

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 778**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2004 E 10009855 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2272863**

54 Título: **Derivados de POA P 5 con alergenicidad reducida y reactividad frente a células T mantenida**

30 Prioridad:

04.06.2003 DE 10325508

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

11.03.2013

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**WALD, MARTIN;
CROMWELL, OLIVER;
NANDY, ANDREAS;
KAHLERT, HELGA;
WEBER, BERNHARD y
FIEBIG, HELMUT**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 397 778 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

Derivados de POA P 5 con alergenicidad reducida y reactividad frente a células T mantenida

La presente invención trata de la preparación y uso de variantes del alérgeno del grupo 5 Poa p 5 de *Poa pratensis*, las cuales, en comparación con los alérgenos conocidos de tipo salvaje, presentan una reactividad IgE reducida y mantienen en gran parte una reactividad con linfocitos T, caracterizadas porque en comparación con los alérgenos de tipo salvaje les falta un segmento que corresponde al segmento de la secuencia de aminoácidos 94 – 113 de Phl p 5a o los segmentos que corresponden a los segmentos de la secuencia de aminoácidos 94 – 113 y 175 – 198 de Phl p 5a.

Estas variantes de alérgenos hipoalergénicas pueden utilizarse para inmunoterapia específica (hiposensibilización) de pacientes con alergia al polen de gramíneas o para inmunoterapia preventiva de alergias al polen de gramíneas.

Antecedentes de la invención

Las alergias del tipo 1 tienen importancia en todo el mundo. Hasta un 20% de la población de los países industrializados sufre de dolencias como rinitis alérgica, conjuntivitis o asma bronquial. Estas alergias son provocadas por alérgenos presentes en el aire (aeroalérgenos), que son liberados por fuentes de diferente procedencia, como polen de plantas, ácaros, gatos o perros. Hasta el 40% de estos alérgicos de tipo 1 muestran además reactividad IgE específica con alérgenos del polen de gramíneas (Freidhoff y col., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78,1190-2002).

Las sustancias desencadenantes de las alergias de tipo 1 son proteínas, glicoproteínas o polipéptidos. En personas sensibilizadas, tras la absorción en las mucosas estos alérgenos reaccionan con los anticuerpos IgE que están unidos a la superficie de los mastocitos. Cuando dos moléculas de IgE se enlazan a través de un alérgeno se produce la liberación de mediadores (p. ej., histamina, prostaglandinas) y citoquinas mediante las células efectoras y con ello se desencadenan los correspondientes síntomas clínicos.

Dependiendo de la frecuencia relativa con la que las moléculas de alérgeno individuales reaccionan con los anticuerpos IgE de los alérgicos, se diferencia entre alérgenos mayores y menores.

En el caso de la hierba timotea (*Phleum pratense*) hasta el momento se han identificado como alérgenos principales Phl p 1 (Petersen y col., 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 92: 789-796), Phl p 5 (Matthiesen y Löwenstein, 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 297-307; Petersen y col., 1992, Int. Arch. Allergy Immunol. 98: 105-109), Phl p 6 (Petersen y col., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108, 49-54). Phl p 2/3 (Dolecek y col., 1993, FEBS 335 (3), 299-304), Phl p 4 (Haavik y col., 1985, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78: 260-268; Valenta y col., 1992, Int. Arch. Allergy Immunol. 97: 287-294, Fischer y col., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98:189-198) y Phl p 13 (Suck y col., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 324-332; Suck y col., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402).

Los alérgenos principales dominantes de la hierba timotea (*Phleum pratense*) son Phl p 1 y Phl p 5, donde Phl p 5 se presenta en dos formas diferentes en cuanto a su masa molecular 5a y 5b, que están codificadas por genes independientes. Las secuencias de aminoácidos deducidas tanto para Phl p 5a como para Phl p 5b se pudieron determinar mediante la técnica del ADN recombinante. Phl p 5a es una proteína de aprox. 32 kDa y reacciona con los anticuerpos IgE del 85 - 90% de los alérgicos al polen de gramíneas. Phl p 5a existe en una serie de variantes homólogas que se diferencian entre sí mediante mutaciones puntuales y probablemente corresponden a diferentes formas alélicas. El polen de las especies de gramíneas empleadas como p.ej. *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, entre otros, contienen alérgenos que son homólogos a Phl p 5a y se designan conjuntamente como alérgenos del grupo 5. La elevada homología estructural de estos alérgenos del grupo 5 del tipo gramínea condiciona una correspondiente reactividad cruzada elevada de las moléculas con los anticuerpos IgE de los alérgicos al polen de gramíneas.

La inmunoterapia específica o hiposensibilización representa una aproximación clásica al tratamiento terapéutico eficaz de las alergias (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (6): 336-339, Bousquet y col., 1998, J. Allergy Clin. Immunol. 102(4): 558-562). Así, se inyectan de forma subcutánea a los pacientes extractos de alérgenos naturales en dosis crecientes. No obstante, con este método existe el peligro de reacciones alérgicas o incluso de un choque anafiláctico. Para minimizar estos riesgos se emplean preparados innovadores en forma de alergoides. Se trata de extractos de alérgenos modificados químicamente que presentan una reactividad IgE claramente reducida, aunque presentan idéntica reactividad frente a células T en comparación con el extracto no tratado (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7): 377-382).

