

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 683**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08805099 .2**
96 Fecha de presentación: **07.10.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2207795**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.07.2010**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR ALERGENO DE GRUPO I DE ACARO RECOMBINANTE MADURO.**

30 Prioridad:
08.10.2007 DK 200701454
09.10.2007 US 978690 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.12.2011

73 Titular/es:
ALK-ABELLÓ A/S
BØGE ALLÉ 6-8
2970 HØRSHOLM, DK

72 Inventor/es:
MONSALVE CLEMENTE, Rafael Ignacio y
HERNANDEZ, Domingo Barber

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 370 683 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir alérgeno de Grupo I de Ácaro recombinante maduro

Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir alérgeno de Grupo I de Ácaro recombinante maduro.

Antecedentes de la invención

El documento WO 01/29078, Ejemplo 2, describe la producción de Derf 1 en *Pichia Pastoris* que comprende el cultivo en medio YPD a pH 6 para producir pro-Der f 1. El sobrenadante del medio de cultivo se recuperó y se diluyó con tampón pH 4,5 y se desarrolló en una columna de SP-Sefarosa equilibrada con tampón pH 4,5. La proteína se diluyó con tampón pH 4,5 con un gradiente de NaCl lineal en 20-25 volúmenes de columna. Este procedimiento produjo dos formas maduras de Der f 1, una que tiene dos aminoácidos adicionales en el extremo N terminal en comparación con el otro. Se afirma que *P. pastoris* es capaz de producir la pro-forma y escindir la para producir la forma madura. En el Ejemplo 12 del documento WO 01/29078 se especula que pro-Der f 1 experimenta autoprocesamiento y se preparó un mutante inactivo que tiene una mutación en el sitio activo. Se preparó un mutante correspondiente de Der p 1. No se indican procedimientos de expresión de los mutantes en el Ejemplo 12.

Yasuhara y col. (Clinical and Experimental Allergy, 2001, Volumen 31, páginas 116-124) describe un procedimiento para producir rDer f 1, en el que la expresión de la pro-forma de Der f 1 de tipo silvestre se obtiene en una etapa, en la que *Pichia Pastoris* se cultiva en medio BMMY a pH 6,0 durante 48-72 horas, después de lo cual se recogió el sobrenadante mediante centrifugación. La activación *in vitro* se logró autocatalíticamente mediante diálisis frente a tampón de acetato 10 mM (pH 4,0) a 4 °C durante 48 horas.

Jacquet y col. (Clin Exp Allergy 2002, 32_1048-1053) divulga la producción de Der p 1 que comprende el cultivo de *P. pastoris* que contiene plásmidos con ADNc que codifica proDer p 1 en medio de glucosa mínimo tamponado (BMG). La expresión se indujo mediante adición diaria de metanol al 0,5 %. El sobrenadante se recogió mediante centrifugación. El proDer p 1 recogido se purificó en una columna y mediante ultrafiltración. El proDer p 1 purificado se sometió a maduración mediante procesamiento autocatalítico de Der p 1 mediante diálisis frente a tampón de acetato de sodio 100 mM pH 4.

De Halleux y col. (J Allergy Clin Immunol, 2006) divulga la producción de rproDer p 1 de tipo silvestre y un mutante no glicosilado de N52Q de rproder p 1. La expresión se llevó a cabo en *Pichia pastoris* X-33 usando pPICZaC como vector de expresión. El cultivo se cultivó a 30 °C en un medio de fermentación especificado. Después el cultivo se indujo con metanol durante 3 días a 30. El pH del medio se ajustó a 6,0 durante el cultivo y la inducción. La mezcla de cultivo que se produjo como resultado de la fermentación se centrifugó y el sobrenadante se dializó frente a tampón de acetato de sodio 25 mM/l pH 4,5 y se mantuvo a 4,5 °C durante aproximadamente 3 a 4 días para automaduración de pro-Der p 1 y pro-Der p 1 N52Q en los alérgenos maduros. Después se realizó la purificación mediante intercambio catiónico en SP-Sefarosa y etapas adicionales.

El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado para producir alérgeno de Grupo I de Ácaro maduro recombinante.

