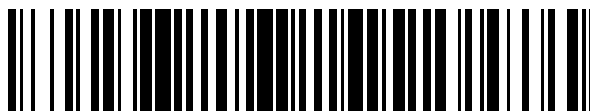


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 020**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12Q 1/42 (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2005 PCT/EP2005/013397**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2006 WO06063800**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2005 E 05815149 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 1846556**

54 Título: **Clonación de alérgeno de abeja melífera**

30 Prioridad:

14.12.2004 US 635479 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.07.2018

73 Titular/es:

**PLS-DESIGN GMBH (100.0%)
EICHENSTRASSE 42
20255 HAMBURG, DE**

72 Inventor/es:

GRUNWALD, THOMAS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 677 020 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

Clonación de alérgeno de abeja melífera

La presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un polipéptido capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera* que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, que es el alérgeno de abeja melífera Api m3 (fosfatasa ácida). La invención se refiere además a vectores de expresión, células hospedadoras y polipéptidos codificados por el ácido nucleico, además de usos de diagnóstico y farmacéuticos de los mismos.

Se ha reconocido desde hace tiempo que las alergias a venenos de insecto son relativamente comunes. El 4-5 % de la población alemana tienen alergia a los venenos de insecto. En Europa, los insectos picadores relevantes son abejas melíferas (*Apis mellifera*), avispas (*Vespula spp.*), abejorros (*Bombus spp.*), avispones (*Vespa crabo*), jejenes y tábanos (Ref. 1,2). Abejas, abejorros, avispas y avispones pertenecen al orden *Hymenoptera*.

Estos insectos sociales normalmente no atacan a las personas, pero las picarán en autodefensa si son molestados. Una vez han picado, si el aguijón sigue en la piel, una abeja melífera es responsable, mientras que si ya no está presente, es probable que una avispa sea la culpable. La abeja melífera obrera hembra lleva el aguijón y muere poco después de descargar un aguijón.

Si una abeja pica a un vertebrado, el aguijón se desprenderá del insecto, pero el saco de veneno todavía estará unido al aguijón y si no se quita, se inyectará todo el volumen de veneno (hasta 50 µl) en la víctima. Las avispas pueden retraer el aguijón, y solo inyectar aproximadamente 20 µl de veneno.

Las diferencias en el comportamiento de picar se basan en la evolución natural. Las abejas recolectan néctar, mientras que las avispas y avispones son cazadores de insectos. Por tanto, las abejas necesitan proteger la colmena, incluso contra vertebrados como ratones o animales mayores. El insecto muere después de la picadura, pero inyectará el máximo volumen de veneno, si el aguijón no se saca. Las avispas y avispones no tienen tales enemigos naturales.

Como es fácil de obtener cantidades suficientes de material, el veneno de abeja melífera ha sido bien estudiado. El veneno de abeja melífera contiene al menos 18 sustancias activas. La melitina, la sustancia más predominante, es uno de los agentes antiinflamatorios más potentes conocidos (100 veces más potente que la hidrocortisona). La adolapina es otra sustancia antiinflamatoria fuerte, e inhibe la ciclooxigenasa; así, también tiene actividad analgésica. La apamina inhibe la actividad del complemento C3, y bloquea los canales de potasio dependientes de calcio, potenciando así la transmisión nerviosa. Otras sustancias, tales como el compuesto X, hialuronidasa, fosfolipasa A2, histamina y proteína desgranuladora de mastocitos (MSDP), participan en la respuesta inflamatoria al veneno, con el ablandamiento de tejido y la facilitación de flujo de las otras sustancias. Finalmente, existen cantidades medibles de los neurotransmisores dopamina, norepinefrina y serotonina. El contenido de agua varía entre el 55-70 %. El intervalo de pH es entre 4,5-5,5. Un resumen de los componentes del veneno de abeja se da en la Tabla 1 (Ref. 3,4).

Tabla 1) Componentes del veneno de abeja

Tipo de componente	nombre	% en peso de masa seca
Proteínas	Fosfolipasa A2 (Api m 1)	10-12
	Hialuronidasa (Api m 2)	1-3
	Fosfatasa, glucosidasa	1-2
Péptidos	Melitina (Api m 4)	50-55
	Secapina, péptido MCD	1,5-4
	Tertiapamina, apamina, procamina	2-5
	Otros péptidos pequeños	13-15
Aminas biógenas	Histamina	0,5-2
	Dopamina	0,2-1
	Norepinefrina	0,1-0,5
	Azúcares (glucosa, fructosa)	2

Tipo de componente	nombre	% en peso de masa seca
Fosfolípidos		5
Aminoácidos		-
Sustancias volátiles	Feromonas	4-8
Minerales		3-4

5 La dosis DL50, es decir, la cantidad de veneno de abeja que hace que muera el 50 % de los individuos probados, es 6 mg de veneno/kg de peso corporal para ratones y ratas. Esto es igual a 40 picaduras/kg de peso corporal. Para avispones, este factor es aproximadamente 154-180 picaduras/kg de peso corporal. El veneno de abeja es 1,7-1,5 más eficaz que el de los avispones (Ref. 5,6).

Las abejas melíferas y avispas del orden *Hymenoptera* son con creces las causas más frecuentes de reacciones alérgicas graves. Normalmente, al menos más de 50 picaduras de una abeja por niño o 100 por adulto son necesarias para inducir condiciones potencialmente mortales (véase anteriormente). En caso de personas alérgicas, una picadura puede ser suficiente para producir la muerte por reacciones inmunológicas adversas.

10 Este tipo de alergia está mediada por anticuerpos IgE que reaccionan a los componentes del veneno. Por tanto, existe la posibilidad de que la terapia de desensibilización por dosis repetidas y progresivamente elevadas de componentes del veneno de abeja fuera satisfactoria. Han sido clonados y expresados varios polipéptidos de veneno de abeja como moléculas recombinantes (Ref. 7-16). Un componente de veneno de abeja, la fosfatasa ácida, es una de las proteínas alérgicas más potentes (Ref. 17). Hasta ahora, no se ha publicado información sobre la secuencia
15 completa de genes y solo se han hecho estudios iniciales sobre el nivel de proteína (Ref. 18-20, 27).

Barboni et al. (Ref. 19) describen dos proteínas diferentes con actividad de fosfatasa ácida de veneno de abeja melífera, que tienen un peso molecular de 45 y 96 kDa. La actividad enzimática se pierde parcialmente durante la purificación en la etapa de filtración en gel. Otras publicaciones (Ref. 18, 20, 27) informan de datos opuestos, que enseñan diferentes fragmentos de la proteína y el ácido nucleico correspondiente, y que conducen a diferentes
20 conclusiones sobre la familia de fosfatasas a la que la fosfatasa ácida del veneno de abeja melífera podría pertenecer, ya sean fosfatasas prostáticas o fosfatasas lisosomales. Soldatova et al. (Ref. 18) describen la clonación incompleta de un ADNc parcial que posiblemente codifica una fosfatasa ácida de veneno de abeja melífera. Informan de dificultades en la clonación y obtención de la secuencia de longitud completa y no enseñan la secuencia que parece que han clonado.

25 En vista del estado de la técnica, el experto en la materia se enfrenta, por tanto, al problema de proporcionar un ácido nucleico adecuado para la producción recombinante de fosfatasa ácida (api m3) del veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, en particular de abeja melífera, que pueda usarse en tal terapia de desensibilización, además de en pruebas de diagnóstico para la detección de alergia.

Este problema se resuelve por la materia de las reivindicaciones.

30 En particular, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, en el que el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (nota: "SEQ ID NO" se refiere al código <400> en el listado de secuencias adjunto en la norma de WIPO ST.25).

35 Este polipéptido se designa Api m 3. En particular, el ácido nucleico comprende o tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

En el contexto de la presente invención, los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente, sin ninguna limitación en cuanto al número de aminoácidos unidos. Los polipéptidos también pueden comprender aminoácidos que no existen de forma natural.

40 En toda esta memoria descriptiva, los polipéptidos codificados por el ácido nucleico de la invención tienen que ser capaces de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*.

45 Tras los fallidos intentos por clonar la secuencia de longitud completa de Api m 3 siguiendo la estrategia de cebadores deducida común (véase Soldatova et al., 2000) basada en los fragmentos de péptido encontrados por Hoffmann, 1996, y su secuencia postulada (Hoffmann, 1996). Se eligió un enfoque completamente diferente en la presente invención. Usando secuencias de ácidos nucleicos derivadas de las secuencias de péptidos publicadas por Hoffman, se construyeron sondas virtuales pequeñas de secuencias deducidas parciales, que se usaron para barrer el genoma de abeja publicado para dianas. Dos regiones en las secuencias del cromosoma 16 truncado diferentes coincidieron con las sondas. El barrido de estas regiones con herramientas bioinformáticas reveló posibles marcos

de lectura abiertos y secuencias de genes. El barrido de un posible sitio de escisión de secuencias condujo al supuesto extremo N del gen de Api m 3. Entonces se diseñaron cebadores según el extremo N y C de proteína propuesto. Estos cebadores se usaron para amplificar el gen de ADNc de la glándula de veneno de abeja sintetizado a partir de ARN total con cebadores oligodT(20). La amplificación fue satisfactoria y produjo un fragmento de ADN del tamaño esperado. La identidad del ADN se verificó por secuenciación, cálculo de peso molecular y alineamiento con las fosfatasa ácidas homólogas de secuencias humanas, además de rata, y los fragmentos de péptido propuestos. También se verificó la identidad de proteínas.

A partir de la secuencia de ADNc de longitud completa resultante, es evidente que ha fallado el enfoque clásico, ya que Hoffman se equivocó en varios puntos. Por ejemplo, eligió un alineamiento incorrecto de los fragmentos de péptido (véase la Fig. 5), pensó erróneamente que varios péptidos que estaban de hecho separados por otros péptidos eran contiguos, y postuló la existencia de un fragmento que no pertenece a la fosfatasa ácida. En realidad, usando cebadores basados en los péptidos 1 y 7, como se propuso por Hoffman, cabría esperar que se amplificara un fragmento más corto que cubre solo la secuencia de péptidos alrededor de los aminoácidos 200 y 230 de la secuencia consenso.

Los insectos sociales del orden *Hymenoptera* que comúnmente interactúan con el hombre son miembros de las superfamilias *Apoidea* y *Vespoidea*, abejas y avispas (Ref. 20). Los *Vespoidea* incluyen las avispas y avispones sociales, *Vespidae*, además de hormigas, *Formicidae*. Avispas importantes comprenden avispas germánicas del género *Vespula*, avispones de los géneros *Dolichovespula* y *Vespa* y avispas cartoneras del género *Polistes*. Las abejas comprenden, por ejemplo, abejas melíferas, *Apis mellifera*, y abejorros de la especie *Bombus terrestris*. En el contexto de la presente invención, un insecto del orden *Hymenoptera* puede ser de cualquiera de estas especies, pero según una realización particular, el insecto es una abeja del género *Apis*. Lo más preferentemente, la abeja es la abeja melífera, *Apis mellifera*.