Sería posible una optimización más amplia de la terapia con alérgenos preparados de forma recombinante. Cócteles definidos, dado el caso basados en el patrón de sensibilización individual del paciente, de alérgenos recombinantes de elevada pureza podrían reemplazar a los extractos de fuentes de alérgenos naturales, ya que éstos, aparte de los diferentes alérgenos, contienen una gran cantidad de proteínas acompañantes inmunogénicas pero no alérgicas.

Perspectivas realistas, que podrían conducir a una hiposensibilización segura con productos de expresión recombinantes, ofrecen alérgenos recombinantes mutados dirigidos en los cuales se han eliminado de forma

específica epítomos IgE, sin perjudicar a los epítomos de células T esenciales para la terapia (Schramm y col., 1999, J. Immunol. 162: 2406-2414).

5 Otra posibilidad para influenciar terapéuticamente sobre el equilibrio alterado de células T auxiliares en los alérgicos es el tratamiento con ADN capaz de expresarse que codifica para los alérgenos relevantes (vacunación con ADN inmunoterapéutico). Las primeras pruebas experimentales de la influencia alergenoespecífica de la respuesta inmune mediante una vacuna de ADN de este tipo se obtuvieron en roedores mediante la inyección de ADN codificante de alérgeno (Hsu y col., 1996, Nature Medicine 2 (5): 540-544).

10 Así pues, el objetivo en que se basa la presente invención consistió en la preparación de nuevas variantes de alérgenos del grupo 5 Poa p 5 a nivel de proteína y ADN, que se caracterizan por una actividad IgE reducida con un mantenimiento amplio de la reactividad frente a células T y por eso son adecuados para la inmunoterapia específica, así como para la vacunación inmunoterapéutica con ADN.

Figuras

Figura 1: Alineación de fragmentos relevantes de secuencias de ADNc homólogas a Phl p 5a de la especie *Pooideae: Lolium perenne* (Lol p), *Poa pratensis* (Poa p) *Triticum aestivum* (Tri a) y *Hordeum vulgare* (Hor v)

15 Numeración: posiciones de los nucleótidos de las entradas de ADN

Secuencias de Phl p 5a, Poa p 5 y Lol p 5: secuencias de ADNc de la base de datos "Gen-Bank" del centro *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), Bethesda, EE.UU.

Secuencias Hor v y Tri a: secuencias EST de la base de datos EST del instituto *Institute for Genomic Research* (TIGR), Rockville, EE.UU.

20 Marco continuo: identidad de la secuencia para Phl p 5a (referido a GenBank AJ555152)

Marco de puntos: delección correspondiente a los aminoácidos 94-113 (referido a GenBank AJ555152)

Línea discontinua: delección correspondiente a los aminoácidos 175-198 (referido a GenBank AJ555152)

25 Figura 2: Alineación de secuencias de aminoácidos homólogas a Phl p 5a (fragmentos de secuencia relevantes deducidos a partir de secuencias de ADN) de las especies *Pooideae: Lolium perenne* (Lol p), *Poa pratensis* (Poa p) *Triticum aestivum* (Tri a) y *Hordeum vulgare* (Hor v)

Numeración: posiciones de los nucleótidos de las entradas de ADN

Secuencias de Phl p 5a, Poa p 5 y Lol p 5: secuencias de ADNc de la base de datos "Gen-Bank" del centro *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), Bethesda, EE.UU.

30 Secuencias Hor v y Tri a: secuencias EST de la base de datos EST del instituto *Institute for Genomic Research* (TIGR), Rockville, EE.UU.

Marco continuo: identidad de la secuencia para Phl p 5a (referido a GenBank AJ555152)

Marco de puntos: delección correspondiente a los aminoácidos 94-113 (referido a GenBank AJ555152)

Marco discontinuo: delección correspondiente a los aminoácidos 175-198 (referido a GenBank AJ555152)

Figura 3: SDS-PAGE de mutantes de delección puros en forma de proteínas de fusión con histidina

35 1) Marcador

2) rPhl p 5a wt (His)

3) Phl p 5a DM-D94-113 (His)

4) Phl p 5a DM-D94-113, 175-198 (His)

5) Phl p 5a DM-D175-198 (His)

40 6) Marcador

Figura 4: SDS-PAGE de las proteínas sin fusionar puras Phl p 5a DM-D94-113, 175-198 y rPhl p 5a wt (arriba) y ensayo de identidad con anticuerpos aPhl p 5 (abajo)

El aPhl p 5 mAb Apha-1D11 enlaza la región 175-198 (sólo rPhl p 5a wt es positivo)

El aPhl p 5 mAb Apha-3B2 enlaza un epítomo común de ambas moléculas Phl p 5a (ambas proteínas son positivas)

(mAb: anticuerpo monoclonal)

Figura 5: Cromatografía analítica SEC del mutante de delección Phl p 5a DM-D94-113,175-198 y del tipo salvaje Phl p 5a recombinante (proteína no fusionada pura)

Columna: Superdex 75 HR10/30 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia)

5 Eluyente: PBS

Flecha: volumen de exclusión

Figura 6: Isoelectroenfoque no desnaturizante del mutante de delección Phl p 5a DM-D94-113,175-198 y del tipo salvaje Phl p 5a recombinante (proteína no fusionada pura)

1) Marcador IEF

10 2) rPhl p 5a wt

3) Phl p 5a DM-D94-113, 175-198

pI rPhl p 5a wt = 8,7

pI rPhl p 5a DM-D94-113,175-198 = 6,4

15 Figura 7: Ensayo con tiras reactivas para comprobar la capacidad de enlace IgE de los mutantes de delección de Phl p 5a (no desnaturizante)