Sumario de la invención

Este objeto se consigue con la presente invención, que se refiere a un procedimiento para producir alérgeno de Grupo I de Ácaro recombinante maduro que comprende las etapas de

- a) proporcionar un sistema de expresión de alérgeno en la forma de una célula huésped seleccionada entre el grupo de levaduras que contienen un vector que comprende ADNc que codifica pro-alérgeno,
- b) cultivar el sistema de expresión de alérgeno en un pH de cultivo de entre 5,5 y 7,5 durante un periodo de cultivo para expresar pro-alérgeno para obtener una mezcla de cultivo que contiene pro-alérgeno,
- c) ajustar el pH de la mezcla de cultivo hasta un pH de maduración de entre 3,5 y 5,0,
- d) mantener la mezcla de cultivo al pH de maduración durante un periodo de maduración para convertir el pro-alérgeno en alérgeno maduro para obtener una mezcla de producto, y
- e) someter la mezcla de producto a un procedimiento de purificación para aislar el alérgeno maduro a partir de la mezcla de producto.

La presente invención se basa en el hallazgo experimental de que es posible llevar a cabo la maduración de pro-alérgeno para obtener alérgeno maduro en la mezcla de cultivo en la que la expresión se ha llevado a cabo sin ninguna separación o purificación previa del producto a partir de la mezcla de cultivo. Un procedimiento de este tipo implica varias ventajas en comparación con los procedimientos de la técnica anterior. En primer lugar, el

procedimiento de la invención se simplifica en el sentido de que permite que la expresión y la maduración se lleven a cabo en el mismo reactor y por lo tanto se elimina la necesidad de una etapa de maduración separada. En segundo lugar, la maduración se puede llevar a cabo inmediatamente después de que la expresión se ha completado sin ninguna etapa de purificación intermedia, lo cual hace posible controlar el procedimiento de maduración más eficazmente, en particular para evitar que la maduración no controlada tenga lugar en las etapas de purificación.

Una tercera ventaja del procedimiento de la invención es que permite una reducción del periodo de maduración, que es importante para minimizar la degradación tanto de pro-alérgeno como de alérgeno maduro y por lo tanto para aumentar el rendimiento.

Una cuarta ventaja es que la expresión y secreción se permite que continúen durante el periodo de maduración, lo cual aumenta el rendimiento y/o permite una reducción del periodo de expresión.

Una quinta ventaja es que las etapas de purificación se simplifican, ya que únicamente la forma madura del alérgeno se está aislando, mientras que en los procedimientos de la técnica anterior la etapa de expresión habitualmente dará como resultado un producto de fermentación que contiene una mezcla de proalérgeno y alérgeno maduro, lo cual hace que sean necesarias las etapas de purificación adicionales.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una SDS-PAGE de muestras de mezcla de cultivo tomadas durante el periodo de maduración a las 0, 3 y 18 horas.

Descripción detallada de la invención

Alérgeno de Grupo I de Ácaro

El alérgeno de Grupo I de Ácaro producido por el procedimiento de la invención puede ser cualquier alérgeno de Grupo I de Ácaro conocido del orden *Astigmata*, en particular un alérgeno seleccionado entre el grupo que consiste en las superfamilias *Acaroidea*, *Glycyphagoidea* y *Analgoidea*, más particularmente seleccionado entre el grupo que consiste en las familias *Acaridae*, *Glycyphagidae*, *Echimyopodidae* y *Pyroglyphidae*, más particularmente seleccionados entre el grupo que consiste en los géneros *Acarus*, *Blomia*, *Dermatophagoides*, *Euroglyphus*, *Glycyphagus*, *Lepidoglyphus* y *Tyrophagus*. En una realización particular de la invención el alérgeno de Grupo I de Ácaro se selecciona entre el grupo que consiste en Aca s 1, Blo t1, Der f 1, Der p 1, Eur m 1, Gly d 1, Lep d 1 y Tyr p 1. Particularmente, el alérgeno de Grupo I de Ácaro se selecciona entre el grupo que consiste en Blo t1, Der f 1, Der p 1 y Eur m 1. Más particularmente el alérgeno de Grupo I de Ácaro es Der p 1.

Adicionalmente, el alérgeno de Grupo I de Ácaro producido mediante el procedimiento de la invención puede ser una isoforma de origen natural de los alérgenos mencionados anteriormente, así como una variante mutada de los alérgenos mencionados anteriormente, por ejemplo, una variante mutada preparada mediante técnicas recombinantes. Las mutaciones se pueden realizar, por ejemplo, para obtener variantes hipoalérgicas de los alérgenos de tipo silvestre, para hacer a los alérgenos más estables y/o más fáciles de expresar y purificar y para cambiar el patrón de glicosilación del alérgeno, por ejemplo, sustituyendo un aminoácido que porta una cadena lateral de glicano.