Otras especies del orden *Hymenoptera* producen alérgenos similares con reactividad cruzada antigénica y un alto grado de homología de aminoácidos (Ref. 24-26). Así, la presente invención no solo se extiende al alérgeno Api m3 de *Apis mellifera*, sino también a alérgenos de *Hymenoptera* homólogos.

En particular, los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos de la invención tienen que ser capaces de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de *Apis mellifera*. Los sujetos son comúnmente reactivos al antígeno de Api m3, fosfatasa ácida de veneno de abeja. Con el fin de probar, se ponen en contacto suero o IgE purificada de tales sujetos alérgicos con el polipéptido, y se detecta la unión específica del polipéptido a los anticuerpos. Una prueba tal puede, por ejemplo, ser un ELISA. Para verificar la reactividad de los polipéptidos con anticuerpos IgE, se reúnen suero o IgE de varios sujetos, preferencialmente, de 5 a 20 sujetos.

Los ácidos nucleicos de la invención puede ser o bien ADN o ARN.

En una realización, la invención también proporciona un ácido nucleico, que es un fragmento que tiene una longitud superior a 255 nucleótidos de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en la que el fragmento codifica un polipéptido capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*. Preferentemente, el ácido nucleico es un fragmento que tiene una longitud superior a 255, más preferentemente superior a 600, superior a 700 o superior a 800 nucleótidos de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En otra realización, se proporciona un fragmento de ácido nucleico (polinucleótido) que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos del ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en la que el polinucleótido está seleccionado del grupo que consiste en los nucleótidos 78 a 299, 348 a 437, 459 a 476, 555 a 671, 696 a 830 o 1086 a 1121 de dicho ácido nucleico, en la que la numeración se corresponde con la región que codifica dicho polipéptido. Específicamente, dicho ácido nucleico tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

Preferencialmente, los nucleótidos son de la región de nucleótidos 555 a 671 o 696 a 830.

Además, se proporcionan tales ácidos nucleicos que consisten en los nucleótidos 1 a 77, 438 a 458, 477 a 494, 504 a 554, 672 a 695, y 831 a 1085 del ácido nucleico mostrado en SEQ ID NO: 1.

Preferencialmente, el ácido nucleico comprende 15 a 240, 15 a 90, 18 a 60, 21 a 30, más preferentemente al menos 18, 21, 24, 27, 30, 60, 90 o más nucleótidos contiguos de las regiones anteriores.

La invención también proporciona variantes de polipéptido adicionales y secuencias de ácidos nucleicos como se indica en las reivindicaciones.

En una realización, la invención también proporciona un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la invención. Preferencialmente, el polipéptido es una fosfatasa ácida de longitud completa del veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*. En particular, el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Aunque no es esencial, se prefiere que el polipéptido tenga actividad de fosfatasa ácida. Esta actividad puede probarse, por ejemplo, según el método descrito en Ref. 19.

Alternativamente, el polipéptido es un fragmento de la proteína de longitud completa capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera* que tiene una longitud superior a 85, superior a 200 o superior a 250 aminoácidos. Se proporcionan otros fragmentos, en los que los polipéptidos son capaces de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, y comprenden al menos 5, preferentemente al menos 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más aminoácidos de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en el aminoácido 26 a 99, 116 a 145, 153 a 158, 185 a 223, 232 a 276 o 362 a 373 del polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2. Alternativamente, los polipéptidos son capaces de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, y comprenden al menos 5, preferentemente al menos 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más aminoácidos del polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2, excepto los polipéptidos del grupo que consiste en los aminoácidos 1 a 34, 63 a 80, 100 a 115, 142 a 149, 168 a 176, 224-239 y 258 a 343 del polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2, o excepto los polipéptidos mostrados en la Fig. 5. Además, se proporcionan tales polipéptidos que consisten en los aminoácidos 1 a 25, 146 a 152, 159 a 164, 168 a 184, 224 a 231, y 277 a 361.

Preferentemente, el polipéptido de la invención se expresa recombinantemente. Esto tiene la ventaja, por ejemplo, de que el polipéptido puede expresarse como una proteína de fusión unida a un polipéptido adicional. Por ejemplo, el polipéptido o proteína de fusión está unido a una secuencia señal que asegura su secreción en el espacio extracelular o sobrenadante de las células cultivadas, cuando corresponda. Debido a las novedosas técnicas en la biología molecular, se espera que el uso de proteínas recombinantes en terapia y diagnósticos aumente la eficiencia y el valor de diagnóstico en estas aplicaciones médicas (Ref. 21-23).

Dependiendo de la célula hospedadora que produce la proteína recombinante, la proteína está glucosilada (después de la expresión en las células de mamífero o de levadura) o no glucosilada (después de la expresión en células bacterianas). El patrón de glucosilación puede variar dependiendo de la célula hospedadora usada, y puede así diferenciarse en el patrón de glucosilación de fosfatasa ácida natural aislada del veneno de abeja. En una alternativa, el patrón de glucosilación es idéntico al patrón de glucosilación de la fosfatasa ácida aislada de veneno de abeja. La glucosilación puede tener profundos efectos sobre la unión de anticuerpos específicos.

Cuando se expresa en células bacterianas, el polipéptido de la invención carece de glucosilación. La proteína así se diferencia de la proteína nativa respecto a la presentación de epítipo, y potencialidad para el plegamiento y funcionalidad. Se mostró que los hidratos de carbono pueden representar epítopos de IgE y contribuir a una reactividad cruzada no específica observada de alérgenos, por ejemplo, entre proteínas de abeja y avispa, debido a características similares de las cadenas de hidrato de carbono (Huby et al., *ToxSci* 55: 235-246, 2000; Tretter et al., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 102: 259-266, 1993; Hemmer et al., *Cli. Exp. Allergy* 34: 460-460, 2004). La reactividad cruzada es un motivo de resultados positivos falsos en pruebas inmunológicas *in vitro* (Petersen A., Mundt C., *J Chromat B* 756, 141-150, 2001). La expresión del polipéptido no glucosilado elimina estos positivos falsos, y puede, por tanto, ser aprovechado en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

El patrón de glucosilación en células eucariotas distintas de células de insecto, por ejemplo, en células de mamífero, también varía del patrón de glucosilación de la proteína nativa (Jenkins et al., *Nat. Biotech.* 14: 975-981, 1996). Incluso en células de insecto, es probable que el patrón de glucosilación sea diferente, debido a la expresión en exceso de la proteína.

El análisis de secuencias de Api m 3 muestra que la proteína comprende tres supuestos sitios de glucosilación de la secuencia Asn-Xaa-Ser/Thr. En una realización, los polipéptidos de la invención comprenden sitios de glucosilación mutados en lugar de sitios de glucosilación. En particular, en un sitio de glucosilación mutado, la asparagina (Asn) en el (los) sitio(s) de glucosilación puede intercambiarse con cualquier otro aminoácido, preferentemente con glutamina (Gln) (Elbein A.D. et al., 1991, *Trends Biotechnol.* 9(10):346-352). Alternativamente, en un sitio de glucosilación mutado, la serina (Ser) puede intercambiarse con otro aminoácido o delecionarse. Por consiguiente, la invención también proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención que comprende al menos uno, preferentemente 2, o 3 sitios de glucosilación mutados, en lugar de sitios de glucosilación. Lo más preferentemente, todos los sitios de glucosilación están mutados.

La presente invención también se refiere a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la invención operativamente unido a una secuencia de control de la expresión. En una alternativa, el ácido nucleico está unido en marco a un ácido nucleico que codifica un polipéptido adicional, de manera que el vector de expresión puede usarse para la expresión de una proteína de fusión. El polipéptido adicional puede seleccionarse del grupo que comprende una marca de poli-histidina (marca His), glutatión-S-transferasa, β -galactosidasa, una citocina y un IgG-Fc. En particular, se emplean marcas que simplifican la purificación de la proteína recombinante, por ejemplo, una marca His. Una marca tal puede escindirse después de la purificación de la proteína.

Alternativamente, puede ser beneficioso para aplicaciones terapéuticas expresar el polipéptido de la invención unido a un polipéptido terapéutico, por ejemplo una citocina. Por ejemplo, una proteína de fusión con una citocina que potencia respuestas T_H1 y regula por disminución de T_H2 o que induce cambio de clase a IgG, tal como IFN- γ , IL-10, IL-12 o TGF- β , puede mejorar la eficiencia de desensibilización. Si el vector de expresión se usa para terapia génica, se prevé que use secuencias ricas en CpG (dinucleótidos de citosina-guanidina no metilados), que promueven respuestas T_H1 . Además o alternativamente, el polipéptido de la invención puede unirse a otro polipéptido o proteína, tal como en forma de una proteína de fusión o como proteínas separadas expresadas por el mismo vector.

Preferentemente, los polipéptidos o proteínas adicionales son otras proteínas de veneno de *Hymenoptera* o fragmentos antigénicos de las mismas.

5 El vector de expresión puede ser adecuado para la expresión en diferentes tipos de células, tales como células bacterianas, de levadura o de mamífero. Preferencialmente, el vector es adecuado para la expresión en células de insecto, por ejemplo, células de insecto HighFive (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Alternativamente, especialmente para aplicaciones de terapia génica, el vector es adecuado para la expresión en células humanas. En este contexto, la expresión del polipéptido codificado puede ser dirigida por la elección de una secuencia de control de la expresión adecuada, por ejemplo, una secuencia de control de la expresión principalmente o específicamente operacional en diferentes tipos de células, tales como células linfoides, por ejemplo células dendríticas, linfocitos B o macrófagos.

10 En una realización de la invención, el vector de expresión es pIB/V5-His (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, Invitrogen Manual: InsectSelect BSD System with pIB/V5-His, Versión G, 30 de mayo de 2003).

15 En particular, el vector puede ser pIB/Mel opt-H10-Api m3, que comprende la secuencia de ADNc de Api m3 (SEQ ID NO: 1), que se modificó para facilitar el aislamiento y la purificación. Se añadió una secuencia señal de melitina para la secreción de la proteína recombinante y se optimizó la secuencia de Kozak para tasas de expresión más altas en células de insecto (véase la Fig. 4 y Ejemplo 2). Alternativamente, pueden usarse otras secuencias señal para la secreción de la proteína. El vector de expresión también puede ser un vector de plásmido o viral diferente, por ejemplo, baculoviral o adenoviral. El vector de expresión comprende además un codón de terminación y una señal de poliadenilación.

20 La presente invención se refiere además a una célula hospedadora que comprende dicho vector de expresión. Esta célula hospedadora puede ser una célula bacteriana, de levadura o de mamífero, en particular una célula de insecto.