P: sueros de alérgicos al polen de gramíneas clínicamente definidos

Figura 8: Prueba de la reactividad IgE reducida de los mutantes de delección de Phl p 5a mediante un ensayo de inhibición EAST con dos sueros individuales representativos (a y b) y una mezcla de sueros (c)

- 20
- nPh p 5a/ b
 - rPhl p 5a wt
 - △ rPhl p 5a wt (His)
 - ◇ Phl p 5a DM-Δ94-113 (His)
 - ◆ Phl p 5a DM-Δ175-198 (His)
- 25
- Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198
 - Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 (His)

P: sueros de alérgicos al polen de gramíneas clínicamente definidos

Figura 9: Prueba de la hipoalergenicidad del mutante de delección de Phl p 5a Phl p 5a DM-D94-113, 175-198 mediante un ensayo de activación de basófilos con basófilos de seis alérgicos al polen de gramíneas diferentes (P)

30 Descripción detallada de la invención

Mutagénesis y clonación de secuencias de ADNc

35 El punto de partida para las variantes de Phl p 5a hipoalergénicas especialmente preferidas según la invención es el ADNc de una isoforma del tipo salvaje de Phl p 5a, que se aisló con ayuda de un cebador específico mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) a partir del ADNc completo del polen de hierba timotea (*Phleum pratense*) (NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, EE.UU.) GenBank número AJ555152) (SEC ID N° 1). A partir de la secuencia de ADNc se pudo deducir la secuencia de aminoácidos según SEC ID N° 2. El Phl p 5a, que consta de 284 aminoácidos, se expresó en el citosol de *E. coli* en forma de proteína soluble y a continuación se purificó. Esta forma de tipo salvaje recombinante de Phl p 5a (rPhl p 5a wt) reacciona con anticuerpos monoclonales anti-Phl p 5 y con anticuerpos IgE de alérgicos al polen de gramíneas que presentan una reactividad con Phl p 5a natural puro (nPhl p 5a).

40

A partir del ADNc descrito de rPhl p 5a wt, se preparó una serie de variantes de delección diferentes (mutantes de delección) mediante procedimientos de restricción/ligación y PCR y se ligó en un vector de expresión pProExHTa (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.). Se deleccionaron segmentos de 6 a 72 pares de bases de longitud distribuidos por toda la secuencia de la molécula de ADNc, por lo cual se indujeron las delecciones correspondientes en la cadena polipeptídica de las proteínas expresadas en *E. coli*.

45

La capacidad de enlace de las variantes de delección de Phl p 5a con anticuerpos IgE de una mezcla de sueros representativa de alérgicos al polen de gramíneas se estudió mediante inmunotransferencia.

5 En este procedimiento se descubrieron sorprendentemente dos variantes de delección de Phl p 5a (Phl p 5a DM-Δ94-113, delección de los aminoácidos 94-113 y Phl p 5a DM-Δ175-198, delección de los aminoácidos 175-198 de rPhl p 5a wt), que presentan una unión reducida con anticuerpos IgE (mezcla de sueros representativa).

Estas dos delecciones de Phl p 5a sirvieron de punto de partida para la construcción de un mutante de delección doble, que contiene ambas delecciones eficaces (Phl p 5a DM -Δ94-113, 175-198).

La construcción por ingeniería genética de Phl p 5a DM-Δ94-113, Phl p 5a DM-Δ175-198 y Phl p 5a DM-Δ94-113,175-198, así como su caracterización bioquímica e inmunológica se describen a continuación.

10 Para la construcción de la variante de delección Phl p 5a DM-Δ94-113 (SEC ID N° 3, secuencia ADNc (795 pares de bases), y SEC ID N° 4, secuencia de aminoácidos (264 aa)) se prepararon en primer lugar dos fragmentos a partir del ADNc de rPhl p 5a wt. El fragmento "F1-93", que codifica para los aminoácidos 1-93 de rPhl p 5a wt, se preparó mediante PCR con ayuda de los cebadores 1 y 5, y el fragmento "F114-284" con ayuda de los cebadores 4 y 6 (secuencias de cebadores, ver Tab. 1). Los fragmentos "F1-93" y "F114-284" se utilizaron como matriz en otra PCR
15 bajo el uso de los cebadores 1 y 4, lo que resultó en la amplificación del ADNc completo que codifica para la variante de delección Phl p 5a DM-Δ94-113. La base de la unión de los fragmentos "F1-93" y "F114-284" mediante PCR fue un fragmento de la secuencia común a ambos fragmentos. Este fragmento de la secuencia se formó porque el fragmento "F114-284" se amplificó por PCR mediante un oligonucleótido sentido especial, el cual contiene en la zona 5' una secuencia adicional de ADN que codifica para los aminoácidos 88-93 (Tab. 1).

20 La secuencia de ADNc que codifica para la variante de delección Phl p 5a DM-Δ175-198 (SEC ID N° 5, secuencia de ADNc (783 pares de bases), y SEC ID N° 6, secuencia de aminoácidos (260 aa)) se generó por restricción y a continuación ligación de dos fragmentos de ADNc preparados por separado. El fragmento 5' terminal "F1-174" se preparó con ayuda de los cebadores 1 y 2 y el fragmento 3' terminal "F199-284" con ayuda de los cebadores 3 y 4 mediante PCR. Los fragmentos de ADNc se digirieron con el enzima de restricción *SpeI* y a continuación se ligaron
25 (ver Tab. 1). El producto de ligación se multiplicó mediante el uso de los cebadores 1 y 4 mediante PCR.