Sistema de expresión de alérgeno

La célula huésped puede ser cualquier levadura adecuada para este fin, en particular levaduras del orden *saccharomycetales*, más particularmente levaduras seleccionadas entre el grupo que consiste en el género *Pichia*, *Saccharomyces* y *Candida*. En una realización particular de la invención, la célula huésped es de la familia *saccharomycetaceae*, más particularmente seleccionada entre el grupo que consiste en el género *Pichia* y *Saccharomyces*, y más particularmente entre el grupo que consiste en las especies *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*.

El vector puede ser cualquier vector convencional usado como un portador del ADN que codifica el pro-alérgeno y que se puede introducir en la célula huésped y expresar en la misma. En particular, el vector puede ser un plásmido o un fago. Ejemplos de vectores adecuados son el vector lanzadera de *E. coli*/*P. Pastoris* pGAPZαA, pPICZαA, pPICZαB, pPICZαC, pPIC9K y pHIL-S1.

En una realización particular de la invención, el vector incluye un promotor constitutivo, tal como el del gen GAP que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. En una realización particular de la invención, el vector incluye un promotor inducible por metanol, tal como el promotor AOX. En una realización particular de la invención, el vector incluye una secuencia señal para secreción, tal como el factor α y PHO1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

En una realización particular de la invención, la levadura es *Pichia pastoris* y el vector es pGAPZαA.

En una realización particular de la invención la secuencia de aminoácidos del alérgeno se modifica de forma tal que incluya varios restos de histidina en el extremo C terminal de la molécula. Una secuencia de este tipo de restos de

histidina, que habitualmente se denomina etiqueta HIS, forma un sitio de unión a metal para su uso en cromatografía de afinidad para simplificar la purificación de la molécula recombinante de la mezcla líquida de fermentación.

Expresión de pro-alérgeno

- 5 El sistema de expresión de alérgeno se cultiva a un pH de cultivo de entre 5,5 y 7,5 durante un periodo de cultivo para expresar pro-alérgeno para obtener una mezcla de cultivo que contiene pro-alérgeno. En particular, el pH de cultivo está entre 5,8 y 7,2, más preferentemente entre 6,0 y 7,0, más preferentemente entre 6,2 y 6,8.

En una realización particular de la invención, el periodo de cultivo es de 12 horas a 144 horas, preferentemente de 24 horas a 120 horas, más preferentemente de 48 horas a 96 horas.

Maduración de proDer p1 en Der p1 maduro

- 10 El pH de la mezcla de cultivo se ajusta a un pH de maduración de entre 3,5 y 5,0. En una realización particular de la invención, el pH de maduración está entre 3,7 y 4,8 más particularmente entre 3,9 y 4,6 y más particularmente entre 4,0 y 4,5.

- En otra realización particular de la invención, el periodo de maduración es de 8 horas a 30 horas, particularmente de 12 horas a 26 horas, más particularmente de 14 horas a 24 horas, más particularmente de 16 horas a 22 horas y 15 más particularmente de 17 horas a 21 horas.

Procedimiento de purificación

Cualquier procedimiento convencional para separar un producto de proteína de una mezcla líquida de fermentación se puede emplear en el procedimiento de la invención como procedimiento de purificación para aislar alérgeno maduro a partir de la mezcla de producto que se produce como resultado de la maduración.

- 20 Ejemplos de procedimientos de purificación adecuados son centrifugación, filtración, ultrafiltración, diafiltración, diálisis, filtración en gel, precipitación, cromatografía de afinidad y combinaciones de estos procedimientos.

Definiciones

Con respecto a la presente invención se usan las siguientes definiciones:

- 25 El término "pro-alérgeno" significa la pro-forma de una molécula de alérgeno, es decir una molécula de alérgeno que contiene tanto la parte madura como el pro-péptido de la molécula.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de Der p1 recombinante

- Este ejemplo proporciona un procedimiento para producir Der p 1 recombinante maduro después de la expresión de la forma pro-Der p 1 en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. La maduración de la proforma se lleva a cabo en 30 los recipientes de fermentación, ajustando el pH a 4,0 durante un periodo de tiempo definido de forma que todo el pro-Der p 1 se procesa para dar una molécula de Der p 1 madura que se puede purificar posteriormente.