25 Se proporciona un método de producción de un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la invención, en el que la célula hospedadora se cultiva en condiciones apropiadas para la expresión de dicho polipéptido y dicho polipéptido se purifica. Si el polipéptido es una proteína de fusión con un componente de fusión que facilita la purificación, por ejemplo, una marca His o una marca GST, puede usarse una columna de afinidad correspondiente para la purificación, por ejemplo, una columna de afinidad por Ni²⁺ o glutatión. Para la purificación de una proteína de fusión de IgG, es adecuada una columna de proteína A o proteína G.

El vector de expresión de la invención puede usarse para la preparación de una composición farmacéutica para tratar sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*. Pautas de tratamiento que usan enfoques de terapia génica para la desensibilización son conocidas en el estado de la técnica (por ejemplo, Ref. 28).

30 Así, la invención también proporciona un método de tratamiento de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera* que comprende administrar a un sujeto con una alergia tal un vector de expresión de la invención. El vector de expresión puede administrarse directamente, por ejemplo, por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea, pistola de genes o junto con células tomadas del sujeto que se transfectaron *ex vivo*.

35 Como se usa en el presente documento, "sujeto" engloba sujetos humanos (pacientes), adultos, además de niños, y animales.

Una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión de la invención, y, opcionalmente, que comprende un adyuvante o recurso adecuado, puede emplearse para este fin. En particular, este vector de expresión es rico en secuencias de CpG y/o codifica una citocina que desplaza el equilibrio entre respuestas inmunitarias T_{H1} y T_{H2}.

40 Alternativamente, el polipéptido de la invención se usa para la preparación de una composición farmacéutica para tratar sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*. Así, la invención proporciona un método de tratamiento de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, que comprende administrar un polipéptido de la invención a un sujeto que tiene una alergia tal.

45 Los enfoques de desensibilización son muy conocidos en el estado de la técnica. En principio, tratamientos repetidos de individuos alérgicos con dosis adecuadas, normalmente progresivamente elevadas, de alérgeno desvían la respuesta inmunitaria a una dominada por linfocitos T que favorecen la producción de anticuerpos IgG e IgA con respecto a la producción de anticuerpos IgE. Se cree que los anticuerpos IgG e IgA desensibilizan al sujeto uniéndose a las pequeñas cantidades de alérgeno normalmente encontradas, y previniendo que el alérgeno se una a IgE. La desensibilización a veneno de insecto o de abeja es casi universalmente satisfactoria (Ref. 29). Pueden usarse diferentes protocolos y programas de tiempo, desde protocolos tradicionales, protocolos rápidos a protocolos ultrarrápidos (por ejemplo, Ref. 30), todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia. La eficacia de tales protocolos puede evaluarse probando el ajuste de niveles de IgE e IgG (diferentes isotipos) y/o IgA en la sangre del sujeto o exponiendo el sujeto de una manera controlada y determinando la respuesta alérgica.

55 El polipéptido de la invención puede administrarse solo o en combinación con otros alérgenos, por ejemplo, otras proteínas de veneno de *Hymenoptera* o fragmentos de las mismas. En particular, son adecuadas combinaciones con fosfolipasa A2, hialuronidasa, glucosidasa y/o melitina de veneno de abeja o *Hymenoptera*, ya que esta terapia

induce la generación de anticuerpos IgG/IgA a varios alérgenos de veneno y puede así conducir a protección completa. Los alérgenos de abeja identificados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Alérgenos de abeja identificados

Alérgeno	Nombre común	Tamaño (procesado)	Peso	SwissProt	Referencia
Api m 1	Fosfolipasa A2	134 aa	15,2 kDa	P00630	Kuchler et al. 1989
Api m 2	Hialuronidasa	349 aa	40,7 kDa	Q08169	Gmachl y Kreil 1993
Api m 3	Fosfatasa ácida	nd	45 kDa	-	Barboni et al. 1987
Api m 4	Melitina	26 aa	2,8 kDa	P01501	Vlasak et al. 1983
Api m 5	Alérgeno C	nd	105 kDa	-	Hoffman et al. 1977
Api m 6	-	71 aa	7,5 kDa	P83563	Kettner et al. 2001

- 5 El polipéptido de la invención también puede usarse para la preparación de una composición de diagnóstico para diagnosticar o identificar sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*. Así se proporciona un método de diagnóstico de una alergia al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, que comprende las etapas de
- poner en contacto un sujeto con un polipéptido de la invención y
 - detectar una reacción alérgica, en el que detectar una reacción alérgica indica dicha alergia.
- 10 Pruebas *in vivo* para diagnosticar una alergia pueden ser fácilmente adaptadas al polipéptido de la invención. Normalmente, se inyecta una cantidad adecuada de alérgeno por vía subcutánea en la extremidad de un sujeto y, después de una cierta cantidad de tiempo, se determina el grado de inflamación localizada en comparación con controles (prueba de punción). Tales pruebas son muy conocidas en la técnica (Hamilton RG, Diagnosis of hymenoptera venom sensitivity, *Current Opinion in Allergy Clin Immunol* 2(4) (2002) 347-351; Poulsen LK, In vivo and in vitro techniques to determine the biological activity of food allergens, *J Chromat B* 756 (2001) 41-55; Schmid-Grendelmeier P, Cramer R, Recombinant allergens for skin testing, *Int Arch Allergy Immunol* 125 (2001) 96-111; Williams LW, Bock SA, Skin testing and food challenges in allergy and immunology practice, *Clin Rev Allergy Immunol* 17(3) (1999) 323-38; Barbee RA, Lebowitz MD, Thompson HC, Burrows B, Immediate skin-test reactivity in a general population sample, *Ann Intern Med* 84(2) (1976) 129-33).
- 15
- 20 Una alergia al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera* también puede diagnosticarse por un método *in vitro* que comprende las etapas de
- poner en contacto *in vitro* una muestra de sangre de un sujeto con un polipéptido de la invención y
 - detectar la unión de anticuerpos IgE al polipéptido, en el que detectar la unión de anticuerpos IgE al polipéptido indica dicha alergia.
- 25 La unión de anticuerpos IgE al polipéptido puede, por ejemplo, detectarse en un ELISA o por un ensayo de liberación *in vitro* empleando mastocitos raspados y midiendo la cantidad de mediador liberado, por ejemplo, histamina. Para determinar la unión específica, los resultados se comparan con un control de especificidad, por ejemplo, con un anticuerpo no relacionado. Las pruebas de diagnóstico pueden llevarse a cabo en paralelo para determinar los niveles de IgG específica (en particular IgG1 y/o IgG4) y/o IgA. Para esto, puede emplearse un ELISA con anticuerpos secundarios específicos que reconocen los diferentes isotipos. La prueba en paralelo es particularmente útil para seguir y evaluar una evolución de la inmunoterapia específica.
- 30
- Para los usos terapéuticos y de diagnóstico y métodos, se prefiere emplear los polipéptidos de fusión de la invención, proteínas o polipéptidos no glucosilados que son capaces de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, y comprenden al menos 5, preferentemente al menos 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más aminoácidos de un polipéptido según la invención seleccionados del grupo que consiste en el aminoácido 26 a 99, 116 a 145, 153 a 158, 185 a 223, 232 a 276 o 362 a 373 del polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2. Alternativamente, los polipéptidos empleados son capaces de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, y comprenden al menos 5, preferentemente al menos 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más aminoácidos de un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2, excepto los polipéptidos del grupo que consiste en los aminoácidos 1 a 34, 63 a 80, 100 a 115, 142 a 149, 168 a 176, 224-239 y 258 a 343 del polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2 o excepto los polipéptidos mostrados en la Fig. 5. Además, pueden usarse tales polipéptidos que consisten en los aminoácidos 1 a 25, 146 a 152, 159 a 164, 168 a 184, 224 a 231, y 277 a 361.
- 35
- 40

Así, la invención también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende el polipéptido de la invención. Preferencialmente, la composición comprende además un adyuvante y/o recurso adecuado. Opcionalmente, la composición comprende además otros polipéptidos de veneno de abeja o *Hymenoptera*, tales como fosfolipasa A2, hialuronidasa, glucosidasa y/o melitina.

5 La presente invención también se refiere a un método de diagnóstico de una alergia al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, que comprende las etapas de

a) realizar el método de producción de un polipéptido codificado por el ácido nucleico de la invención, en el que la célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la invención se cultiva en condiciones apropiadas para la expresión de dicho polipéptido, y en el que dicho polipéptido se purifica,

10 b) poner en contacto el polipéptido obtenido por el método de etapa a) *in vitro* con una muestra de sangre,

c) y detectar la unión de anticuerpos IgE al polipéptido, en el que detectar anticuerpos IgE que se unen al polipéptido indica dicha alergia.

Además, se proporciona un método de diagnóstico de una alergia al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, que comprende las etapas de

15 a) realizar el método de producción de un polipéptido codificado por el ácido nucleico de la invención, en el que la célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la invención se cultiva en condiciones apropiadas para la expresión de dicho polipéptido, y en el que dicho polipéptido se purifica,

b) poner en contacto un sujeto con el polipéptido obtenido por el método de etapa a) y detectar una reacción alérgica, y

20 c) detectar una reacción alérgica, que es indicativo de la alergia.

La invención también proporciona un método de preparación de una composición para diagnosticar una alergia al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera* que comprende la etapa de producir un polipéptido codificado por el ácido nucleico de la invención, en el que la célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la invención se cultiva en condiciones apropiadas para la expresión de dicho polipéptido y dicho polipéptido se purifica y puede usarse como tal para diagnóstico. Opcionalmente, el polipéptido se formula además con estabilizadores, tales como una proteína neutra (por ejemplo, BSA) o detergentes para dar dicha composición.

En otra realización, la invención enseña un método de preparación de una composición para tratar sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, que comprende la etapa de realizar el método de producción de un polipéptido codificado por el ácido nucleico de la invención, en el que la célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la invención se cultiva en condiciones apropiadas para la expresión de dicho polipéptido y dicho polipéptido se purifica y puede usarse como tal para terapia. Opcionalmente, el polipéptido se formula además con excipiente apropiado y/o vehículos con el fin de proporcionar dicha composición. Correspondientemente, se desvela un método de tratamiento de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, que comprende las etapas de

35 a) realizar el método de producción de un polipéptido codificado por el ácido nucleico de la invención, en el que la célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la invención se cultiva en condiciones apropiadas para la expresión de dicho polipéptido y dicho polipéptido se purifica, y

b) administrar el polipéptido obtenido por el método de etapa a) a un sujeto que tiene una alergia tal.