El ADNc de la variante de delección Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 (SEC ID N° 7, secuencia ADNc (723 pares de bases), y SEC ID N° 8, secuencia de aminoácidos (240 aa)) se preparó asimismo a partir de dos fragmentos de ADNc. El fragmento 5' terminal se generó con los cebadores 1 y 5 y con el ADNc de rPhl p 5a wt como matriz, y el fragmento 3' terminal con los cebadores 4 y 6 con el ADNc de Phl p 5a DM-Δ175-198 como matriz. A través del
30 fragmento de secuencia común correspondiente a los aminoácidos 88-93 de la proteína rPhl p 5a wt se enlazaron los fragmentos mediante una tercera PCR con los cebadores 1 y 4 y se amplificó el producto.

Los ADNc codificantes para los alérgenos modificados se ligaron sobre los sitios de corte de restricción *EheI* y *HindIII* en el vector de expresión pProExHT (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) y a continuación se secuenciaron completamente.

35 La reactividad cruzada inmunológica de los alérgenos del grupo 5 de *Pooideae*, como p.ej. *Poa pratensis* y *Lolium perenne*, se basa en una secuencia de aminoácidos muy parecida. Se considera seguro que los genes correspondientes se remontan a un gen progenitor común. Tanto para las secuencias de las delecciones Δ94-113 y Δ175-198 de la secuencia proteínica de Phl p 5a wt (referencia: GenBank AJ555152) como para los segmentos de secuencia que las acompañan, existen segmentos de secuencia homólogos en los alérgenos del grupo 5 de
40 *Pooideae*. La elevada homología de los segmentos de secuencia en cuestión se puede comprobar tanto a nivel de ADN como de la secuencia de aminoácidos (Fig. 1 y Fig. 2).

Tabla 1: Lista de los cebadores PCR utilizados para la preparación de variantes de delección

Cebador	SEC ID N°	Dirección	Secuencia (5'→3')
1	9	sentido	gcc gat cta ggc tac ggc ccg gcc
2	10	antisentido	aac ata <u>act agt</u> ggc agc gac ctt gaa ggc ggc gtc
3	11	sentido	atc ta <u>act agt</u> acg ggc ggc gcc tac gaga
4	12	antisentido	aac ata aag ctt tca gac ttt gta gcc acc agt
5	13	antisentido	gga gct gga ttc ggc ggc gcc ctt ggg
6	14	sentido	gcc gcc gaa tcc agc tcc ggc gcg acg cct gag gcc aag tac gac

Los sitios de restricción *SpeI* se indican mediante subrayado.

Expresión y purificación de moléculas de Phl p 5a recombinantes

La expresión de las proteínas recombinantes se realizó como proteínas de fusión con histidina con sitios de corte de proteasa integrados (vector de expresión pProExHT; Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) para una división opcional de la parte de fusión con histidina (His) en *Escherichia coli* (cepa JM109). En primer lugar, rPhl p5a wt así como los mutantes de delección se purificaron a través del enlace específico de los restos de histidina N-terminales sobre una matriz de quelato-Ni²⁺ (cromatografía de afinidad por ion metálico inmovilizado, IMAC, por sus siglas en inglés) y a continuación a través de una filtración en gel preparativa (cromatografía de exclusión por tamaño, SEC, por sus siglas en inglés). La pureza de las proteínas eluidas se controló a través de SDS-PAGE y SEC analítica. Los resultados mostraron que rPhl p 5a wt (His), Phl p 5a DM-Δ94-113 (His); Phl p 5a DM-Δ175-198 (His) y Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 (His) se pueden presentar con elevada pureza y en forma de monómero (Fig. 3). La identidad de las proteínas se comprobó a través de anticuerpos monoclonales específicos de Phl p 5a.

La comprobación de la reactividad IgE mediante técnicas de enlace con IgE (inmunotransferencia sobre membranas, ensayo con tiras reactivas, ensayo de inhibición EAST y ensayo de activación de basófilos) así como la investigación de la reactividad frente a células T se realizó, además, con sustancias de ensayo sin la parte de fusión con histidina. En primer lugar se prepararon las variantes de delección en paralelo con la proteína de referencia rPhl p 5a-wt, como proteína de fusión. Sin embargo, a continuación se cortó enzimáticamente la parte de fusión con histidina (proteasa TEV, Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) por lo cual únicamente quedó una glicina como resto de la secuencia de corte de la proteasa en el extremo N-terminal de la proteína objetivo. Tanto la parte de histidina dividida como la proteasa utilizada para el corte se separaron completamente mediante IMAC. Tras una SEC preparativa, la pureza y la conformación de las proteínas eluidas se estudiaron mediante SDS-PAGE y SEC analítica, como se presenta para rPhl p 5a wt y los mutantes Phl p 5a DM-Δ94-113,175-198 en las figuras 4 o 5. Todas las proteínas se presentaron puras y en forma de monómero. Un ensayo mediante isoelectroenfoque (IEF) no desnaturizante de las proteínas no fusionadas mostró siempre una elevada homogeneidad respecto a la carga superficial (ver Fig. 6, p.ej. para Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198).

