por PCR. El producto de amplificación se ligó a los sitios *Bam*HI y *Xho*I del vector plasmídico de expresión de *Escherichia coli* pGEX4T-1 (producido por Amersham Biosciences) usando ADN ligasa T4. La cepa de *E. coli* TOP10 (producida por Invitrogen) se transformó con el plásmido recombinante obtenido de este modo. La cepa transformada se cultivó a 37 °C durante una noche en un medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina. Se subcultivó una pequeña cantidad de la cepa en un nuevo medio LB hasta que la DO a 600 nm alcanzó 1,0. A continuación, se añadió IPTG (isopropil-1-tio-β-D-galactósido) hasta una concentración final de 1 mM. Tres horas después, las células se recogieron y después se lavaron una vez con PBS (pH 7,4). Las células recogidas de nuevo se lisaron por ultrasonificación en PBS (pH 7,4), se retiró una fracción por centrifugación, y después se recogió una fracción soluble que contenía Zen1 fusionada a glutatión S-transferasa (GST). Posteriormente, Zen1 fusionada a GST se obtuvo de la fracción soluble usando una columna de glutatión sepharose 4B (producida por Amersham Biosciences). Se añadió trombina (producida por Amersham Biosciences) en una cantidad 1/100 de la de la proteína de fusión a una solución que contenía un producto de fusión purificado (es decir, Zen1 fusionada a GST), seguido de 20 horas de reacción a 22 °C. Por tanto, se separó GST de Zen1. Posteriormente, se retiró la trombina usando Benzamidina Sepharose (producido por Amersham Biosciences) y después se purificó una Zen1 recombinante. La Zen1 purificada obtenida de este modo mostró una única banda correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 60 kDa confirmado por SDS-PAGE (Fig. 9).

[Ejemplo 15] Preparación de un anticuerpo policlonal anti-Zen1 y análisis de la reactividad del anticuerpo con la proteína de ácaro

Se inmunizaron seis ratones (BALB/c, hembra, 4 semanas de edad) 5 veces con la Zen1 recombinante purificada en el Ejemplo 14 a intervalos de 1 semana. Posteriormente, se recogió sangre de los ratones, se separaron los sueros, y después se analizó la reacción del anticuerpo IgG por ELISA. El ELISA se realizó del siguiente modo. Se inmovilizaron por separado 1,0 µg de la Zen1 recombinante y 4,0 µg de un antígeno extraído de *Dermatophagoides farinae* (producido por GREER) en inmunoplasmas (producidas por Nalge Nunc International), seguido de 1 hora de bloqueo a 37 °C usando una solución de bloqueo (preparada añadiendo Tween20 a PBS suplementado con FBS al 10 % hasta una concentración final del 0,05 %). Cada muestra de suero de ratón se diluyó 1000 veces con una solución de bloqueo y después se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar cada inmunoplasma, se hizo reaccionar un anticuerpo monoclonal de cabra marcado con HRP anti-IgG de ratón (producido por ZYMED) diluido 2000 veces con una solución de bloqueo con las mismas. Después de lavar cada inmunoplasma, se añadieron 100 µl de una solución de sustrato enzimático (solución ABTS) a cada pocillo, seguido de 10 minutos de reacción a 37 °C. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 100 µl de una solución de fluoruro sódico al 0,32 % a cada pocillo. Se midió la absorbancia de cada pocillo a 414 nm usando un inmunolector (BioRad). Después de confirmar la reacción de IgG con el sujeto relevante por ELISA, se determinó que el sujeto era un anticuerpo policlonal contra Zen1.

Se analizó la reactividad de IgG ratón con el anticuerpo policlonal (la Zen1 recombinante) y lo mismo con respecto a cuerpos de ácaro por transferencia de Western. Se prepararon 200 µl de un tampón de muestra de Laemmli (producido por BIO-RAD) añadiendo β-mercaptoetanol hasta una concentración final de 50,0 µl/ml a 100,0 µl de la solución de proteína Zen1 recombinante ajustada a 50 µg/ml y 100,0 µl de la solución de un antígeno extraído de *Dermatophagoides farinae*. Después de tratamiento por calor a 100 °C durante 5 minutos, el resultante se aplicó a gel de poliacrilamida (PAGE; producido por ATTO) con una concentración de gel entre el 5 % y el 20 %. Por tanto, se realizó electroforesis. Después de completarse la electroforesis, el resultante se transfirió a una membrana de

PVDF (Hybond-P; producida por Amersham Biosciences). La membrana se dejó en reposo a 4 °C durante una noche en una solución de bloqueo (PBST (preparada añadiendo Tween20 a PBS hasta una concentración final del 0,1 %) suplementada con leche desnatada al 5 %). La membrana se lavó con PBST durante 10 minutos. Se diluyó un anticuerpo monoclonal de cabra marcado con HRP anti-IgG de ratón (producido por ZYMED) 20.000 veces con PBST, y después la solución diluida se añadió a la membrana, seguido de 2 horas de reacción a temperatura ambiente. Después de 5 lavados (10 minutos cada uno) con PBST, se añadió la solución de reacción de un sistema de detección de transferencia de Western ECL Plus (producido por Amersham Biosciences) a la membrana, seguido de 5 minutos de reacción a temperatura ambiente. Las señales se detectaron usando película de rayos X (Hyperfilm ECL; producido por Amersham Biosciences). Como resultado, se detectó una señal que indicaba la reacción con Zen1 recombinante con un peso molecular de aproximadamente 60 kDa y una señal que indicaba la reacción con Zen1 de tipo natural con un peso molecular entre 150 kDa y 250 kDa (Fig. 10). Por consiguiente, se confirmó que el ADNc de Zen1 de longitud completa aislado en el Ejemplo 13 codifica dicha proteína alergénica de cuerpos de ácaro con un peso molecular entre 150 kDa y 250 kDa.

[Ejemplo 16] Análisis de reactividad con IgE de Zen1 recombinante

Se evaluó la alergenicidad de Zen1 recombinante purificada en el Ejemplo 14 por ELISA. Se inmovilizaron 1,0 µg de Zen1 recombinante en una inmunoplaaca (producida por Nalge Nunc International K.K.), seguido de bloqueo a 37 °C durante 1 hora con una solución de bloqueo (preparada añadiendo Tween20 a PBS suplementado con FBS al 10 % hasta una concentración final del 0,05 %). Se hicieron reaccionar los sueros de nueve perros que dieron positivo en ensayo para *Dermatophagoides farinae* (sueros de perros que dieron positivo en ensayo para *Dermatophagoides farinae* confirmado por reacción intracutánea usando una solución antigénica de *Dermatophagoides farinae* (producida por GREER) diluida 50 veces usando solución salina fisiológica)) con un suero de perro de control negativo. Se añadió GST-FcεRIα marcada con biotina y después se hizo que tuviera lugar una reacción de desarrollo de color mediante la adición de estreptavidina conjugada con peroxidasa (producido por Jackson Immuno Research) y una solución de sustrato enzimático (solución ABTS). La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 100 µl de una solución de fluoruro sódico al 0,32 % por pocillo. Se midió la absorbancia de cada pocillo a 414 nm usando un inmunoelector (BioRad). Específicamente, se analizó la reacción de IgE sérica (de nueve perros que habían dado positivo en ensayo para ácaros confirmado por reacción intracutánea de este procedimiento y del perro negativo (control)) a Zen1 recombinante por un sistema ELISA usando FcεRIα recombinante de perro. Como resultado, se confirmaron valores por encima del valor para el perro negativo (indicado con una línea discontinua). Por lo tanto, se confirmó que Zen1 recombinante es una proteína alergénica que reacciona con IgE (Fig. 11).