40 Así, la presente invención satisface por primera vez la necesidad de una fosfatasa ácida de veneno de *Hymenoptera* recombinantemente producido o el ADNc que codifica este polipéptido, que puede usarse para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación de ADNc

1.1 Aislamiento de ARN total

45 Se aisló ARN total del aguijón separado de una abeja melífera con saco de veneno unido y glándulas adicionales. El aislamiento de ARN total se realizó usando un kit según el manual (peqGoldTriFast™, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Alemania). El órgano se pesó y homogeneizó en una disolución que contenía isotiocianato de guanidinio y fenol. Se indujo la separación de fases mediante la adición de cloroformo. La fase acuosa se separó después de centrifugación, y el ARN contenido se precipitó con alcohol isopropílico. Después de lavar con etanol diluido, el ARN se disolvió en agua estéril sin RNasa y se usó directamente en experimentos de RT-PCR. Para preparar agua estéril sin RNasa, se trató agua adecuada para el cultivo de células con 0,1 % (v/v) de pirocarbonato de dietilo (DEPC)

durante la noche, y entonces se esterilizó en autoclave durante 20 minutos para destruir el DEPC, produciendo la hidrólisis de DEPC.

1.2 Síntesis de la primera cadena de ADNc

5 Se usó transcriptasa inversa para sintetizar ADNc de la primera cadena a partir del ARN aislado. Para esto, se mezclaron 5 µl de ARN de abeja total con 2 µl (20 pmoles) de cebador de oligonucleótidos y 4 µl de DEPC-agua. Se usó un oligo-dT universal de 20 pares de bases de longitud con el fin de transcribir la porción poli-adenilada de ARNm en la muestra de ARN total. La mezcla de reacción se incubó a 70 °C durante 5 minutos para romper las estructuras secundarias. Después de esto, la reacción se enfrió sobre hielo. Posteriormente, se añadieron 1,5 µl de DEPC-agua, 4 µl de 5x tampón de reacción, 2 µl de mezcla de dNTP (10 mM) y 0,5 µl de inhibidor de ribonucleasa recombinante RNaseOut™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania). La mezcla de reacción se incubó a 37 °C 10 durante 5 minutos. Entonces se añadieron 1 µl (200 unidades) de transcriptasa inversa RevertAid™ M-MuLV (RT, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania) y la reacción se incubó a 42 °C durante 60 minutos. Después de esto, la reacción se detuvo calentando a 70 °C durante 10 minutos y se enfrió sobre hielo.

1.3 RT-PCR

15 Se usó ADNc de la primera cadena de tejido de la glándula de veneno de abeja como molde para la amplificación por PCR de secuencias de ADN de Api m3.

Se usaron fragmentos de péptido conocidos, bases de datos públicas y bioinformática para diseñar los cebadores específicos para Api m3. Estos cebadores han sido diseñados para permitir la subclonación roma de extremos 5' para la expresión del extremo N nativa y subclonación del sitio de restricción Sac II dirigido al extremo 3'. Las 20 secuencias de nucleótidos de los oligonucleótidos son:

Api m3 for, 21mero, extremo roma (SEQ ID NO: 3):

5' -GAA CTT AAA CAA ATA AAT GTG

Api m3 back 32mero, sitio Sac II (SEQ ID NO: 4):

5' -AAC CGC GGT TAC TTA CTT ATT CTC AGT ACC CG.

25 La reacción de PCR contuvo 41 µl de DEPC-agua, 5 µl de 10x tampón de PCR de Pfu completo, 1 µl de cebador directo de Api m3 (100 pmoles), 1 µl de cebador inverso de Api m3 (100 pmoles), 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM), 0,5 µl de ADNc de tejido de glándula de veneno de abeja y 0,5 µl de ADN polimerasa Pfu recombinante (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania), dando un volumen de reacción total de 50 µl.

El programa de temperatura de PCR para la amplificación fue:

Etapa 1: 96 °C, 1 minuto

Etapa 2: 95 °C, 30 segundos

Etapa 3: 55 °C, 30 segundos

Etapa 4: 72 °C, 2 minutos

30 Repetir las etapas 2-4 x 29 veces

Etapa 5: 72 °C, 10 minutos

Etapa 6: 4 °C, hasta el fin

Parte de la reacción de PCR se realizó en un gel al 1 % de agarosa (peqGOLD universal agarose, Peqlab GmbH, Erlangen, Alemania) en 0,5x de tampón TAE y los productos de ADN amplificados se visualizaron con bromuro de etidio e iluminación UV. Fue visible una banda al tamaño esperado.

1.4 Subclonación para secuenciación

35 Se aisló ADN de la reacción de PCR usando el kit de extracción en gel QIAEX II (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). La subclonación para la secuenciación se hizo usando el kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) con el vector pCR®2.1-TOPO® según el manual. Debido al uso de ADN polimerasa Pfu, se introdujo una etapa de reacción de extensión de TA inicial con ADN polimerasa AGS Gold Taq (AGS Hybaid, Heidelberg). El ADN unido se transformó en *E. coli* de la cepa TG1 por electroporación (cubetas de 2 mm, EasyJect+, Hybaid, 40 Heidelberg, Alemania) y se seleccionó en placas de ampicilina-agar.

1.5 Secuenciación

La reacción de secuenciación se hizo con el kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing de ABI (Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Alemania) según el manual. Se realizaron 25 ciclos con una etapa de desnaturalización de 30 segundos a 96 °C, etapa de hibridación de 15 segundos a 50 °C y etapa de extensión de 4 minutos a 57 °C. Los cebadores de secuenciación fueron:

M13/Uni directo (SEQ ID NO: 5): 5' -GTA AAA CGA CGG CCA GTG CCA A

M13/Uni inverso (SEQ ID NO: 6): 5' -CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG A

La secuencia resultante se muestra en la Fig. 1.

Ejemplo 2: Construcción de vector de expresión

2.1 Modificación del vector de expresión de insecto

Para la expresión de Api m 3 recombinante con posibilidades de plegamiento nativo y modificación postraduccional, se eligió la expresión en células de insecto. Se modificó el vector de expresión pIB/V5-His. (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) para facilitar el aislamiento y la purificación. Se añadió una secuencia señal de melitina para la secreción de la proteína recombinante y se optimizó la secuencia de Kozak para tasas de expresión más altas en células de insecto. La secuencia señal de melitina se amplificó a partir de ARN de abeja total, sintetizado como se ha descrito anteriormente, usando los cebadores:

melt leader directo (SEQ ID NO: 7):

5' -GGA AAG CTT TCC GCC ATG GCG AAA TTC TTA GTC

melt leader inverso (SEQ ID NO: 8):

5' -CGG GAT CCC GCA TAG ATG TAA GAA ATG.

Están subrayados los sitios de restricción Hind III y, respectivamente, BamH I, en el cebador correspondiente. La secuencia que contiene 10x marca de histidina y sitio de escisión de factor Xa ha sido clonada entre el sitio BamH I y EcoR V del vector parental. Como primer molde, se usó un vector que contenía marca con los siguientes cebadores:

10xHis directo (SEQ ID NO: 9):

5' -CTG AAT AGC GCC GGA TCC GAC CAT

10xHis inverso (SEQ ID NO: 10):

5' -CCC TCT AGA CTC GAG CCA ATG ATG

Están subrayadas las bases para la introducción del sitio de restricción BamH I. Se usó el fragmento resultante como segundo molde y se modificó adicionalmente para contener un sitio EcoR V en el extremo 3' por uso de cebadores de solapamiento y extensión por PCR de la secuencia (corte y empalme-solapamiento-extensión, SOE). El cebador de extensión usado fue:

SOE Xa (SEQ ID NO: 11):

5'-GGG ATA TCC CTT CCC TCG ATC CCT CTA GAC TC

Está subrayado el sitio de restricción EcoR V recientemente introducido para la clonación y generación de la construcción de vector de expresión. Para todas las etapas de PCR se usó ADN polimerasa Pfu (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania) con condiciones de reacción normales. La temperatura de hibridación fue 55 °C para la amplificación 10x fragmento de histidina y 45 °C para la reacción de SOE.

2.2 Re-PCR y subclonación

Después de la secuenciación de clones de ADNc subclonados seleccionados, se usó el clon para la amplificación secundaria con ADN polimerasa Pfu. El producto de PCR se subclonó en el vector de expresión digerido con EcoR V / Sac II después de la digestión con restricción con Sac II.

2.3 Modificación del vector de expresión bacteriano

Se usó el vector de expresión de mamífero verificado pIB/Mel opt-H10 como molde para la construcción de la inserción para la subclonación en el vector de expresión procarionota pET26(+) (Novagen). El programa de PCR se hizo según el gradiente de temperatura dado en 1.3. Se usó Pfu polimerasa con los cebadores:

Api 3 directo pro-his (SEQ ID NO: 12)

AGAATTTTCATATGAAATTCTTAGTCAACG

Api 3 inverso pro (SEQ ID NO: 13)

AAGAGCTCTTACTTACTTATTCTCAG

Se digirió el amplicón con Sac I y Nde I. Se aisló el fragmento parcialmente digerido del tamaño correcto y se unió al vector previamente digerido.

Ejemplo 3: Expresión de proteína recombinante

3.1 Transfección

- 5 Se usaron células de insecto HighFive (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) como hospedadores para la expresión recombinante de Api m 3. Se purificó ADN de cultivos bacterianos usando E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II (Peqlab GmbH, Erlangen, Alemania) según el manual. Para la transfección de ADN purificado en células se usó el reactivo Cellfectin® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) según el manual.

3.2 Transformación

- 10 Los vectores han sido transformados en célula procariota por electroporación. Las células han sido preparadas mediante procedimientos convencionales. Se hizo electroporación con un instrumento EasyJecT+ (EquiBio, Maidstone, RU) con parámetros estándar según el manual del fabricante.

3.3 Aislamiento de proteína recombinante

La proteína se purificó según procedimientos convencionales.

- 15 En resumen, se rompieron células por sonicación. Se sedimentaron membranas celulares, etc., por ultracentrifugación. Se precipitó proteína, que incluye fosfatasa ácida, por sulfato de amonio a una concentración de 45 %. Entonces se purificó la proteína marcada con His del extracto por cromatografía de afinidad por Ni²⁺ siguiendo las recomendaciones del fabricante (por ejemplo, His Trap™ HP Kit, Amersham Biosciences). La purificación se controló por SDS-PAGE.

- 20 **3.4 Prueba de la actividad de fosfatasa ácida.**

Se confirmó la actividad enzimática de la enzima según el método descrito en Ref. 19.