La identidad de las proteínas recombinantes se demostró mediante los anticuerpos monoclonales Anti-Phl p 5 (Allergopharma, Reinbek, Alemania) Apha-1D11 o Apha-3B2 (ver Fig. 4, p.ej. para Phl p 5a DM-Δ94-113,175-198) y secuenciación del extremo N-terminal.

Prueba del enlace IgE reducido de las variantes de delección de Phl p 5a

Un método de ensayo simple para determinar la reactividad IgE de moléculas alergénicas es el estudio del enlace de IgE específicas de sueros de alérgicos con proteínas de ensayo unidas a membranas mediante el ensayo con tiras reactivas.

Para ello, las sustancias de ensayo se enlazan una al lado de otra en la misma concentración y cantidad sobre las tiras de membrana de nitrocelulosa en condiciones no desnaturizantes. Una serie de estas tiras de membrana pueden incubarse en paralelo con diferentes sueros de alérgicos. Después de una etapa de lavado, los anticuerpos IgE enlazados específicamente se visualizan sobre la membrana a través de una reacción de coloración, proporcionada por un conjugado de Anti-IgE/ fosfatasa alcalina.

La reactividad IgE de las proteínas recombinantes Phl p 5a wt (His), Phl p 5a DM-Δ94-113 (His), Phl p 5a DM-Δ175-198 (His) y Phl p 5a DM-Δ94-113,175-198 (His) se estudió comparativamente utilizando 43 sueros individuales de alérgicos al polen de gramíneas (Fig. 7). Todos los 43 sueros de alérgicos contenían anticuerpos IgE específicos de Phl p 5a que reaccionaron intensamente con Phl p 5a natural (nPhl p 5a, no mostrado aquí) y el equivalente recombinante rPhl p 5a wt (His). Sorprendentemente, se evidenció que los anticuerpos IgE específicos de Phl p 5a de todos los 43 sueros de pacientes no se enlazaron nada o de forma muy reducida con la variante de delección Phl p 5a DM-Δ94-113,175-198 (His). En enlace IgE reducido se debe atribuir tanto a la delección Δ94-113 como a la delección Δ175-198. La variante de delección Phl p 5a DM-Δ175-198 (His) muestra en este ensayo una capacidad de enlace IgE claramente reducida en 35 de los 43 sueros de alérgicos. En algunos ensayos la influencia de la delección de los aminoácidos 175-198 fue tan elevada que se impidió casi completamente el enlace IgE (p.ej.: P3, P20, P28).

La influencia de la delección Δ94-113 sobre la reactividad de enlace IgE no es tan acentuada, pero asimismo se puede observar claramente. La variante de delección Phl p 5a DM-Δ94-113 (His) se enlazó a IgE de forma claramente más débil que la referencia rPhl p 5a wt (His) en 19 de los 43 sueros de alérgicos (p.ej.: P31, P37, P42). Sin embargo, la reducción del enlace IgE en muchos ensayos individuales fue menos drástica que la reducción provocada por Δ175-198.

Por consiguiente, es evidente que ambas delecciones contribuyen a la reducción de la reactividad de enlace IgE total del mutante de delección Phl p 5a DM-Δ94-113,175-198 (His).

A diferencia del ensayo de tiras reactivas, las interacciones IgE / alérgenos pueden estudiarse en disolución con el ensayo de inhibición EAST (ensayo enzimático alergoabsorbente), con lo cual en principio puede excluirse un

enmascaramiento molesto de los epítomos de las sustancias de ensayo por la inmovilización en la membrana. El ensayo de inhibición EAST se lleva a cabo como sigue. Las placas de microtitulación se recubren con alérgenos, en este caso el PhI p 5 natural (nPhI p 5a/b, mezcla de PhI p 5a y PhI p 5b). Tras eliminar mediante lavado las moléculas de alérgeno no enlazadas, la placa se bloquea con albúmina de suero bovino para prevenir posteriores enlaces no específicos. Los anticuerpos IgE de alérgicos, como mezcla representativa de sueros individuales (mezcla de sueros) o como suero individual, se incuban con las placas de microtitulación recubiertas de alérgenos en un diluyente adecuado. La cantidad de anticuerpos IgE enlazados a alérgenos se cuantifica fotométricamente mediante un enzima acoplado a un anticuerpo secundario (conjugado Anti-IgE/ fosfatasa alcalina) a través de la conversión de un sustrato a un producto final coloreado. El enlace de los anticuerpos IgE se inhibe específicamente según la sustancia a través de un alérgeno soluble o la sustancia a ensayar (alérgeno recombinante modificado) dependiendo de la concentración. Sustancias idénticas inmunológicamente muestran curvas de inhibición idénticas.

Como moléculas de referencia en este trabajo se emplearon nPhI p 5, rPhI p 5a wt, así como la proteína de fusión con histidina rPhI p 5a wt (His). Entre otras moléculas, se ensayó el enlace IgE de las proteínas de fusión con histidina PhI p 5a DM-Δ94-113 (His), PhI p 5a DM-Δ175-198 (His) y PhI p 5a DM-Δ94-113,175-198 (His) así como el de la proteína no fusionada PhI p 5a DM-Δ94-113, 175-198 en comparación con estas referencias.