Aplicabilidad industrial

La presente invención hace posible proporcionar alérgenos recombinantes de ácaro seguros y eficaces como agentes terapéuticos o agentes de diagnóstico para enfermedades alérgicas a ácaros, que no contienen impurezas que inducen anafilaxis.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NIPPON ZENYAKU KOGYO LTD.

<120> Nuevo alérgeno de ácaro

<130> PH-2409-PCT

<150> JP2004-116089

<151> 09-04-2004

<160> 39

<170> PatentIn Ver. 2. 1

<210> 1

<211> 1022

<212> ADN

<213> *Dermatophagoides farinae*

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1020)

<400> 1

gac	gat	gta	tta	aag	cag	act	gag	gag	cct	att	aaa	agt	gcc	cag	gat	48
Asp	Asp	Val	Leu	Lys	Gln	Thr	Glu	Glu	Pro	Ile	Lys	Ser	Ala	Gln	Asp	
1				5					10					15		

gta ttg gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa gat gaa atc gca gaa	96
Val Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu	
20 25 30	
aaa ctg gca acc atg aag cat tac aaa cat aag tta gaa aat gca aaa	144
Lys Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys	
35 40 45	
aat cca atc aaa atc gcc cat ttt gaa ttg gaa ttg ttg aca atg ttc	192
Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe	
50 55 60	
aaa aag ttc caa tca tta ttg aac gaa gct aat gaa att atc aaa tcc	240
Lys Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser	
65 70 75 80	
ttg aca acc aca aca acg gaa ccg aca acc cca act cct gaa cca aca	288
Leu Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr	
85 90 95	
aca aca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa	336
Thr Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys	
100 105 110	
aca ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc	384
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro	
115 120 125	
gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cca gaa ccg	432

Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro	
130 135 140	
act acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc	480
Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr	
145 150 155 160	
aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc acc cca act	528
Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr	
165 170 175	
ccg gac cgc tac caa aac ccc cga ccg cta cca aaa cac ccg acc atc	576
Pro Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile	
180 185 190	
cac ccc aac tcc gga ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc act cca	624
His Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro	
195 200 205	
act ccg gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca ccg	672
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro	
210 215 220	
gaa cca tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca	720
Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro	
225 230 235 240	
tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca acg	768
Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr	

	245	250	255	
act aag aaa cct aat cgg gat gat gtt ttg aaa caa gct gaa gag ctt				816
Thr Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu				
	260	265	270	
att aaa aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg				864
Ile Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu				
	275	280	285	
aaa aat gaa atc gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa cat				912
Lys Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His				
	290	295	300	
gag tta gaa aat gca aaa aat cca atc aaa atc gcc cat ctt gaa tgc				960
Glu Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser				
	305	310	315	320
gaa ttg ttg aca atg ttc aaa atg ttc caa tca ttg tta aat gaa gcc				1008
Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala				
	325	330	335	
aac gaa ctc ctg aa				1022
Asn Glu Leu Leu				
	340			

<210> 2
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> *Dermatophagoides farinae*
 <400> 2

Asp Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Pro Ile Lys Ser Ala Gln Asp
1 5 10 15

Val Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu
20 25 30

Lys Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys
35 40 45

Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe
50 55 60

Lys Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser
65 70 75 80

Leu Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr
85 90 95

Thr Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys
100 105 110

Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro
115 120 125

Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro

130	135	140
Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr		
145	150	155
Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr		
165	170	175
Pro Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile		
180	185	190
His Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro		
195	200	205
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro		
210	215	220
Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro		
225	230	235
Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr		
245	250	255
Thr Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu		
260	265	270
Ile Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu		
275	280	285

Lys Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His
290 295 300

Glu Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser
305 310 315 320

Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala
325 330 335

Asn Glu Leu Leu
340

5 <210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 3

Met Lys Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Leu Leu Lys
1 5 10

15 <210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 4

Ser Ala Gln Asp Val Leu Glu Lys

25 1 5

30 <210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 5

Phe Met Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asp Glu Leu Leu Arg

1 5 10

5 <210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 6

Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Leu Ala Lys

1 5 10

15 <210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 7

Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asn Glu Leu Ala Glu Lys

1 5 10

25 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
35 <400> 8

Met Tyr Asn Phe His Leu Glu Ala Tyr

1 5

40 <210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 9

Ile Ala His Phe Leu Glu Leu Glu

1 5

50

5	<210> 10 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético <400> 10 Ile Ala His Phe Glu Leu Glu 1 5
15	<210> 11 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético <400> 11 Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn 1 5 10
25	<210> 12 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético <400> 12 Ile Ala His Leu Glu Ser Glu Thr 1 5
40	<210> 13 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético <400> 13 Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala 1 5
50	<210> 14 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial

ES 2 494 817 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético	
	<400> 14	
5		Asp Ala Gln Leu Glu Xaa Glu
		1 5
	<210> 15	
	<211> 7	
10	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético	
15	<400> 15	
		Ser Ala Gln Asp Val Ser Leu
		1 5
	<210> 16	
	<211> 6	
20	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético	
	<400> 16	
		Arg Asn Glu Met Asn Glu
30		1 5
	<210> 17	
	<211> 12	
	<212> PRT	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético	
40	<400> 17	
		Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Lys Ala Asp Phe Asp
		1 5 10
	<210> 18	
	<211> 8	
45	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético	
	<400> 18	

Asp Leu Ala Arg Asp Val Xaa Leu

1

5

5 <210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 10 <400> 19

Asp Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu

1

5

10

15 <210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <220>
 <221> base modificada
 25 <222> 9 y 21
 <223> n representa a, c, g o t
 <400> 20
 gaygaygtnt traarcac ngargar 27
 30 <210> 21
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <220>
 40 <221> base modificada
 <222> 9, 12 y 21
 <223> n representa a, c, g o t
 45 <400> 21
 gaygaygtnc tnaarcac ngargar 27
 <210> 22
 50 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <220>
 <221> base modificada
 60 <222> 16