Leyendas de las figuras

- La Fig. 1 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc aislado para Api m 3 en formato de FASTA (SEQ ID NO: 1).
- 25 La Fig. 2 muestra el patrón de enzima de restricción predicho de ADNc aislado para Api m 3.
- La Fig. 3 muestra la secuencia de aminoácidos traducida predicha del ADNc aislado para Api m 3 (SEQ ID NO: 2). Los péptidos subrayados pueden alinearse con los fragmentos publicados previos. Véanse las Figuras 5 y 6.
- 30 La **Fig. 4A** muestra un mapa de vector de un vector de expresión de célula de insecto preferido, pIB/Mel opt-H10 api m 3. El vector se modificó para incluir una marca 10x histidina de extremo N, escindible con proteasa de factor Xa, además de la secuencia señal de melitina de abeja para la expresión secretada. El gen de interés se clonó entre el sitio EcoR V y Sac II. El gen comprende un codón de terminación en el extremo 3'. La proteína expresada debe secretarse y tendrá una marca 10x histidina escindible por factor Xa en el extremo N.
- 35 La **Fig. 4B** muestra la optimización de la secuencia de Kozak para la expresión de células de insecto. La primera secuencia a) se cambió a b) para ser según la secuencia inicial de traducción preferida (G/A)NNATGG añadiendo una alanina a la secuencia del extremo N.
- La **Fig. 4C** muestra un mapa de vector de un vector de expresión bacteriano preferido, pET26(+) api 3 pro. El vector se modificó para contener el gen de interés entre el sitio Sac I y Nde I. Se tomó la secuencia de proteínas del vector de expresión de mamífero verificado pIB/Mel opt-H10 api m 3.
- 40 La **Fig. 5A** muestra la información de secuencia de posibles fragmentos de péptido de fosfatasa ácida públicamente conocidos antes de la presente invención. Los fragmentos de péptido se enumeran con el fin de alineamiento con fosfatasa de próstata humana y de rata como se publicó en Ref. 20. El orden de alineamiento de los fragmentos con respecto a la secuencia derivada se da en la segunda columna. Posiciones de segmentos de péptidos alineados pueden ser todas de la Fig. 3 y Fig. 5B, además de la Fig. 6. Segmentos de secuencia marcados en la tercera columna muestran aminoácidos presentes en la secuencia de Api m 3. La
- 45 cuarta columna muestra la longitud de los fragmentos de péptido publicados.

La **Fig. 5B** muestra el alineamiento de péptidos corregido originalmente postulado por Hoffmann et al. (Ref. 20) para Api m 3.

La **Fig. 6** muestra un alineamiento esquemático de péptidos postulado por Hoffman et al. (Ref. 20) (A), en comparación con el orden corregido después de la clonación y secuenciación del gen de Api m 3 (B). Es obvio que el alineamiento se diferencia del alineamiento publicado con fosfatasa de próstata humana y de rata (Ref. 20). Los fragmentos de péptido publicados pueden no alinearse para corresponderse con la secuencia como cabría esperar. En primer lugar, el orden de las posiciones de alineamiento es diferente de la publicación. En segundo lugar, algunos fragmentos, como los fragmentos 1 y 7, se alinean parcialmente en diferentes sitios en la secuencia y, por tanto, no son péptidos continuos derivados de una secuencia de ADNc. Además, algunas secuencias de fragmentos publicadas, como el fragmento 5, no pueden alinearse en absoluto. El esquema también muestra el péptido conductor y no es exacto con respecto al número de aminoácidos.

Referencias

1. Helbling A et al., Incidence of anaphylaxis with circulatory symptoms: a study over a 3-year period comprising 940,000 inhabitants of the Swiss Canton Bern, *Clin Exp Allergy* 34, 285-290 (2004).
2. Eich-Wanger C, Müller UR, Bee sting allergy in beekeepers. *Clin Exp Allergy* 28, 1292-98 (1998).
3. Dotimas EM, Hider RC, Honeybee venom, *Bee World* 68(2) 51-70 (1987).
4. Skenderov, Ivanov, Bienenprodukte, ZemizdatVerlagSofia (Bulgaria), (1983).
5. Habermann, E, Bienen- und WespensticheausmedizinischerSicht, *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung (ADIZ)* 11 p., 301-304 (1974).
6. Kulike, H, Zur Struktur und Funktionsweise des Hymenopterenstachels, *Amts- und Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Materialprüfung* 16 p., 519-550 (1986).
7. Sobotka A, Franklin R, Valentine M, Adkinson NF, Lichtenstein LM, Honey bee venom: Phospholipase A as the major allergen, *J Clin Allergy Clin Immunol* 53,103 (1974).
8. Sobotka AK, Franklin RM, Adkinson NF, Valentine MD, Baer H, Lichtenstein LM. Allergy to insect stings. II. Phospholipase A: The major allergen in honeybee venom, *J Allergy ClinImmunol* 57, 29-40 (1976).
9. Hoffman DR, Shipman WH, Allergens in bee venom. I. Separation and identification of the major allergen, *J Allergy ClinImmunol* 58, 551-62 (1976).
10. Kuchler K, Gmachl M, Sippl MJ, Kreil G, Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes, *Eur. J. Biochem.* 184, 249-254 (1989).
11. Gmachl M, Kreil G, Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3569-3573 (1993).
12. Vlasak R, Unger-Ullmann C, Kreil G, Frischauf A-M, Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for honeybee preprome-littin, *Eur. J. Biochem* 135, 123-126 (1983).
13. Hoffman DR, Shipman WH, Babin D, Allergens in bee venom II. Two new high molecular weight allergenic specificities, *J Allergy Clin Immunol.* 59(2), 147-53 (1977).
14. Kettner A, Hughes GJ, Frutiger S, Astori M, Roggero M, Spertini F, Corradin G, Api m 6: a new bee venom allergen, *J. Allergy Clin. Immunol.* 107, 914-920 (2001).
15. Kettner A, Henry H, Hyghes G, Corradin G, Spertini F, IgE and T-cell responses to high-molecular weight allergens from bee venom, *ClinExp Allergy* 29, 394-401 (1999).
16. King TP, Spangfort MD, Structure and Biology of Stinging Insect Venom Allergens, *Int Arch Allergy Immunol* 123, 99-106 (2000).
17. Arbesman CE, Reisman RE, Wypych JI. Allergenic potency of bee antigens measured by RAST inhibition, *Clinical Allergy* 6, 587-94 (1976).
18. Soldatova LN, Bakst JB, Hoffman DR, Slater JE, Molecular cloning of a new honey bee allergen, acid phosphatase, *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, S378 (2000).
19. Barboni E, Kemeny DM, Campos S, Vernon CA, The purification of acid phosphatase from honey bee venom (*Apis mellifica*), *Toxicon* 25(10), 1097-103 (1987).

20. Hoffman DR, Hymenoptera venom proteins, in *Natural Toxins 2*, Edts. Singh BR and Tu AT, Plenum Press, New York 169-186 (1996).
21. King TP, Molecular approaches to the study of allergens, *Allergy* 28, 84-100 (1990).
22. Müller UR, Recombinant Hymenoptera venom allergens, *Allergy* 57, 570-576 (2002).
- 5 23. Müller UR, New Developments in the Diagnosis and Treatment of Hymenoptera Venom Allergy, *Int. Arch Allergy Immunol*, 124, 447-453 (2001).
24. Wypych JI, Abeyounis CJ, Reisman RE, Analysis of differing patterns of cross-reactivity of Honeybee and Yellow jacket venom-specific-IgE: Use of purified venom fractions. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 89, 60-6 (1989).
- 10 25. Castro FFM, Palma MS, Brochetto-Braga MR, Malaspina O, Lazaretti J, Baldo MAB, Biochemical properties and study of antigenic cross-reactivity between Africanized honey bee and wasp venom, *J Invest Allergol Clin Immunol* 4, 37-41 (1994).
26. Hoffman DR, Dove, De, Moffitt JE, Stafford CT. Allergens in Hymenoptera venom XII. Cross-reactivity and multiple reactivity between fire ant venom, bee and wasp venoms, *J Allergy Clin Immunol* 82, 828-34 (1988).
- 15 27. Jacobsen RS, Hoffmann DR. Honey-bee acid phosphatase is a member of the prostatic acid phosphatase family. *J Allergy Clin Immunol* 95, 372 (1995).
28. Sudowe S, Montermann E, Steitz J, Tüting T, Knop J, Reske-Kunz AB. Efficacy of recombinant adenovirus as vector for allergen gene therapy in a mouse model of type I allergy. *Gene Ther* 9, 147-56 (2002).
- 20 29. Hunt KJ, Valentine MD, Sobotka AK, Benton AW, Lichtenstein LM. A controlled study of immunotherapy in insect hypersensitivity. *New Engl. J. Med.* 229, 157 (1978).
30. Schiavino D, Nucera E, Pollastrini E, De Pasquale T, Buonomo A, Bartolozzi F, Lombardo C, Roncallo C, Patriarca G. Specific ultrarush desensitization in Hymenoptera venomallergic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 92(4):409-13 (2004).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> PLS-Design GmbH
- <120> Clonación de alérgeno de abeja melífera
- <130> P 70317
- <160> 13
- <170> PatentIn versión 3.1
- 30 <210> 1
- <211> 1122
- <212> ADN
- <213> Apis mellifera
- 35 <400> 1

ES 2 677 020 T3

```

gaaacttaaac aaataaatgt gatattccgg cacggcgata ggatacccga tgagaaaaac      60
gaaatgtatc cgaagatcc ttatttgtat tatgattttt atccactgga gcgtggcgaa      120
ttgactaact caggtaaaat gcgagaatat caattgggyc aattcttgag agagagatat      180
ggtgactttt tgggagacat ttacacggaa gaatccgtct cggctctcag ctcgttctac      240
gataggacga aaatgtctct gcaactcgta ctgcggcgc tctatccgcc aaataaattg      300
caacaatgga acgaagatct gaactggcaa ccgatcgcca cgaaatattt gcgccgctac      360
gaggacaata tctttttgcc agaagattgt ttgttattta ccatcgaact tgatagagta      420
ttggaatcac cgcgtggaaa gtatgaattc tcgaaatatg acaaattgaa gaaaaaattg      480
gaagaatgga cgggaaaaaa tatcactacg ccatgggatt attattacat atatcataca      540
ctggtggctg aacaatcgta cggctttact ctgccatcut ggacaaataa tatattcccg      600
agaggagaat tgttcgatgc gacggtattt acgtacaaca taaccaattc gactcctttg      660
ttgaaaaaac tttatggagg tccgcttctt cgaatattca ccaagcatat gttagacgtg      720
gtatcgggta cgcaaaagaa aaagcgaag atatacttgt tcagtggaca tgaaagtaat      780
atcgctctcg tgttgcacgc tcttcaactt tattatcctc acgttcctga atattccagt      840
tctattataa tggagcttca caatatcgaa ggcactcact acgtaaagat cgtttactac      900
ttgggtatcc cgtctgaagc gagagaactt caattaccoc gctgcgaggt actttgccct      960
ttgtacaaat atttacaatt gatagagaac gtgataccat cgaacgaaga gttgatctgc     1020
gataaaagat tcgctcgacga atcggcaaac aatttgtcga tcgaagaatt agatttcgtg     1080
aaattgaacc taataaggat agcgggtact gagaataagt aa                          1122