En la Fig. 8 a-c se presentan representativamente las curvas de inhibición específicas de las sustancias de ensayo, que se aplicaron con dos sueros individuales y una mezcla de sueros de alérgicos al polen de gramíneas. nPhI p 5a/b mostró en todos los ensayos el efecto de inhibición más potente (aprox. 80-95% de efecto de inhibición a una concentración de 10 μg/ml). El efecto de inhibición de rPhI p 5a fue claramente menor con un 70-80% de inhibición máxima. Este efecto se origina por la combinación de nPhI p 5a/b, que junto con la isoforma PhI p 5a también contiene la isoforma PhI p 5b. Los anticuerpos IgE específicos contra PhI p 5b no pueden inhibirse mediante rPhI p 5a wt. La parte de fusión con histidina no mostró ninguna influencia sobre el enlace IgE. Esto es evidente por las curvas de inhibición idénticas de rPhI p 5a wt (His) y rPhI p 5a wt en todos los ensayos. Por consiguiente, se muestra la validez de los ensayos con proteínas de fusión con histidina.

En general se pudieron diferenciar dos grupos de sueros de pacientes respecto al enlace IgE cualitativo. El primer grupo se representa mediante el suero individual P15 (Fig. 8a). Estos sueros de alérgicos contenían anticuerpos IgE, cuyo enlace a PhI p 5a se redujo mediante ambas deleciones, Δ94-113 y Δ175-198. El mutante de deleción PhI p 5a DM-Δ94-113 (His) aquí sólo mostró un efecto de inhibición máximo de aprox. el 50% y el mutante de deleción PhI p 5a DM-Δ175-198 (His) un efecto de inhibición de sólo el 20-30%.

El mutante de deleción doble PhI p 5a DM-Δ94-113, 175-198 (His) pudo inhibir sólo un 0-10% el enlace de los anticuerpos IgE incluso a la máxima concentración utilizada. El empleo de la proteína no fusionada PhI p 5a DM-Δ94-113, 175-198 confirmó este resultado (inhibición IgE máxima del 0-10%).

El segundo grupo de sueros de alérgicos, representado mediante el suero individual P44 (Fig. 8b), se diferencia del primer grupo porque los anticuerpos IgE contenidos en los sueros reaccionaron con PhI p 5a DM-Δ94-113 igual de bien que con la referencia rPhI p 5a wt (His) (inhibición máxima del 70-80%), mientras que ninguna cantidad o una cantidad no detectable de anticuerpos IgE reaccionaron con PhI p 5a DM-Δ175-198 (inhibición máxima de 0-10%).

Igualmente, el mutante de deleción doble PhI p 5a DM-Δ94-113, 175-198 mostró un efecto de inhibición fuertemente reducido (0-10%) con este grupo de sueros de alérgicos, lo que se pudo demostrar tanto para la proteína de fusión como para la proteína sin parte fusionada. Evidentemente, los sueros de estos alérgicos contenían anticuerpos IgE que se dirigen principalmente contra epítomos de la parte C-terminal de la molécula.

Los datos de medición de reactividad del enlace IgE de los anticuerpos IgE de una mezcla de sueros de 20 alérgicos ponen de relieve la importancia de las deleciones Δ94-113 y Δ175-198 para la reducción del enlace IgE de PhI p 5a (Fig. 8c). Ambos mutantes de deleción única, PhI p 5a DM-Δ94-113 (His) y PhI p 5a DM-Δ175-198 (His), muestran con un 40-50% o aprox. un 30% un efecto de inhibición máximo inferior a rPhI p 5a wt (aprox. 70%). El mutante de deleción doble PhI p 5a DM-Δ94-113,175-198 se enlazó sólo muy débilmente a los anticuerpos IgE de la mezcla de sueros (inhibición máxima de 10-15%), lo que indica, coincidiendo con el ensayo de 43 alérgicos en el ensayo de tiras reactivas, una reactividad de enlace IgE muy reducida de esta variante de PhI p 5a en muchos alérgicos al polen de gramíneas, cuando no en todos.

Prueba de hiperalergenicidad de los mutantes de deleción mediante ensayo de activación de basófilos

Mediante un ensayo de activación de basófilos se investigaron los efectos de la capacidad de enlace IgE reducida de los mutantes de deleción sobre la eficacia funcional en la reticulación de IgE enlazados a la membrana de las células efectoras y su activación. Con ello se midió la reducción funcional de la alergenicidad con un ensayo in vitro sensible.

Para el ensayo de activación de basófilos se incubó sangre pura heparinizada de alérgicos al polen de gramíneas con diferentes concentraciones de las sustancias de ensayo. De este modo, las sustancias alergénicas pueden enlazarse específicamente a los anticuerpos IgE, los cuales están asociados con los receptores IgE altamente afines de los granulocitos basófilos.

La reticulación de los complejos IgE/receptor desencadenada por las moléculas de alérgeno conduce a una transducción de señales que tiene como resultado la desgranulación de las células efectoras y, por consiguiente, la activación de las reacciones alérgicas in vivo.

5 In vitro, la activación de inmunocitos basófilos inducida por alérgenos se puede comprobar mediante la cuantificación de la expresión de una proteína superficial (CD203c) acoplada con la transducción de señales de la reticulación del receptor IgE (Kahlert y col., Clinical Immunology and Allergy in Medicine Proceedings of the EAACI 2002 (2003) Nápoles, Italia 739-744). El número de proteínas superficiales expresadas en una célula y el porcentaje de células activadas en una mezcla celular se mide con elevada sensibilidad por el enlace de un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia a la proteína superficial y posterior análisis mediante citometría de flujo activada por fluorescencia.