	<223> n representa a, c, g o t	
5	<400> 22 rttraaraar tcyttngcrt cyttraa	27
	<210> 23 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<220> <221> base modificada <222> 4 y 16 <223> n representa a, c, g o t	
20	<400> 23 rttnagraar tcyttngcrt cytt	24
25	<210> 24 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<220> <221> base modificada <222> 7 y 16 <223> n representa a, c, g o t	
35	<400> 24 rttraanagr tcyttngcrt cytt	24
40	<210> 25 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<220> <221> base modificada	
50	<222> 4, 7 y 16 <223> n representa a, c, g o t	
55	<400> 25 rttnagnagr tcyttngcrt cytt	24
	<210> 26 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
65	<220> <221> base modificada <222> 10 y 19 <223> n representa a, c, g o t	

	<400> 26 rttrtcraan acytcrtgng c 21	
5	<210> 27 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<220> <221> base modificada <222> 7, 10 y 19 <223> n representa a, c, g o t	
20	<400> 27 rttrtcnagn acytcrtgng c 21	
25	<210> 28 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
35	<220> <221> base modificada <222> 7 <223> n representa a, c, g o t	
40	<400> 28 rttrtcngcr aartcytrt t 21	
45	<210> 29 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
55	<220> <221> base modificada <222> 7 y 10 <223> n representa a, c, g o t	
60	<400> 29 rttrtcngcn agrtcytrt t 21	
65	<210> 30 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<220> <221> base modificada <222> 4 <223> n representa a, c, g o t	
	<400> 30 rttngcraar tcytrttra aytc 24	

5
 <210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

10
 <220>
 <221> base modificada
 <222> 4 y 7
 <223> n representa a, c, g o t

15
 <400> 31
 rttnngcnagr tcytcrttra aytc 24

20
 <210> 32
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

25
 <220>
 <221> base modificada
 <222> 4 y 19
 <223> n representa a, c, g o t

30
 <400> 32
 rttnngcraar tcytcrttna gytc 24

35
 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

40
 <220>
 <221> base modificada
 <222> 4, 7 y 19
 <223> n representa a, c, g o t

45
 <400> 33
 rttnngcnagr tcytcrttna gytc 24

50
 <210> 34
 <211> 1518
 <212> ADN
 <213> *Dermatophagoides farinae*

55
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1515)
 <400> 34

atg aaa tta acc gct aca tta ctg ttg att cta aca ttg agt tgg gca 48

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

1 5 10 15

ggc att ttc gtt gat gca aat cca cga ttc aaa cgt gat aat cgg gat 96

Gly Ile Phe Val Asp Ala Asn Pro Arg Phe Lys Arg Asp Asn Arg Asp

20 25 30

gat gtt ttg aaa caa act gaa gag ctt att aaa agt gcc cag gat gta 144

Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Leu Ile Lys Ser Ala Gln Asp Val

35 40 45

ttg gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa gat gaa atc gca gaa aaa 192

Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu Lys

50 55 60

ctg gca acc atg aag cat tac aaa cat aag tta gaa aat gca aaa aat 240

Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys Asn

65 70 75 80

cca atc aaa atc gcc cat ttt gaa ttg gaa ttg ttg aca atg ttc aaa 288

Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys

85	90	95	
aag ttc caa tca tta ttg aac gaa gct aat gaa att atc aaa tcc ttg			336
Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser Leu			
100	105	110	
aca acc aca aca acg gaa ccg aca acc cca act cct gaa cca aca aca			384
Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr			
115	120	125	
aca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca			432
Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr			
130	135	140	
ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa			480
Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu			
145	150	155	160
ccg act acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cca gaa ccg act			528
Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr			
165	170	175	
acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc aaa			576
Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys			
180	185	190	
acc ccc gaa ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc acc cca act ccg			624
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro			
195	200	205	

gac cgc tac caa aac ccc cga ccg cta cca aaa cac cgg acc atc cac 672
 Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile His

210

215

220

ccc aac tcc gga ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc act cca act 720
 Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr

225

230

235

240

ccg gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa 768
 Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu

245

250

255

cca tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca 816
 Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser

260

265

270

acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca acg act 864
 Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Thr

275

280

285

aag aaa cct aat cgg gat gat gtt ttg aaa caa gct gaa gag ctt att 912
 Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu Ile

290

295

300

aaa aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa 960
 Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys

305

310

315

320

aat gaa atc gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa cat gag 1008

Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His Glu

325

330

335

tta gaa aat gca aaa aat cca atc aaa atc gcc cat ctt gaa tcg gaa 1056

Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser Glu

340

345

350

ttg ttg aca atg ttc aaa atg ttc caa tca ttg ttg aac gaa gct gat 1104

Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asp

355

360

365

gaa att atc aga tcc ttg aca act acg acg gaa ccg aca aca ttg aat 1152

Glu Ile Ile Arg Ser Leu Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Leu Asn

370

375

380

agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg 1200

Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro

385

390

395

400

aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc 1248

Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr

405

410

415

act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca 1296

Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Gly Pro Thr Thr

420

425

430

ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg 1344

Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro
 435 440 445

gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca tcg aat 1392
 Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Ser Asn
 450 455 460

agc acc act tca gaa cca acg aat tca atc aat aga aaa aca agt gaa 1440
 Ser Thr Thr Ser Glu Pro Thr Asn Ser Ile Asn Arg Lys Thr Ser Glu
 465 470 475 480

ttt cat tct tat ccg att ggt tcc ata aga ttc gaa tca gat tca ata 1488
 Phe His Ser Tyr Pro Ile Gly Ser Ile Arg Phe Glu Ser Asp Ser Ile
 485 490 495

ttt tct aaa cat ttt att ctt ttg att tga 1518
 Phe Ser Lys His Phe Ile Leu Leu Ile
 500 505

<210> 35
 <211> 505
 <212> PRT
 <213> *Dermatophagoides farinae*
 <400> 35

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

Gly Ile Phe Val Asp Ala Asn Pro Arg Phe Lys Arg Asp Asn Arg Asp
 20 25 30

Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Leu Ile Lys Ser Ala Gln Asp Val
 35 40 45

Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu Lys
 50 55 60

Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys Asn
 65 70 75 80

Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys
 85 90 95

Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser Leu
 100 105 110

Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr
 115 120 125

Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr
 130 135 140

Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu
 145 150 155 160

Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr
 165 170 175

Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys
180 185 190

Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro
195 200 205

Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile His
210 215 220

Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr
225 230 235 240

Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu
245 250 255

Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser
260 265 270

Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Thr
275 280 285

Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu Ile
290 295 300

Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys
305 310 315 320

Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His Glu

	325	330	335
Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser Glu			
	340	345	350
Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asp			
	355	360	365
Glu Ile Ile Arg Ser Leu Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Leu Asn			
	370	375	380
Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro			
385	390	395	400
Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr			
	405	410	415
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Gly Pro Thr Thr			
	420	425	430
Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro			
	435	440	445
Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Ser Asn			
	450	455	460
Ser Thr Thr Ser Glu Pro Thr Asn Ser Ile Asn Arg Lys Thr Ser Glu			
465	470	475	480

Phe His Ser Tyr Pro Ile Gly Ser Ile Arg Phe Glu Ser Asp Ser Ile

485

490

495

Phe Ser Lys His Phe Ile Leu Leu Ile

500

505

5 <210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 36
 aattacaaac atgagttaga a 21

15 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 37
 gaattgttga caatgttcaa a21

25 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 38
 gatttcatct ttcaaactcg a 21

35 <210> 39
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 39
 cttttcaat acatcctggg c 21

45

REIVINDICACIONES

1. El siguiente alérgeno recombinante de ácaro (a) a (c) que tiene actividad alérgica de ácaro:

- (a) un alérgeno recombinante de ácaro que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 35;
- (b) un alérgeno recombinante de ácaro que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 35, excepto en que se han delecionado de 1 a 10 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 35; o
- (c) un alérgeno recombinante de ácaro que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 35 calculada usando BLAST y usando parámetros por defecto.