```

<210> 2

<211> 373

5

<212> PRT

<213> Apis mellifera

<400> 2

```

Glu Leu Lys Gln Ile Asn Val Ile Phe Arg His Gly Asp Arg Ile Pro
 1                               5 10 15
Asp Glu Lys Asn Glu Met Tyr Pro Lys Asp Pro Tyr Leu Tyr Tyr Asp
 20 25 30
Phe Tyr Pro Leu Glu Arg Gly Glu Leu Thr Asn Ser Gly Lys Met Arg
 35 40 45
Glu Tyr Gln Leu Gly Gln Phe Leu Arg Glu Arg Tyr Gly Asp Phe Leu
 50 55 60
Gly Asp Ile Tyr Thr Glu Glu Ser Val Ser Ala Leu Ser Ser Phe Tyr
 65 70 75 80
Asp Arg Thr Lys Met Ser Leu Gln Leu Val Leu Ala Ala Leu Tyr Pro
 85 90 95
Pro Asn Lys Leu Gln Gln Trp Asn Glu Asp Leu Asn Trp Gln Pro Ile
 100 105 110
Ala Thr Lys Tyr Leu Arg Arg Tyr Glu Asp Asn Ile Phe Leu Pro Glu
 115 120 125
Asp Cys Leu Leu Phe Thr Ile Glu Leu Asp Arg Val Leu Glu Ser Pro

```

10

ES 2 677 020 T3

	130					135					140						
	Arg	Gly	Lys	Tyr	Glu	Phe	Ser	Lys	Tyr	Asp	Lys	Leu	Lys	Lys	Lys	Lys	Leu
	145					150					155						160
	Glu	Glu	Trp	Thr	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Thr	Pro	Trp	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
					165						170						175
	Ile	Tyr	His	Thr	Leu	Val	Ala	Glu	Gln	Ser	Tyr	Gly	Leu	Thr	Leu	Pro	
				180						185					190		
	Ser	Trp	Thr	Asn	Asn	Ile	Phe	Pro	Arg	Gly	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala	Thr	
			195					200						205			
	Val	Phe	Thr	Tyr	Asn	Ile	Thr	Asn	Ser	Thr	Pro	Leu	Leu	Lys	Lys	Leu	
			210					215						220			
	Tyr	Gly	Gly	Pro	Leu	Leu	Arg	Ile	Phe	Thr	Lys	His	Met	Leu	Asp	Val	
	225					230					235					240	
	Val	Ser	Gly	Thr	Gln	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Ile	Tyr	Leu	Phe	Ser	Gly	
					245						250					255	
	His	Glu	Ser	Asn	Ile	Ala	Ser	Val	Leu	His	Ala	Leu	Gln	Leu	Tyr	Tyr	
				260						265						270	
	Pro	His	Val	Pro	Glu	Tyr	Ser	Ser	Ser	Ile	Ile	Met	Glu	Leu	His	Asn	
			275					280						285			
	Ile	Glu	Gly	Thr	His	Tyr	Val	Lys	Ile	Val	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Pro	
			290					295						300			
	Ser	Glu	Ala	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Glu	Val	Leu	Cys	Pro	
	305					310					315					320	
	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gln	Leu	Ile	Glu	Asn	Val	Ile	Pro	Ser	Asn	Glu	
					325						330					335	
	Glu	Leu	Ile	Cys	Asp	Lys	Arg	Phe	Val	Asp	Glu	Ser	Ala	Asn	Asn	Leu	
				340						345						350	
	Ser	Ile	Glu	Glu	Leu	Asp	Phe	Val	Lys	Leu	Asn	Leu	Ile	Arg	Ile	Ala	
			355					360								365	
	Gly	Thr	Glu	Asn	Lys												
			370														

<210> 3

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótidos

10

<400> 3

gaacttaacaaataaatgt g 21

<210> 4

15 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> cebador de oligonucleótidos

<400> 4
 aaccgcggttacttacttattctcagtacceg 32

5 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos

<400> 5
 gtaaacgacggccagtgccaa 22

15 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos

<400> 6
 caggaaacagctatgaccatga 22

25 <210> 7
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos

35 <400> 7
 ggaaagcttccgcatggcgaaattcttagtc 33
 <210> 8
 <211> 27

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> cebador de oligonucleótidos

<400> 8
cgggatcccgcatagatgtaagaaatg 27

10 <210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> cebador de oligonucleótidos

<400> 9
ctgaatagcgccgatccgacat 24

20 <210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> cebador de oligonucleótidos

<400> 10

30 ccctctagactcgagccaatgatg 24

<210> 11
<211> 32
<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótidos

<400> 11

gggatatcccttcctcgatccctctagactc 32

5

<210> 12

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

10

<400> 12

agaattcatatgaaattcttagtcaacg 29

<210> 13

15

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 13

20

aagagcttactactattctcag 26

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico que codifica un polipéptido capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, en el que el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
2. Ácido nucleico de la reivindicación 1 que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.
- 5 3. Ácido nucleico que codifica un polipéptido capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, en el que el polipéptido codificado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en la que los sitios de glucosilación están mutados.
4. Ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el insecto es una abeja del género *Apis*.
5. Ácido nucleico de la reivindicación 4, en el que la abeja es *Apis mellifera*.
- 10 6. Polipéptido que comprende el polipéptido codificado por un ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 3 unido a un polipéptido adicional como una proteína de fusión.
7. Polipéptido de la reivindicación 6, en el que la proteína está no glucosilada.
8. Polipéptido codificado por un ácido nucleico de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la proteína se expresa en células de insecto.
- 15 9. Polipéptido de las reivindicaciones 6 a 8 que tiene actividad de fosfatasa ácida.
10. Polipéptido de SEQ ID NO: 2, que comprende sitios de glucosilación mutados en lugar de sitios de glucosilación.
11. Polipéptido de la reivindicación 6, en el que el polipéptido adicional está seleccionado del grupo que comprende una marca de poli-histidina, glutatión-S-transferasa, β -galactosidasa, una citocina, una IgG-Fc u otra proteína de veneno de *Hymenoptera* o fragmento antigénico de las mismas.
- 20 12. Vector de expresión que comprende un ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 3 operativamente unido a una secuencia de control de la expresión.
13. Vector de expresión de la reivindicación 12, en el que el ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 3 está unido en marco a un ácido nucleico que codifica un polipéptido adicional.
- 25 14. Vector de expresión de la reivindicación 12, en el que el polipéptido adicional está seleccionado del grupo que comprende una marca de poli-histidina, glutatión-S-transferasa, β -galactosidasa, una citocina, una IgG-Fc u otra proteína de veneno de *Hymenoptera* o fragmento antigénico de las mismas.
15. Vector de expresión de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el vector es adecuado para la expresión en células bacterianas o de insecto.
16. Célula hospedadora que comprende el vector de expresión de las reivindicaciones 12 a 15.
- 30 17. Célula hospedadora de la reivindicación 16, en la que la célula es una célula de insecto o una célula bacteriana.
18. Método de producción de un polipéptido codificado por el ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula hospedadora de las reivindicaciones 16 o 17 se cultiva en condiciones apropiadas para la expresión de dicho polipéptido y dicho polipéptido se purifica.
- 35 19. Vector de expresión de las reivindicaciones 11 a 15 para su uso en el tratamiento de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*.
20. Composición farmacéutica que comprende un vector de expresión de las reivindicaciones 11 a 15.
21. Polipéptido de las reivindicaciones 6 a 11
- o
- 40 polipéptido codificado por un ácido nucleico, que es un fragmento que tiene una longitud superior a 255 nucleótidos del ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 5, y que codifica un polipéptido capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*,
- o
- polipéptido codificado por un ácido nucleico que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de los nucleótidos 78 a 299, 348 a 437, 459 a 476, 555 a 671, 696 a 830 o 1086 a 1121 del ácido nucleico de las reivindicaciones 1 o 2, en

el que el polipéptido codificado por el ácido nucleico es capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*,

o

5 polipéptido codificado por un ácido nucleico que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos del ácido nucleico de las reivindicaciones 1 o 2, excepto los nucleótidos que codifican polipéptidos del grupo que consiste en los aminoácidos 1 a 34, 63 a 80, 100 a 115, 142 a 149, 168 a 176, 224-239 y 258 a 343 del polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2, en el que el polipéptido codificado por el ácido nucleico es capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*,

para su uso en el tratamiento de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*.

10 22. Polipéptido de las reivindicaciones 6 a 11

o

polipéptido codificado por un ácido nucleico, que es un fragmento que tiene una longitud superior a 255 nucleótidos del ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 5, y que codifica un polipéptido capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*,

15 o

polipéptido codificado por un ácido nucleico que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de los nucleótidos 78 a 299, 348 a 437, 459 a 476, 555 a 671, 696 a 830 o 1086 a 1121 del ácido nucleico de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el polipéptido codificado por el ácido nucleico es capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*,

20 o

polipéptido codificado por un ácido nucleico que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos del ácido nucleico de las reivindicaciones 1 o 2, excepto los nucleótidos que codifican polipéptidos del grupo que consiste en los aminoácidos 1 a 34, 63 a 80, 100 a 115, 142 a 149, 168 a 176, 224-239 y 258 a 343 del polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2, en el que el polipéptido codificado por el ácido nucleico es capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*,

25

para su uso en diagnóstico *in vivo* de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*.

23. Uso de un polipéptido de las reivindicaciones 6 a 11

o

30 de un polipéptido codificado por un ácido nucleico, que es un fragmento que tiene una longitud superior a 255 nucleótidos del ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 5, y que codifica un polipéptido capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*,

o

35 de un polipéptido codificado por un ácido nucleico que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de nucleótidos 78 a 299, 348 a 437, 459 a 476, 555 a 671, 696 a 830 o 1086 a 1121 del ácido nucleico de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el polipéptido codificado por el ácido nucleico es capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*,

o

40 of un polipéptido codificado por un ácido nucleico que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos del ácido nucleico de las reivindicaciones 1 o 2, excepto los nucleótidos que codifican polipéptidos del grupo que consiste en los aminoácidos 1 a 34, 63 a 80, 100 a 115, 142 a 149, 168 a 176, 224-239 y 258 a 343 del polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2, en el que el polipéptido codificado por el ácido nucleico es capaz de unirse a IgE de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*,

para el diagnóstico *ex vivo* de sujetos alérgicos al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*.

45 24. Método de diagnóstico de una alergia al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, que comprende las etapas de

a) poner en contacto *in vitro* una muestra de sangre de un sujeto con un polipéptido de las reivindicaciones 6 a 11, y

b) detectar la unión de anticuerpos IgE al polipéptido, en el que detectar anticuerpos IgE que se unen al polipéptido indica dicha alergia.

25. Composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un polipéptido de las reivindicaciones 6 a 11.

5 26. Composición de las reivindicaciones 20 o 25, que comprende además un adyuvante y/o recurso adecuado y/o además polipéptidos del veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*.