10 Como sustancias de referencia aquí se utilizaron tanto Phl p 5a natural (nPhl p 5a) purificada como rPhl p5a wt paralelamente a las sustancias de ensayo.

15 Los resultados del ensayo del mutante de delección doble Phl p 5a DM Δ 94-113, 175-198 con basófilos de seis objetos de ensayo se presentan en la figura 9 en forma de curvas. Los resultados de ensayo con basófilos de un total de 10 alérgicos clínicamente definidos se resumen en la tabla 2. Los valores A50 (A50: concentración de alérgeno a un 50% del número máximo de basófilos activados) de las moléculas de referencia varían individualmente entre ~1,3-15 pM para rPhl p 5a wt y ~0,3-10 pM para nPhl p 5a (Tab. 2). Por el contrario, los valores A50 de la variante de delección Phl p 5a DM Δ 94-113, 175-198 se encuentran entre ~18-8400 pM.

20 A partir de los valores A50 determinados de las tres sustancias utilizadas se pudo calcular la eficacia alérgica de la variante de delección Phl p 5a DM- Δ 94-113, 175-198 en relación con las moléculas de referencia no modificadas nPhl p 5a y rPhl p5a wt en cada objeto de ensayo (Tab. 2). La eficacia alérgica relativa (Pr, potencia relativa) de la variante de delección Phl p 5a DM- Δ 94-113, 175-198 disminuyó entre ~12-5000 veces respecto la referencia rPhl p 5a wt o ~16-32000 veces respecto la referencia nPhl p 5a (Tab. 2).

25 Tabla 2: Prueba de la hipoalergenicidad del mutante de delección Phl p 5a DM- Δ 94-113,175-198 mediante ensayo de activación de basófilos.

Donante ^c	Sustancia de ensayo A ₅₀ [pM] ^a			Valor Pr ^b Phl p 5a DM- Δ 94-113, 175-198	Valor Pr ^b Phl p 5a DM- Δ 94-113, 175-198
	nPhl p 5a	rPhl p 5a wt	Phl p 5a DM- Δ 94-113, 175-198	Relativo a rPhl p 5a wt ^d	Relativo a nPhl p 5a ^e
P13	4,08	5,34	477,2	0,0111	0,0085
P17	6,44	2,68	466,6	0,0057	0,0137
P20	0,26	1,68	8433,0	0,0002^f	0,00003^f
P23	1,02	1,26	39,2	0,0321	0,0260
P24	1,22	2,57	58,1	0,0442	0,0209
P28	9,43	11,35	198,2	0,0573	0,0476
P29	1,77	2,34	33,7	0,0694	0,0525
P31	10,15	14,66	3967,0	0,0037	0,0026
P34	3,48	2,54	165,1	0,0153	0,0211
P40	1,08	1,45	17,5	0,0829	0,0617

^a Concentración de alérgeno al 50 % del número máximo de basófilos activados

^b Potencia relativa

^c Alérgicos al polen de gramíneas clínicamente definidos

30 ^d Calculado de A50 rPhl p 5a wt/ A50 Phl p 5a DM- Δ 94-113, 175-198

^e Calculado de A50 nPhl p 5a/ A50 Phl p 5a DM-Δ94-113,175, 175-198

^f Negrilla: valores mínimos y máximos

Reactividad frente a células T

5 Los linfocitos T auxiliares reaccionan con fragmentos peptídicos de los alérgenos (aprox. 12-25 aminoácidos) que se producen en las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) por degradación enzimática y tras el depósito de los péptidos adecuados en las moléculas MHC de clase II individuales, presentan las células T sobre la superficie de las APC. Esta activación alergenoespecífica de los linfocitos T auxiliares es la condición previa para las reacciones posteriores (proliferación, anergia, apoptosis) y para la diferenciación funcional (TH1 y TH2). La influencia de los linfocitos T alergenoespecíficos mediante el tratamiento con un alérgeno o una variante alérgica en la hiposensibilización se considera clave para la eficacia terapéutica.

15 Para investigar la reactividad frente a células T se establecen líneas de células T (TCL, por sus siglas en inglés) de alérgicos al polen de gramíneas bajo estimulación con moléculas nPhl p 5 o rPhl p 5 según los procedimientos convencionales. En un ensayo de proliferación se estimularon diferentes líneas de células T con los alérgenos de referencia nPhl p5a y rPhl p5a wt así como con el mutante de delección doble Phl p 5a DM Δ94-113,175-198. La tasa de proliferación se determinó mediante la producción de timidina-[³H] con los procedimientos convencionales.

Tabla 3: Prueba de la reactividad frente a células T del mutante de delección Phl p 5a DM-Δ94-113,175-198 mediante un ensayo de proliferación con líneas de células T (TCL) específicas de Phl p 5.