2. Un gen que (1) codifica el siguiente alérgeno de ácaro (a) a (c) que tiene actividad alérgica de ácaro:

- (a) un alérgeno de ácaro que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 35;
- (b) un alérgeno de ácaro que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 35, excepto en que se han delecionado de 1 a 10 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° 35; o
- (c) un alérgeno recombinante de ácaro que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 35 calculada usando BLAST y usando parámetros por defecto; o
- (2) comprende el siguiente ADN (d) o (e):
- (d) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N° 34; o
- (e) un ADN que codifica una proteína que tiene actividad alérgica de ácaro y que hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende una secuencia complementaria a la del ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 34, en donde el ADN (1) hibrida en presencia de NaCl 0,7 M a 1,0 M a 68 °C usando un filtro sobre el cual se ha inmovilizado ADN y lavando con el uso de solución SSC 0,1 a 2 x a 68 °C, o
- (2) puede formar un híbrido cuando se transfiere a y inmoviliza en una membrana de nitrocelulosa por el método de transferencia de Southern y después se deja reaccionar durante la noche a 42 °C en un tampón de hibridación de formamida al 50 %, SSC 4 x, HEPES 50 mM (pH 7,0), solución de Denhardt 10 x y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón.

3. El alérgeno de ácaro de acuerdo con la reivindicación 1 parte (c) o el gen de acuerdo con la reivindicación 2 parte (c), en donde el nivel de homología es de al menos el 90 %.

4. El alérgeno de ácaro o gen de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el nivel de homología es de al menos el 95 %.

5. El alérgeno de ácaro o gen de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el nivel de homología es de al menos el 97 %.

6. Un vector recombinante, que contiene el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.

7. Una proteína de fusión, que está compuesta por el alérgeno de ácaro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5 y otra proteína.

8. Una célula bacteriana, de levadura, de insecto o animal, que se transforma usando el vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 6.

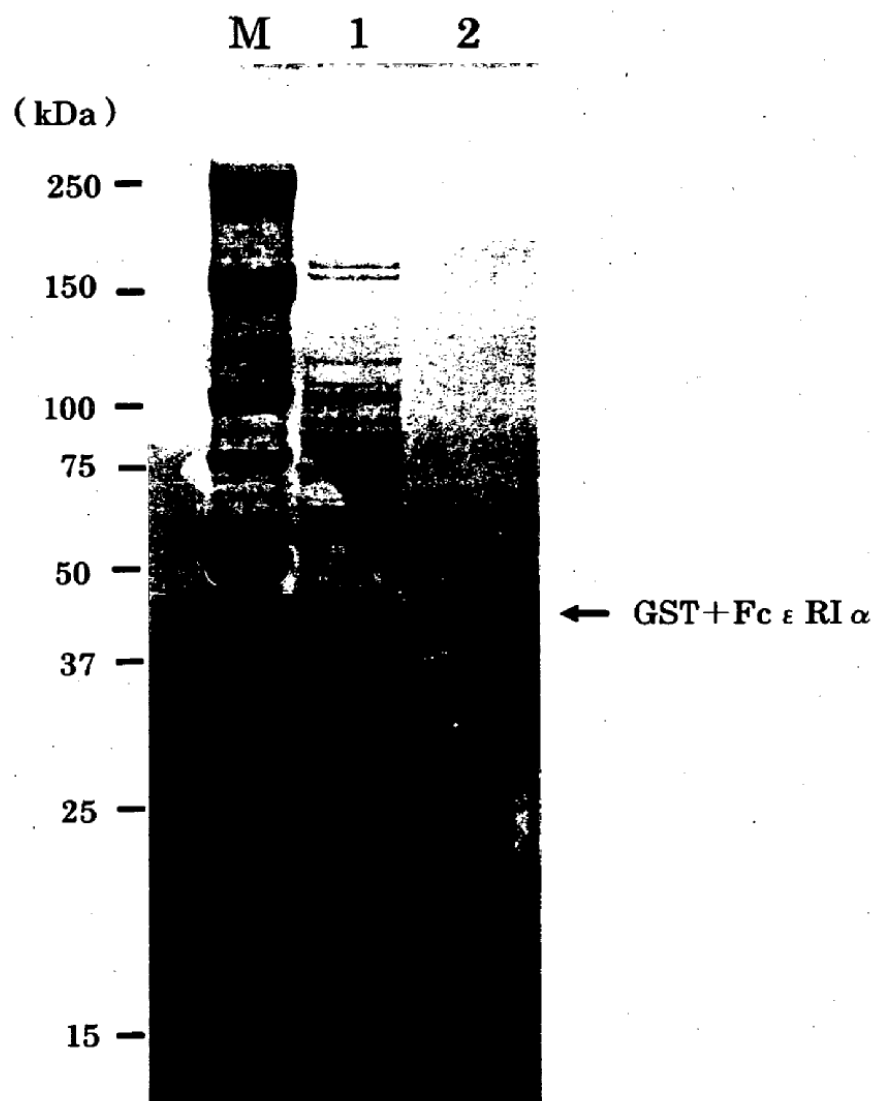
9. Un método para producir un alérgeno recombinante de ácaro, que comprende cultivar la célula bacteriana, de levadura, de insecto o animal de acuerdo con la reivindicación 8 en condiciones en que el gen pueda expresarse, hacer que la célula produzca un alérgeno recombinante de ácaro, y después recoger el alérgeno recombinante de ácaro.

10. Un método para producir un alérgeno recombinante de ácaro, que comprende cultivar una célula bacteriana, de levadura, de insecto o animal que está transformada con un vector recombinante que contiene un gen que codifica una proteína de fusión entre el alérgeno de ácaro de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y otra proteína en condiciones en que el gen pueda expresarse, hacer que la célula produzca un alérgeno recombinante de ácaro de fusión, recoger el alérgeno recombinante de ácaro de fusión y después eliminar la otra proteína fusionada al alérgeno.

11. Un agente terapéutico para enfermedades alérgicas a ácaros, que contiene como principio activo el alérgeno recombinante de ácaro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5, o la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 7.