Construcción de variantes de rproDer p 1:

- 35 Se construyó mediante PCR un ADNc de tipo silvestre (wt) de rproderp1 (denominado en lo sucesivo rproderp1) parcialmente optimizado con codón que contiene la región codificante completa de de rproDer p 1 wt (denominado en lo sucesivo rproder p 1) con la adición de una etiqueta His C terminal de 10 aa. La proteína rproder p 1 codificada es equivalente a la región proDer p 1 (aa 19-320) del número de acceso de UniProt P08176 con la excepción de V204A (la numeración en todo este ejemplo es desde el primer aa en proDer p 1), que es una variante de origen natural. Se usó un cebador directo y un cebador inverso para crear un fragmento de 964 pb con sitios de restricción XhoI y XbaI introducidos cerca del extremo 5' y 3', respectivamente. Este gen de rproderp1 se clonó en pCR4- 40 TOPO, se transformó en TOP10 (Invitrogen) y se confirmó la secuencia. La reclonación del gen de rproder p 1 en el vector lanzadera de *E. coli*/P. *pastoris* pGAPZaA se realizó posteriormente mediante clonación direccional con las enzimas de restricción XhoI y XbaI. Esto dio como resultado el plásmido rproderp1 con la región codificada rproder p 1 cadena abajo del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* con un sitio de escisión Kex2 entre las dos proteínas que facilitan la secreción de la proteína recombinante.

- 45 *El plásmido se transformó inicialmente en células TOP10 de E. coli.*

- La construcción de mutación específica de sitio N132D se realizó mediante el procedimiento de extensión por solapamiento. En resumen, se usó un cebador directo 1 junto con un cebador inverso 7 en una reacción de PCR, un cebador inverso 3 se usó junto con un cebador directo 6 en otra reacción de PCR y un cebador inverso 2 se usó 50 junto con un cebador directo 8 en una tercera reacción de PCR, todos con el proderp1 como molde. Se creó después el fragmento completo que contiene la mutación usando los tres productos de PCR resultantes junto con el

cebador 1 y 2 en una reacción de PCR final seguido por clonación direccional del fragmento XhoI-XbaI de 957 pb en pGAPZaA como se ha descrito para proderp1 creando el plásmido rproderp1-N132D (denominado en lo sucesivo rproderp1-N).

Expresión y purificación de variantes de rproDer p 1:

- 5 pGAPZaA-rproderp1-N se transformó en la cepa X33 wt de *P. pastoris* (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los clones se sembraron en estrías nuevamente en placas de YPDZ-agar y se comprobó la expresión. Los clones de *P. pastoris* X33::rproder p 1-N que expresan rproder p 25 1-N132E (denominado en lo sucesivo rproder p 1-N) se cultivaron como se ha descrito en el protocolo suministrado por el fabricante (Invitrogen), en resumen: 5 ml de medio YPDZ (YPD + 100 µg/ml de Zeocina) se inocularon con células a partir de una colonia única y se cultivaron durante una noche en un agitador a 220 rpm a 30 °C. 2 ml de este cultivo se usaron para inocular 400 ml de medio YPD nuevo (extracto de levadura/peptona/dextrosa) que se incubó durante una noche antes de usarlo para inocular 3,6 l de medio YPD para usarse para la fermentación.

La fermentación se lleva a cabo en un sistema B. Braun-Bio Tech International (modelo BIOSTAT B-DCU), en recipientes de capacidad máxima de 5 l, con las siguientes condiciones de fermentación básicas:

- 15 - temperatura a 30 °C
 - velocidad de agitación de 800 rpm
 - suministro de flujo de aire de 0,8 volúmenes por minuto
 - pH controlado inicialmente a pH 6,5, por medio de adición automática de NH₄OH al 30 % o H₂SO₄ al 5 %.

- 20 La fermentación se lleva a cabo en un medio complejo denominado YPD, siendo su composición extracto de levadura al 1 %, peptona de soja al 2 % y dextrosa al 2 %. La densidad celular del cultivo en crecimiento se controla mediante mediciones de la densidad óptica a 600 nm. El oxígeno disuelto, medido por medio de un electrodo de pO₂, se controla con el fin de seguir la división celular (niveles de pO₂ bajos indican consumo de oxígeno elevado debido a actividad celular elevada y niveles de pO₂ crecientes indican actividad celular o división celular más baja debido a, por ejemplo, agotamiento de la fuente de carbono). Si es necesaria la adición de una fuente de carbono, se añade una solución que contiene dextrosa al 5 %, Base de Levadura Nitrógeno al 13,4 % (YNB) y biotina al 0,02 % al cultivo en curso.