27. Método de diagnóstico de una alergia al veneno de un insecto del orden *Hymenoptera*, que comprende las etapas de

a) poner en contacto un polipéptido de las reivindicaciones 6 a 11 *in vitro* con una muestra de sangre de un sujeto, y

10 b) detectar la unión de anticuerpos IgE al polipéptido, en el que detectar anticuerpos IgE que se unen al polipéptido indica dicha alergia.

15 28. Método de preparación de la composición de la reivindicación 25 que comprende la etapa de producir un polipéptido codificado por los ácidos nucleicos de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula hospedadora de las reivindicaciones 16 o 17 se cultiva en condiciones apropiadas para la expresión de dicho polipéptido y dicho polipéptido se purifica.

Fig. 1

LOCUS *Api m 3* 1122 pb ADN
 FUENTE Tejido, glándula de veneno
 ORGANISMO *Apis mellifera*
 RECuento DE BASES 362 a 214 c 238 g 308 t
 ORIGEN

```

1 gaacttaaac aaataaatgt gatattccgg cacggcgata ggatacccga tgagaaaaac
61 gaaatgtatc cgaagatcc ttatttgtat tatgattttt atccactgga gcgtggcgaa
121 ttgactaact caggtaaaat gcgagaatat caattggggc aattcttgag agagagatat
181 ggtgactttt tgggagacat ttacacggaa gaatccgtct cggctctcag ctcgttctac
241 gataggacga aaatgtctct gcaactcgta ctcgggcgc tctatccgcc aaataaattg
301 caacaatgga acgaagatct gaactggcaa ccgatcgcca cgaaatattt ggcgccctac
361 gaggacaata tctttttgcc agaagattgt ttgttattta ccatcgaact tgatagagta
421 ttggaatcac cgcgtggaaa gtatgaattc tcgaaatag acaaattgaa gaaaaaattg
481 gaagaatgga cgggaaaaaa taccactacg ccatgggatt attattacat atatacata
541 ctgggtggctg aacaatcgta cggctctact ctgccatctt ggacaaataa tatattcccg
601 agaggagaat tgttcgatgc gacggtattt acgtacaaca taaccaattc gactcctttg
661 ttgaaaaaac tttatggagg tccgcttctt cgaatattca ccaagcatat gttagacgtg
721 gtatcgggta cgcgaaagaa aaagcgaag atatacttgt tcagtggaca tgaaagtaat
781 atcgctctctg tgttgacgc tcttcaactt tattatcctc acgttcttga atattccagt
841 tctattataa tggagcttca caatatcgaa ggcactcact acgtaaagat cgtttactac
901 ttgggtatcc cgtctgaagc gagagaactt caattaccog gctgcgaggt actttgcctt
961 ttgtacaaat atttacaatt gatagagaac gtgataccat cgaacgaaga gttgatctgc
1021 gataaaagat tcgtcgacga atcggaac aatttgtcga tcgaagaatt agatttcgtg
1081 aaattgaacc taataaggat agcgggtact gagaataagt aa
    
```

//

Fig 2:

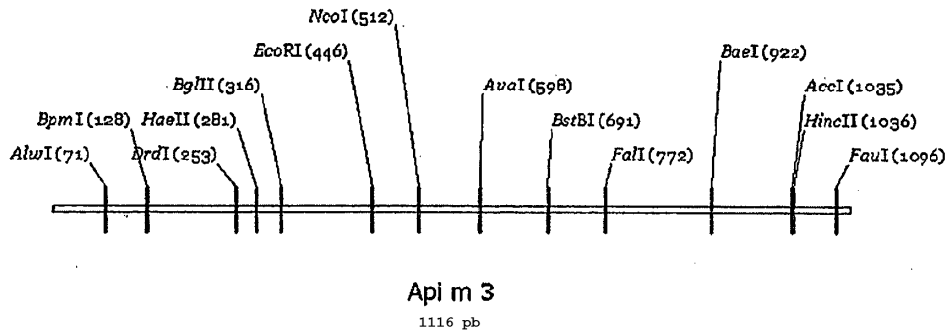


Fig. 3

LOCUS Traducción 374 aa
 DEFINICIÓN Traducción de Api m 3 clonado
 PALABRAS CLAVE TRADUCIDO.
 FUENTE Tejido, glándula de veneno
 ORIGEN

1 ELKQINVIFR HGDRIPDEKN EMYPKDPVLY YDFYPLERGE LTNSGKMREY QLGQFLRERY
 61 GDFLGDITYE ESVSALSSFY DRTKMSLQLV LAALYPPNKL QOWNEDLNWQ PIATKYLRRY
 121 EDNIFLPEDC LLFTIELDRV LESPRGKYEF SKYDKLKKKL EEWTGKNITT PWDYIIYHT
 181 LVAEQSYGLT LPSWTNNIFP RGELFDATVF TYNITNSTPL LKKLYGGPLL RIFTKHMLDV
 241 VSGTQKKKRK IYLFSGHESN IASVLHALQL YYPHVPEYSS SIIMELHNIIE GTHYVKIVYY
 301 LGIPSEAREL QLPGCEVLCP LYKYLQLIEN VIPSNEELIC DKRFVDESAN NLSIEELDFV
 361 KLNLIRIAGT ENK*

Fig. 4A

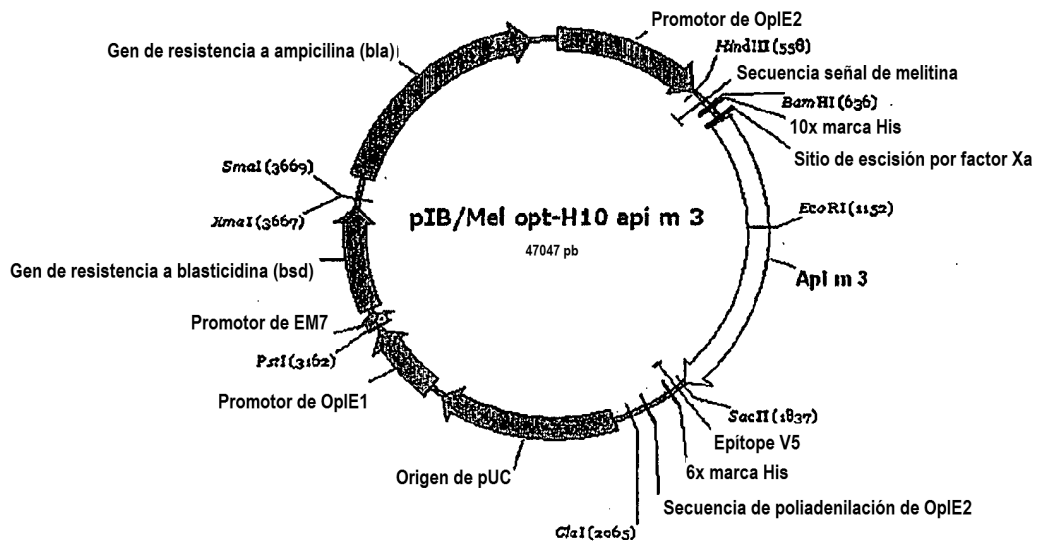


Fig. 4B

- a) AAGCTTATGAAATTC
 M K F
- b) AAGCTTTCCGCCATGGCGAAATTC
 M A K F

Fig. 4C

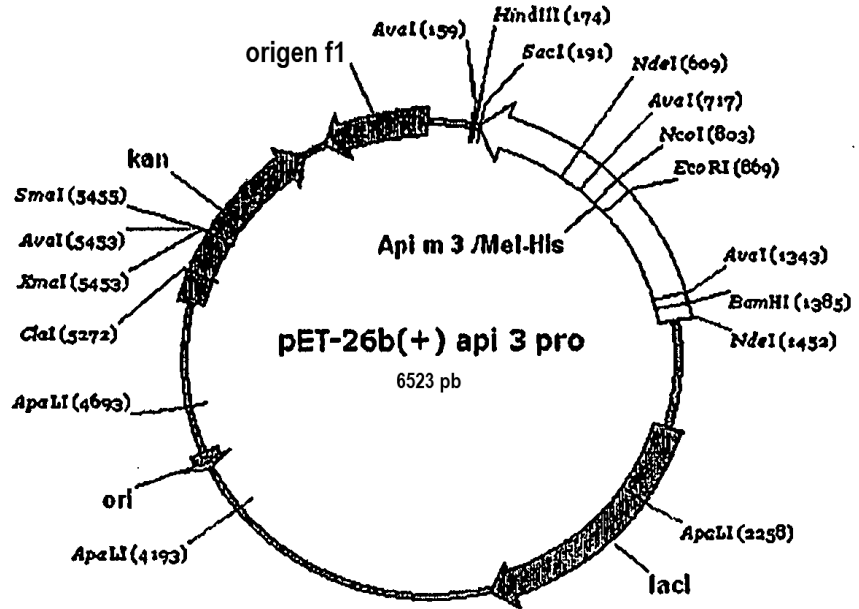


Fig. 5A

Orden de posiciones de alineamiento (Hoffman)	Orden de posiciones de alineamiento (presente invención)	Secuencias de fragmentos de péptidos publicados	Longitud de AA
1	1,4	ELKQINVI FRHGDRIPDEKNEMYPKKLEEWTDK	33
2	8	FVDESANNLSIEEIDFVK	18
3	2	LQOWNEDLNWOPIATK	16
4	3	SKYEFSCR	8
5	-	YNIFAGTWK	9
6	6	LYGGPLLRDNYVGDER	16
7	5,7	DITTPKDYYYYIYHTLVAENEYSSCIIMEYHNIEGTHYVKIVYY LGIPSEARELQLPGCEVLCPLEKYLQLIENVI PSNEELICDKR	86

Fig. 5B

* 20 * 40 *

Api m 3 : ELKQINVI FRHGDRIPDEKNEMYPKDPYLYYDFYPLERGELTNSGKMREY : 50
Hoffman : ELKQINVI FRHGDRIPDEKNEMYPKKL-EEWTDK
Revisado : ELKQINVI FRHGDRIPDEKNEMYPK

60 * 80 * 100

Api m 3 : QLGQFLRERYGDFLGDYITEESVSALSSFYDRTKMSLQVLAAALYPPNKL : 100
Hoffman : [REDACTED] L
Revisado : [REDACTED] L

* 120 * 140 *

Api m 3 : QOWNEDLNWOPIATKYLRRYEDNIFLPEDCLLFTIELDRVLES PRGKYEF : 150
Hoffman : QOWNEDLNWOPIATK SKYEFSCR
Revisado : QOWNEDLNWOPIATK SKYEF

160 * 180 * 200

Api m 3 : SKYDKLKKLEEWTKNITTPWDYYYYIYHTLVAEQSYGLTLPSTNNIFP : 200
Hoffman : YNIFAGTWK
Revisado : SK KLEEW ITTPKDYYYYIYHTLVAE