12. Un agente de diagnóstico para enfermedades alérgicas a ácaros, que contiene como principio activo el alérgeno recombinante de ácaro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5, o la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 7.
- 5 13. Un anticuerpo contra el alérgeno de ácaro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5.
14. El anticuerpo contra el alérgeno de ácaro de acuerdo con la reivindicación 13, que es un anticuerpo monoclonal.
15. Un hibridoma, que produce el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 14.
- 10 16. Un método de inmunoensayo para un alérgeno de ácaro en polvo doméstico, que usa el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15.
- 15 17. El método de inmunoensayo para un alérgeno de ácaro en polvo doméstico de acuerdo con la reivindicación 16, que es el método ELISA.

Fig. 1



M: marcador molecular (producido por BIO-RAD)

1: fracción soluble de *Escherichia coli* BL21 después de incubación con IPTG

2: cadena Fc ϵ RI α de perro purificada fusionada a proteína GST

Fig. 2

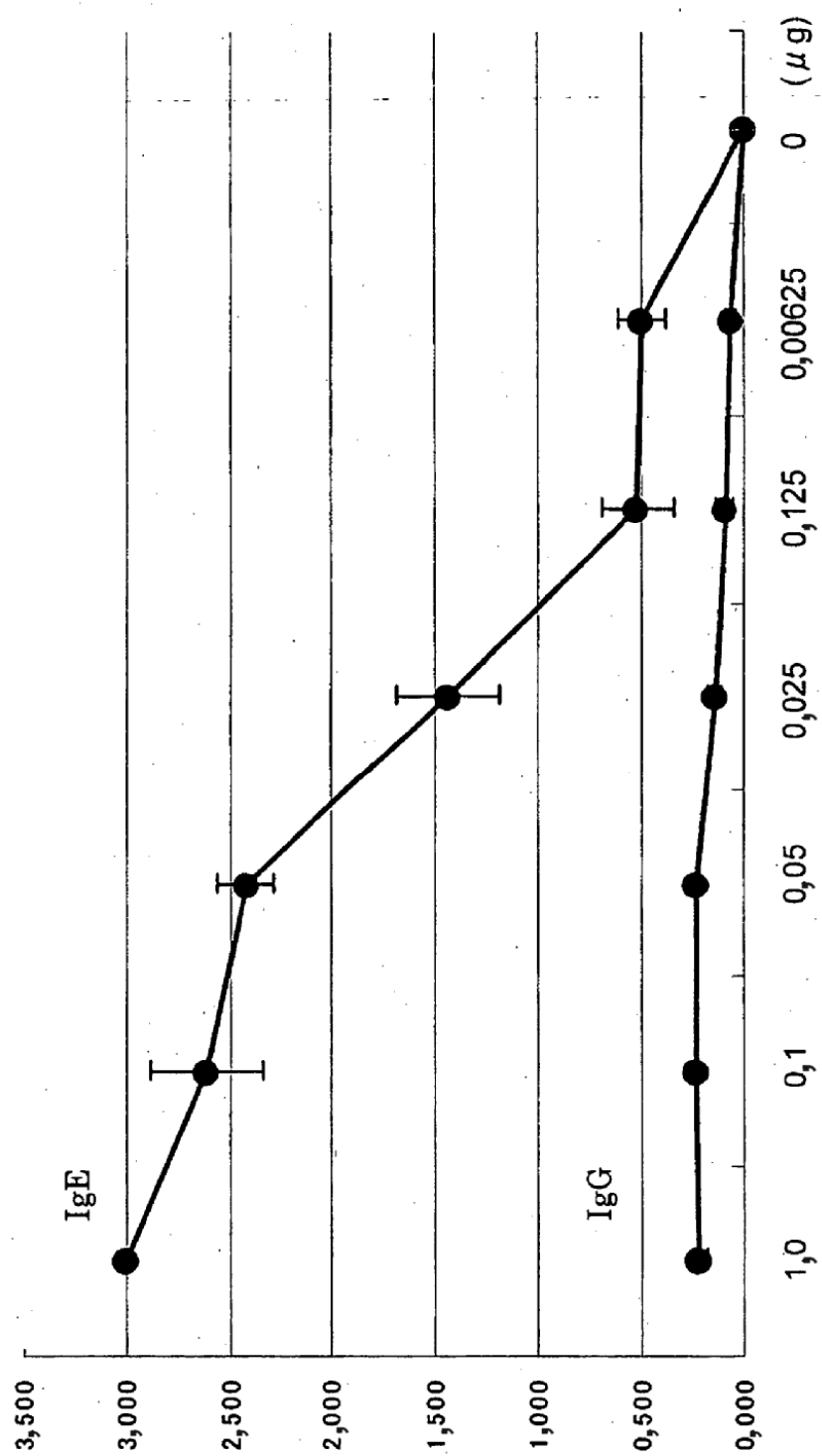


Fig. 3

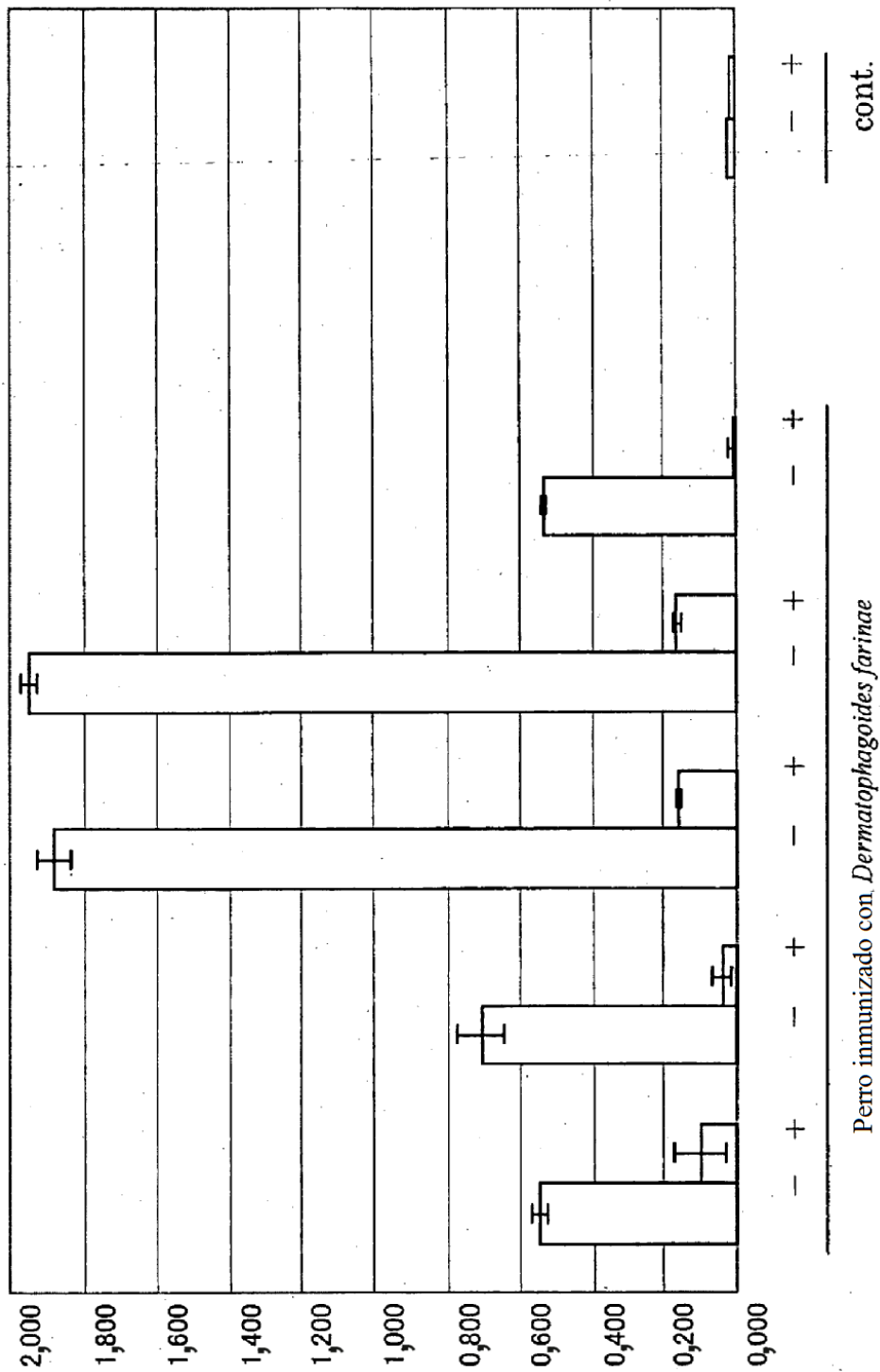


Fig. 4

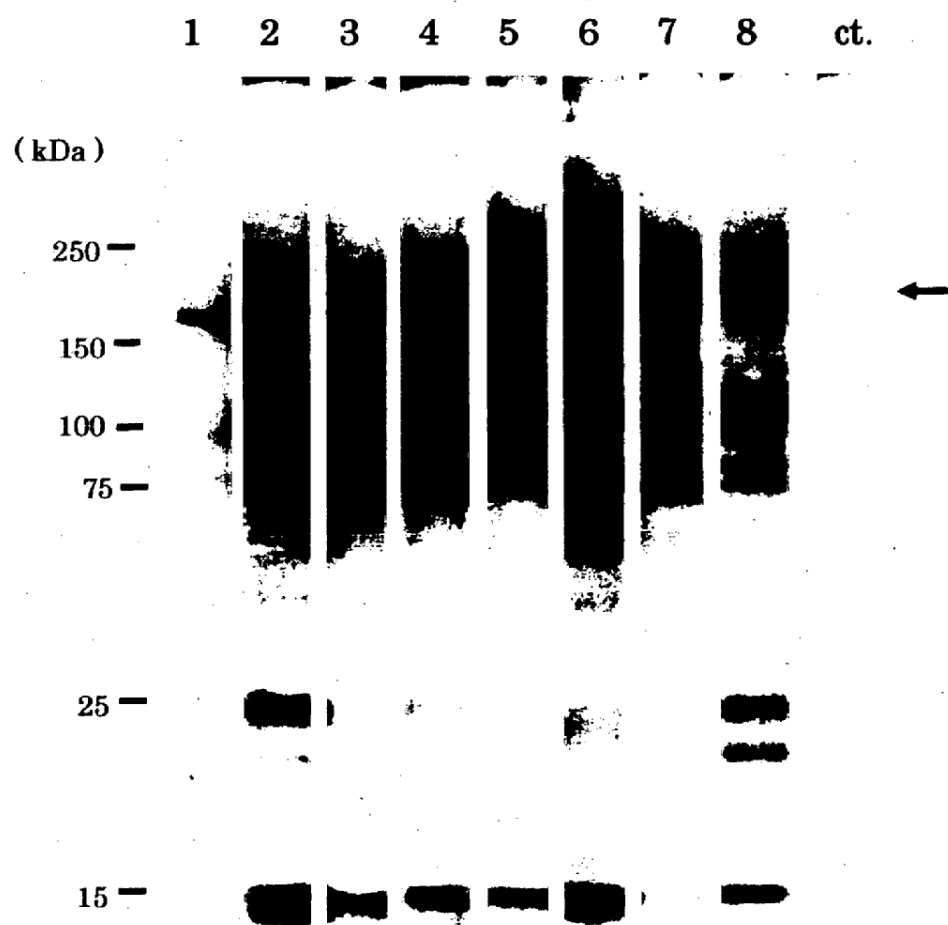


Fig. 5

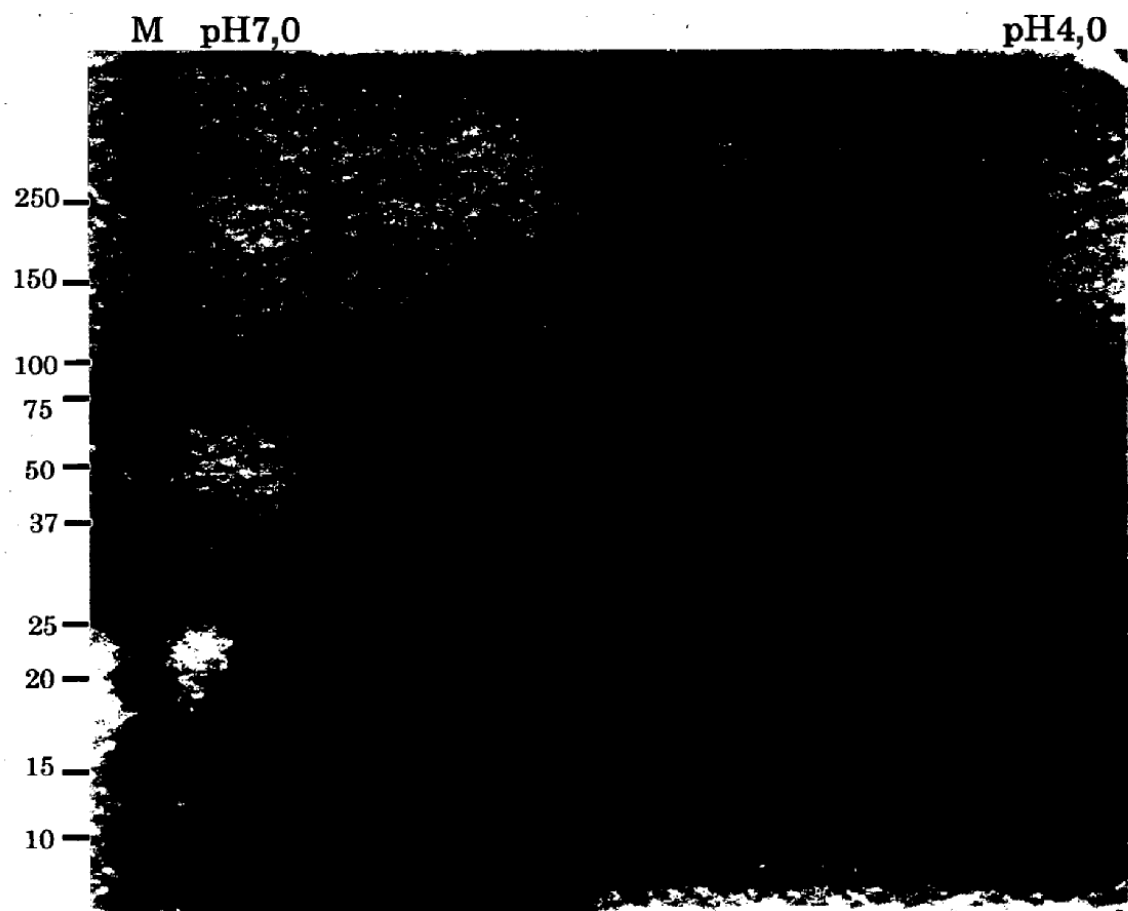


Fig. 6

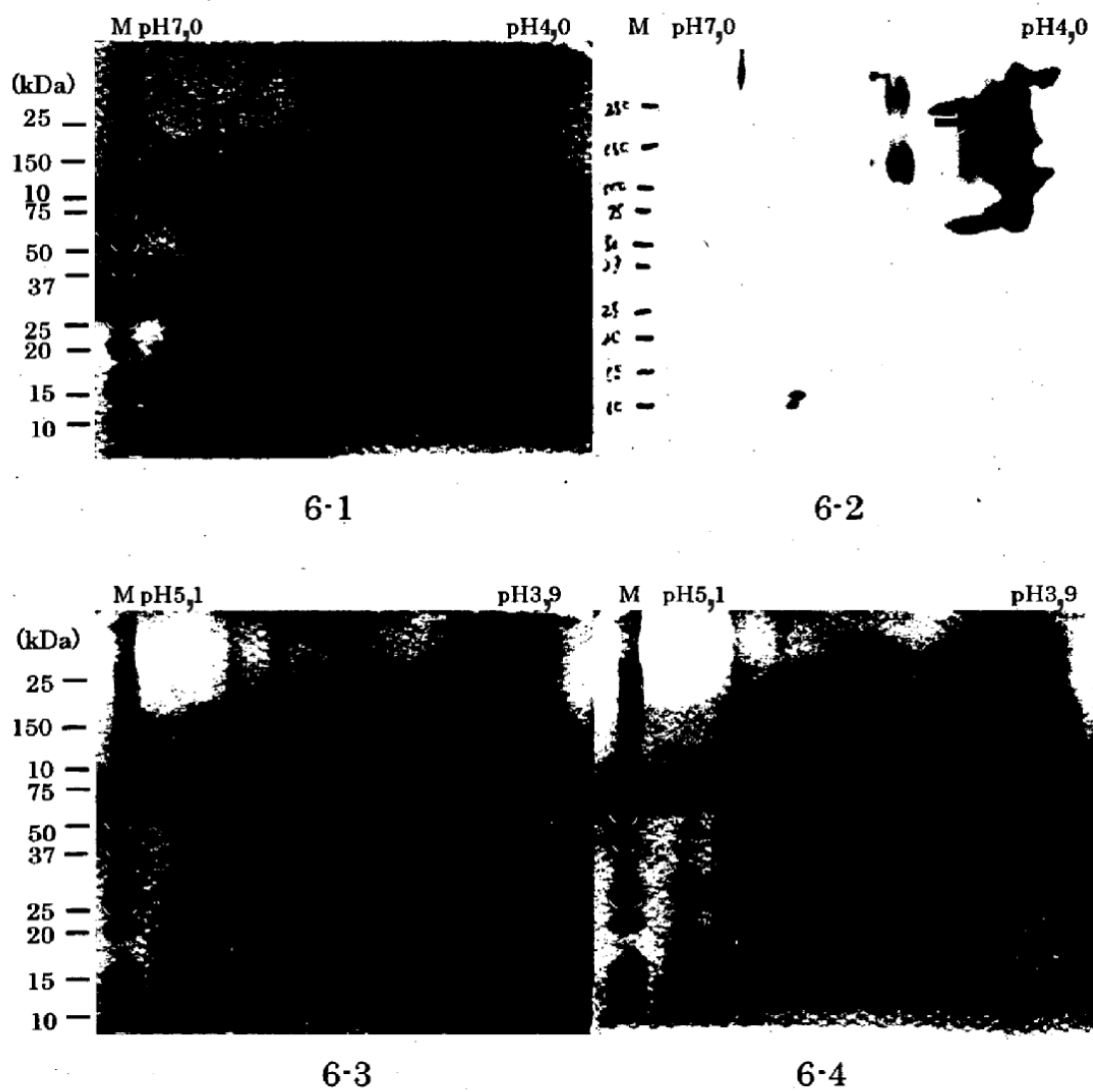


Fig. 7-1

gac gat gta tta aag cag act gag gag cct att aaa agt gcc cag gat	48
Asp Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Pro Ile Lys Ser Ala Gln Asp	