Ajuste de pH y maduración de proder p1 en Der p 1 maduro:

- 30 Después de 48 h de fermentación, con un pH controlado de 6,5, el producto recombinado expresado es r-pro-Der p 1, como se puede confirmar mediante SDS-PAGE. Con el fin de que comience el procedimiento de maduración, el pH se disminuye a pH 4,0 y se mantiene en ese nivel, mientras que otras condiciones de fermentación se mantienen constantes. Después de 18 horas a pH ácido, únicamente se observa r-Der p 1 maduro como producto recombinante, consúltese la Figura 1. En el momento de proceder a aislar r-Der p 1 maduro, con el fin de evitar la actividad de proteasas adicional, el pH se eleva a pH 8,0 y se recoge el cultivo.

Procedimiento de purificación:

- 35 El fluido de cultivo que contiene el producto recombinante secretado se aclara y separa a partir de las células de levadura mediante centrifugación y filtración posterior. La precipitación con (NH₄)₂SO₄ (sulfato de amonio) se lleva a cabo en dos etapas, en primer lugar alcanzando una concentración de (NH₄)₂SO₄ de 1,8 M, seguido por la separación de productos precipitados y solubles y en una segunda etapa alcanzando una concentración de sal de 3,2 M del sobrenadante obtenido después de la primera etapa. Esta concentración de sal elevada induce la precipitación selectiva del producto recombinante a partir del sobrenadante que se produce como resultado de la primera etapa, que contiene varios contaminantes de proteína y por lo tanto permite la purificación del producto recombinante. Todas estas etapas se llevan a cabo a 4 °C. Después de la centrifugación, el material precipitado sedimentado se separa de los componentes solubles a concentraciones de sal elevadas y los sedimentos se almacenan a -20 °C.
- 40
- 45 La purificación adicional del producto recombinante (r-Der p 1 maduro) se consigue mediante cromatografía de afinidad, en afinidad por metal BD-TALON (BD Biosciences), de la muestra dializada. El producto recombinante se une específicamente a la columna a través de la etiqueta de histidina y se eluye mediante la adición al tampón de cromatografía (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0) de Imidazol a una concentración final de 300 mM. Las etapas de cromatografía se llevan a cabo en una plataforma AKTAexplorer, a 4 °C. El pico eluido se dializa a solución salina tamponada y la muestra se mantiene congelada.
- 50

Conclusiones:

- 55 Como será evidente a partir de lo anterior el presente ejemplo muestra que es posible llevar a cabo el cultivo para expresar el pro-alérgeno y su maduración en el mismo reactor, es decir, sin llevar a cabo ninguna etapa de separación del pro-alérgeno de los componentes restantes de la mezcla de cultivo antes de la maduración. También, este ejemplo muestra que es posible llevar a cabo la maduración en un periodo de tiempo relativamente corto (18 horas).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir alérgeno de Grupo I de Ácaro recombinante maduro que comprende las etapas de
 - 5 a) proporcionar un sistema de expresión de alérgeno en forma de una célula huésped seleccionada entre el grupo de levaduras que contienen un vector que comprende ADNc que codifica pro-alérgeno,
 - b) cultivar el sistema de expresión de alérgeno a un pH de cultivo de entre 5,5 y 7,5 durante un periodo de cultivo para expresar pro-alérgeno para obtener una mezcla de cultivo que contiene pro-alérgeno,
 - c) ajustar el pH de la mezcla de cultivo hasta un pH de maduración de entre 3,5 y 5,0,
 - 10 d) mantener la mezcla de cultivo al pH de maduración durante un periodo de maduración para convertir el pro-alérgeno en alérgeno maduro para obtener una mezcla de producto, y
 - e) someter la mezcla de producto a un procedimiento de purificación para aislar alérgeno maduro a partir de la mezcla de producto.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la levadura se selecciona entre el grupo que consiste en los géneros *Pichia*, *Saccharomyces* y *Candida*.
- 15 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la levadura es *Pichia pastoris*.
4. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el vector se selecciona entre el grupo que consiste en plásmidos y fagos.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el vector es un plásmido.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el vector se selecciona entre el grupo que consiste en pGAPZaA, pPICZaA, pPICZaB, pPICZaC, pPIC9K y pHIL-S1.
- 20 7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el vector es pGAPZaA.
8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el periodo de cultivo es de 12 horas a 144 horas, preferentemente de 24 horas a 120 horas, más preferentemente de 48 horas a 96 horas.
9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el periodo de maduración es de 8 horas a 30 horas, preferentemente de 12 horas a 26 horas, más preferentemente de 14 horas a 24 horas, más preferentemente de 16 horas a 22 horas y más preferentemente de 17 horas a 21 horas.
- 25 10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el pH de cultivo está entre 5,8 y 7,2, más preferentemente entre 6,0 y 7,0, más preferentemente entre 6,2 y 6,8.
11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el pH de maduración está entre 3,7 y 4,8, más preferentemente entre 3,9 y 4,6 y más preferentemente entre 4,0 y 4,5.
- 30 12. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el alérgeno de Grupo I de Ácaro se selecciona entre el grupo que consiste en Aca s 1, Blo t1, Der f 1, Der p 1, Eur m 1, Gly d 1, Lep d 1 y Tyr p 1.
13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el alérgeno de Grupo I de Ácaro se selecciona entre el grupo que consiste en Blo t1, Der f 1, Der p 1 y Eur m 1.
- 35 14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el alérgeno de Grupo I de Ácaro es Der p1.