* 220 * 240 *

Api m 3 : RGE LFDATVFTYNITNSTPLKLYGGPLLRIFTKHMLDVVSGTQKKRK : 250
Hoffman : LYGGPLLRDNYVGDER
Revisado : LYGGPLLR

260 * 280 * 300

Api m 3 : IYLFSGHESNIASVLHALQLYPHVPEYSSSIIMELHNIEGTHYVKIVYY : 300
Hoffman : DITTPKDYYYYIYHTLVAENEYSSCIIMEYHNIEGTHYVKIVYY
Revisado : EYSSCIIMEYHNIEGTHYVKIVYY

* 320 * 340 *

Api m 3 : LGIPSEARELQLPGCEVLCPLYKYLQLIENVI PSNEELICDKRFVDESAN : 350
Hoffman : LGIPSEARELQLPGCEVLCPLEKYLQLIENVI PSNEELICDKR
Revisado : LGIPSEARELQLPGCEVLCPLEKYLQLIENVI PSNEELICDKR [REDACTED]

360 *

Api m 3 : NLSIEELDFVKNLIRIAGTENK- : 373
Hoffman : [REDACTED]
Revisado : [REDACTED]

Fig. 6

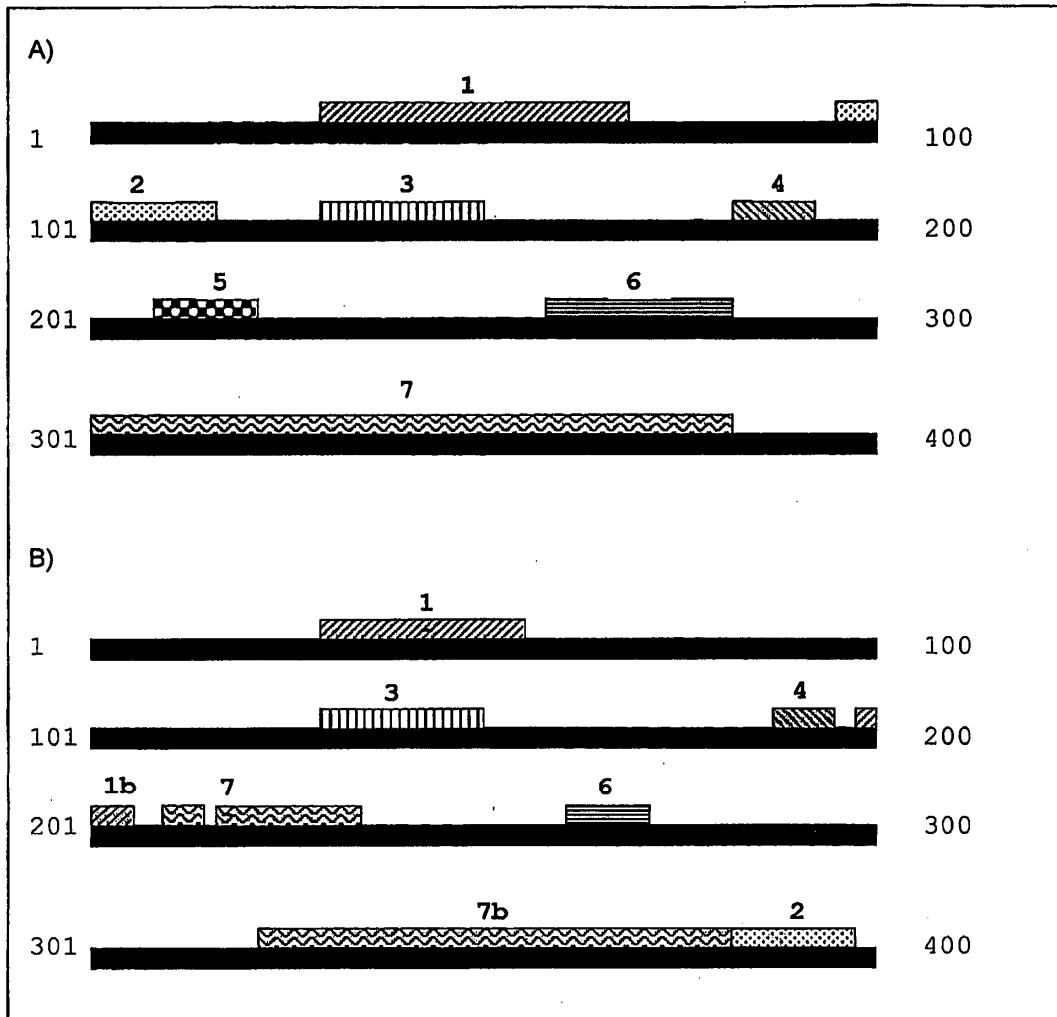


Fig 7

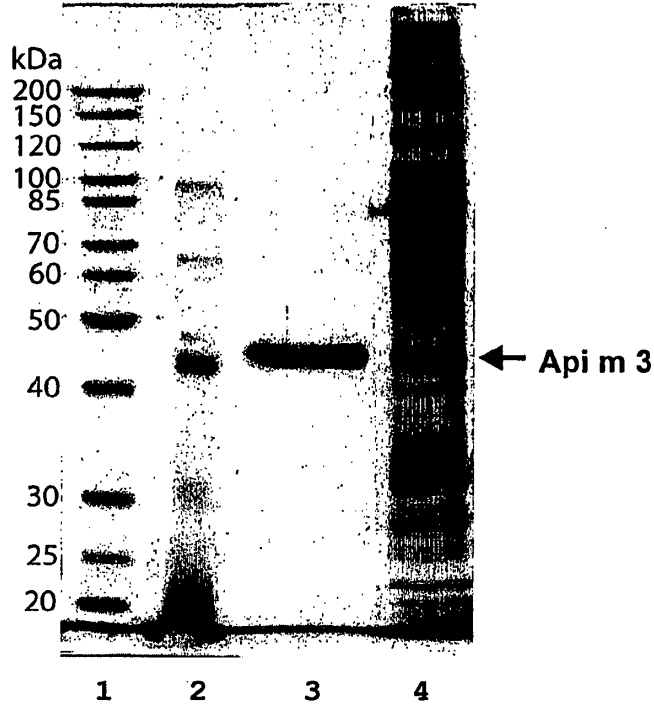


Fig 8

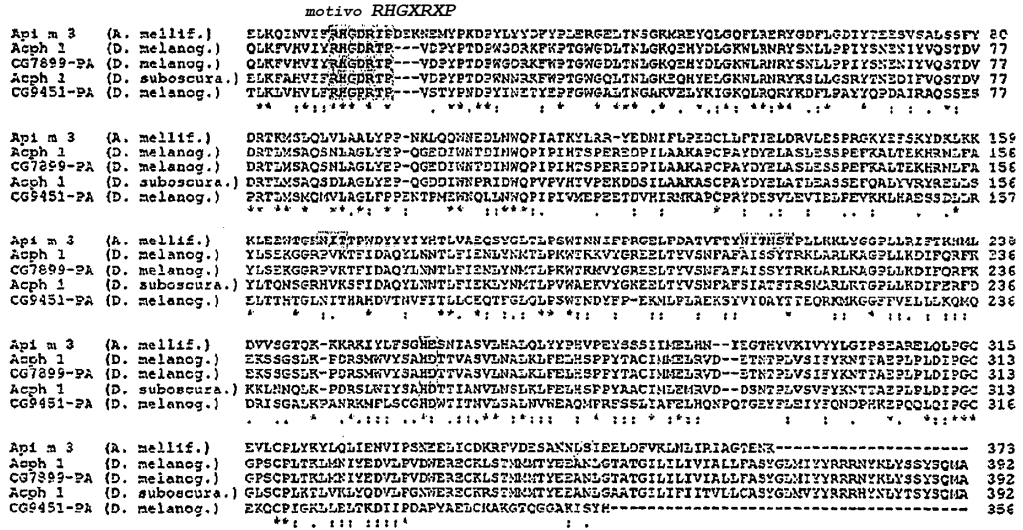


Fig 9

residuos	masa		secuencia
	calculada	medida	
28 - 34	889,52	889,55	QINVIFR
50 - 62	1753,81	1753,85	DPYLYYDFYPLER
73 - 81	1153,60	1153,64	EYQLGQFLR
248 - 255	888,53	888,54	LYGGPLLR
260 - 270	1214,62	1214,65	HMLDVVSGTQK
321 - 332	1380,75	1380,82	IVYYLGIPSEAR

Fig 10

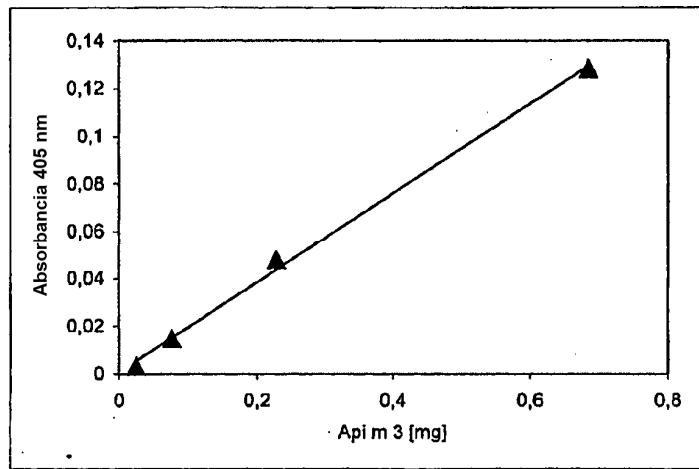


Fig 11

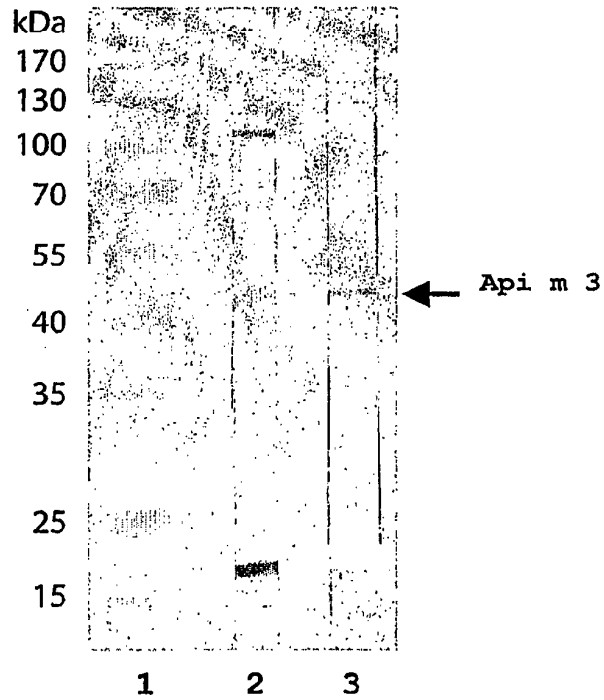


Fig 12