1 5 10 15	
gta ttg gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa gat gaa atc gca gaa	96
Val Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu	
20 25 30	
aaa ctg gca acc atg aag cat tac aaa cat aag tta gaa aat gca aaa	144
Lys Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys	
35 40 45	
aat cca atc aaa atc gcc cat ttt gaa ttg gaa ttg ttg aca atg ttc	192
Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe	
50 55 60	
aaa aag ttc caa tca tta ttg aac gaa gct aat gaa att atc aaa tcc	240
Lys Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser	
65 70 75 80	
ttg aca acc aca aca acg gaa ccg aca acc cca act cct gaa cca aca	288
Leu Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr	
85 90 95	
aca aca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa	336
Thr Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys	
100 105 110	
aca ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc	384
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro	
115 120 125	
gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cca gaa ccg	432
Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro	
130 135 140	
act acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc	480
Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr	
145 150 155 160	
aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc acc cca act	528
Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr	
165 170 175	

Fig. 7-2

ccg gac cgc tac caa aac ccc cga ccg cta cca aaa cac cgg acc atc Pro Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile 180 185 190	576
cac ccc aac tcc gga ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc act cca His Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro 195 200 205	624
act ccg gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca ccg Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro 210 215 220	672
gaa cca tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro 225 230 235 240	720
tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca acg Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr 245 250 255	768
act aag aaa cct aat cgg gat gat gtt ttg aaa caa gct gaa gag ctt Thr Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu 260 265 270	816
att aaa aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg Ile Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu 275 280 285	864
aaa aat gaa atc gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa cat Lys Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His 290 295 300	912
gag tta gaa aat gca aaa aat cca atc aaa atc gcc cat ctt gaa tcg Glu Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser 305 310 315 320	960
gaa ttg ttg aca atg ttc aaa atg ttc caa tca ttg tta aat gaa gcc Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala 325 330 335	1008
aac gaa ctc ctg aa Asn Glu Leu Leu 340	1022