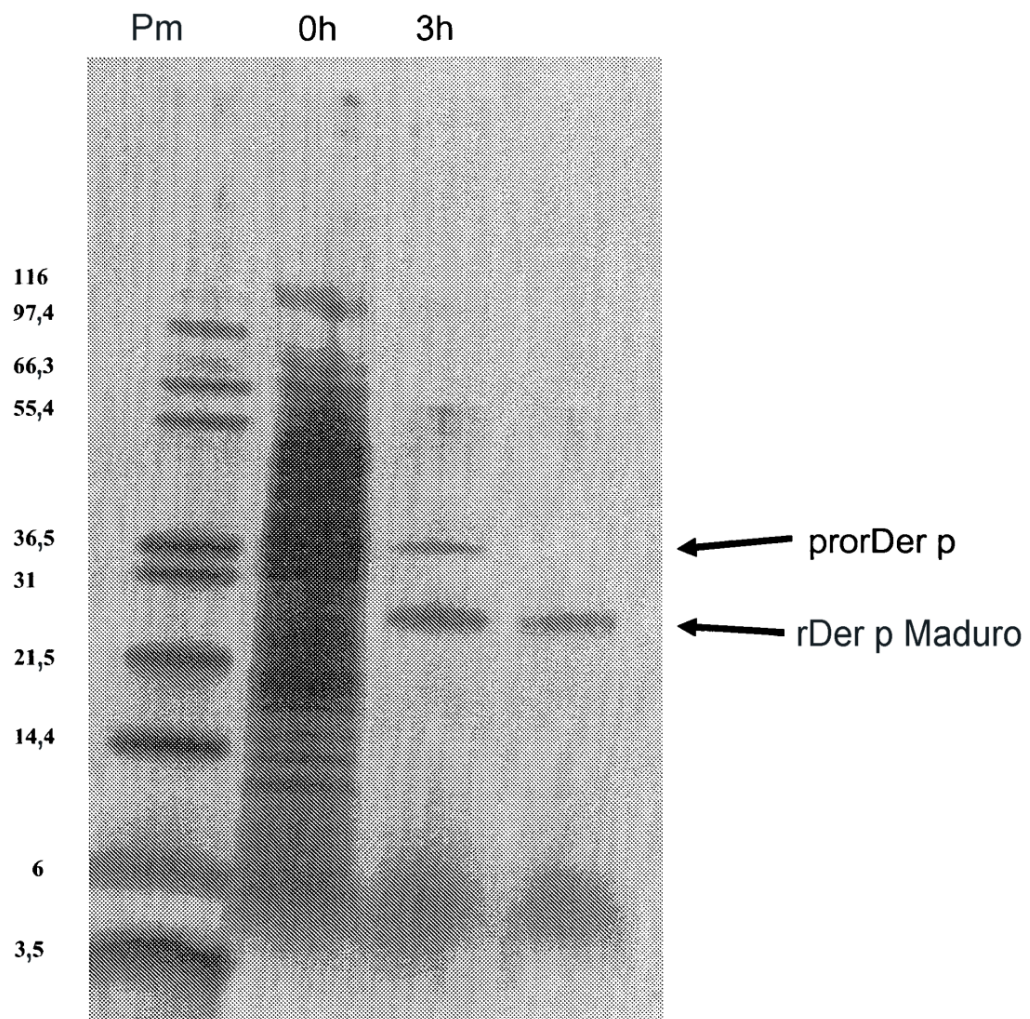


FIG. 1