Fig. 8-1

atg aaa tta acc gct aca tta ctg ttg att cta aca ttg agt tgg gca	48
Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Leu Ser Trp Ala	
1 5 10 15	
ggt att ttc gtt gat gca aat cca cga ttc aaa cgt gat aat cgg gat	96
Gly Ile Phe Val Asp Ala Asn Pro Arg Phe Lys Arg Asp Asn Arg Asp	
20 25 30	
gat gtt ttg aaa caa act gaa gag ctt att aaa agt gcc cag gat gta	144
Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Leu Ile Lys Ser Ala Gln Asp Val	
35 40 45	
ttg gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa gat gaa atc gca gaa aaa	192
Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu Lys	
50 55 60	
ctg gca acc atg aag cat tac aaa cat aag tta gaa aat gca aaa aat	240
Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys Asn	
65 70 75 80	
cca atc aaa atc gcc cat ttt gaa ttg gaa ttg ttg aca atg ttc aaa	288
Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys	
85 90 95	
aag ttc caa tca tta ttg aac gaa gct aat gaa att atc aaa tcc ttg	336
Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser Leu	
100 105 110	
aca acc aca aca acg gaa ccg aca acc cca act cct gaa cca aca aca	384
Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr	
115 120 125	
aca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca	432
Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr	
130 135 140	

Fig. 8-2

cgc gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa	480
Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu	
145 150 155 160	
cgc act acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cca gaa ccg act	528
Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr	
165 170 175	
acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc aaa	576
Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys	
180 185 190	
acc ccc gaa ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc acc cca act ccg	624
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro	
195 200 205	
gac cgc tac caa aac ccc cga ccg cta cca aaa cac cgg acc atc cac	672
Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile His	
210 215 220	
ccc aac tcc gga ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc act cca act	720
Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr	
225 230 235 240	
ccg gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa	768
Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu	
245 250 255	
cca tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca	816
Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser	
260 265 270	
acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca acg act	864
Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Thr	
275 280 285	

Fig. 8-3

aag aaa cct aat cgg gat gat gtt ttg aaa caa gct gaa gag ctt att	912
Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu Ile	
290 295 300	
aaa aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa	960
Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys	
305 310 315 320	
aat gaa atc gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa cat gag	1008
Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His Glu	
325 330 335	
tta gaa aat gca aaa aat cca atc aaa atc gcc cat ctt gaa tcg gaa	1056
Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser Glu	
340 345 350	
ttg ttg aca atg ttc aaa atg ttc caa tca ttg ttg aac gaa gct gat	1104
Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asp	
355 360 365	
gaa att atc aga tcc ttg aca act acg acg gaa ccg aca aca ttg aat	1152
Glu Ile Ile Arg Ser Leu Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Leu Asn	
370 375 380	
agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg	1200
Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro	
385 390 395 400	
aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc	1248
Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr	
405 410 415	
act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gga ccg aca aca	1296
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Gly Pro Thr Thr	
420 425 430	

Fig. 8-4

ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg 1344
Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro

435 440 445

gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca tcg aat 1392
Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Ser Asn

450 455 460

agc acc act tca gaa cca acg aat tca atc aat aga aaa aca agt gaa 1440
Ser Thr Thr Ser Glu Pro Thr Asn Ser Ile Asn Arg Lys Thr Ser Glu

465 470 475 480

ttt cat tct tat ccg att ggt tcc ata aga ttc gaa tca gat tca ata 1488
Phe His Ser Tyr Pro Ile Gly Ser Ile Arg Phe Glu Ser Asp Ser Ile

485 490 495

ttt tct aaa cat ttt att ctt ttg att tga 1518
Phe Ser Lys His Phe Ile Leu Leu Ile Stop

500 505

Fig. 9

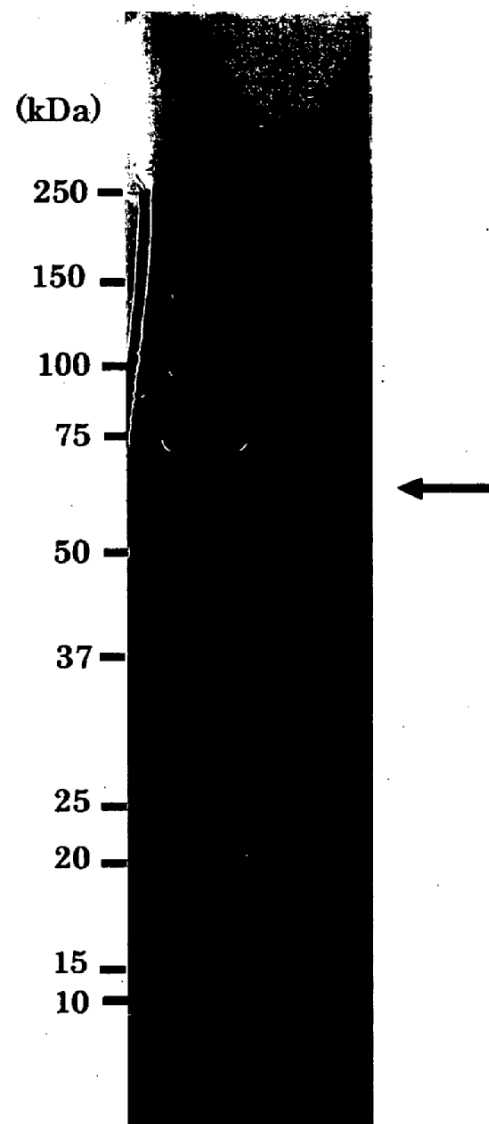


Fig. 10

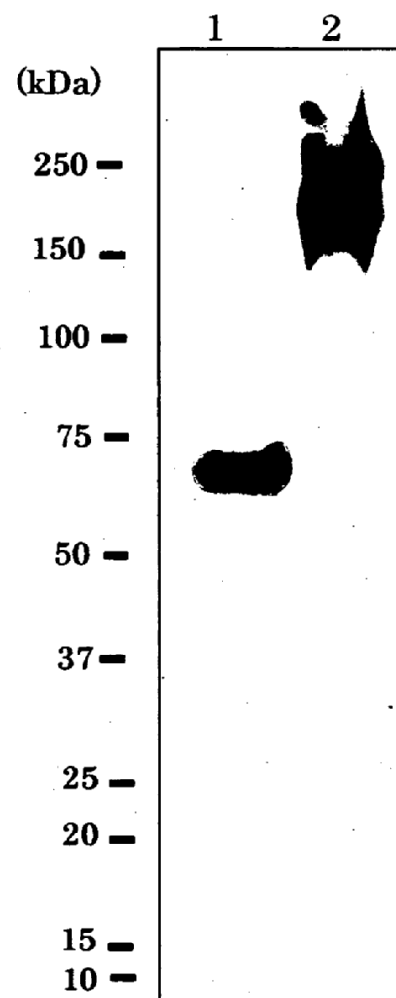


Fig. 11