Donante ^b	TCL	Índice de estimulación ^a		
		nPhl p 5a	rPhl p 5a wt	Phl p 5a DM-Δ94-133, 175-198
A	3.2	9,8	4,9	4,4
B	8.2	21,0	15,5	13,3
C	11.2	5,2	4,7	7,2
C	11.3	3,3	2,9	3,5
C	11.43	3,0	3,9	2,6
D	19.1	6,5	4,7	7,5
D	19.2	9,6	3,3	2,6
E	23.22	21,8	29,0	20,8
E	23.50	7,5	8,4	6,6
F	89.23	1,8	3,5	1,8

20 ^a Calculado a partir de valores de medición [³H]. Valores de medición cpm de cultivos celulares estimulados con alérgeno/ valores de medición cpm de cultivos celulares no estimulados

^b Donante: alérgicos al polen de gramíneas clínicamente definidos

Los resultados con diez TCL de seis alérgicos muestran que la proliferación de estas TCL se estimuló mediante Phl p 5a DM Δ94-113,175-198 con una fuerza comparable al alérgeno natural no modificado o al alérgeno de tipo salvaje recombinante (Tab. 3).

25 Por consiguiente, son objeto de la presente invención variantes del alérgeno Poa p 5 del grupo 5, las cuales se caracterizan por una reactividad IgE reducida frente a los alérgenos de tipo salvaje conocidos así como una reactividad mantenida con linfocitos T.

30 Puesto que resulta especialmente favorable en el sentido de la presente invención que en los alérgenos del grupo 5 falten o se eliminen fragmentos de la secuencia de aminoácidos que corresponden a los fragmentos de la secuencia de aminoácidos 94-113 y 175-198 del Phl p 5a, en especial son objeto de esta invención tales variantes del alérgeno.

En ellas puede faltar sólo el primer fragmento o el segundo fragmento mencionado, pero también pueden faltar ambos fragmentos mencionados a la vez, siendo la última forma de realización, en especial, totalmente preferida.

5 A causa de la elevada homología de la secuencia dentro de los alérgenos del grupo 5 de *Pooideae*, estos segmentos pueden identificarse claramente en la alineación de la secuencia de PhI p 5a con secuencias de otros alérgenos del grupo 5. Las variantes alérgicas previamente descritas provienen preferentemente de PhI p 5a o corresponden a las secuencias según SEC ID N° 4, 6 o 8.

Es apropiado preparar las variantes de alérgenos según la invención a partir de la secuencia de ADN clonada con ayuda de métodos de ingeniería genética. No obstante, en principio también puede tratarse de modificaciones químicas de los extractos de alérgenos nativos (Fiebig, 1995, *Allergo J.* 4 (7), 377-382).

10 De acuerdo con la naturaleza, sobre las variaciones de los alérgenos del grupo 5 descritas en la presente solicitud de patente, también son posibles otras modificaciones en otras posiciones, por ejemplo para aumentar la hipoadalergenicidad. Estas modificaciones pueden tratarse de, por ejemplo, inserciones, deleciones e intercambios de aminoácidos, divisiones de la proteína en fragmentos, así como fusiones de la proteína o de sus fragmentos con otras proteínas o péptidos.

15 En la preparación de las variantes alérgicas aquí exactamente descritas se introdujo una etiqueta His por ingeniería genética con el fin de mejorar la purificación de las proteínas sobreexpresadas.

20 Además, es objeto una molécula de ADN que codifica para las variantes alérgicas previamente descritas, en especial, correspondiente a una secuencia según SEC ID N° 3, 5 o 7, un vector de expresión recombinante que contenga esta molécula de ADN, así como un organismo huésped no humano transformado con dicha molécula de ADN o dicho vector de expresión. Los organismos huéspedes adecuados pueden ser organismos procariotas o eucariotas, mono- o pluricelulares, como bacterias o levaduras. Un organismo huésped preferente según la invención es *E. coli*.

25 Además, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una variante alérgica según la invención mediante cultivo de dicho organismo huésped y obtención de la variante alérgica correspondiente a partir del cultivo.

Además, son objeto de la presente invención las variantes alérgicas, moléculas de ADN y vectores de expresión previamente descritos en calidad de medicamento.

30 También son objeto de la presente invención las preparaciones farmacéuticas que contienen como mínimo una de estas variantes alérgicas o una molécula de ADN correspondiente o un vector de expresión correspondiente, así como, dado el caso, otros principios activos y/o coadyuvantes para el tratamiento de alergias en cuya activación participan alérgenos del grupo 5 de *Pooideae*, o para la vacunación inmunoterapéutica de pacientes con alergias en cuya activación participan alérgenos del grupo 5 de *Pooideae* y/o para la prevención de tales alergias. Si se trata de preparaciones farmacéuticas del segundo tipo (que contienen como mínimo una molécula de ADN o un vector de expresión), estas preparaciones contienen preferentemente, además, hidróxido de aluminio, un oligonucleótido con CpG inmunoestimulador o una combinación de ambos como coadyuvantes.

35 En el sentido de esta invención, estas preparaciones farmacéuticas pueden utilizarse como agentes terapéuticos en medicina humana o veterinaria. Se tienen en consideración como vehículos sustancias orgánicas o inorgánicas que son apropiadas para la aplicación parenteral y que no reaccionan con las variantes alérgicas del grupo 5 según la invención. Para la aplicación parenteral se emplean en particular soluciones, preferiblemente soluciones oleosas o acuosas, y además suspensiones, emulsiones o implantes. Las variantes alérgicas según la invención también pueden someterse a liofilización y el producto liofilizado obtenido puede emplearse, por ejemplo, para la elaboración de preparaciones inyectables. Las preparaciones mencionadas pueden esterilizarse y/o contener coadyuvantes, como lubricantes, conservantes, estabilizantes y/o humectantes, emulsionantes, sales para influir sobre la presión osmótica, tampones y/o varios principios activos diferentes. Además, mediante la formulación correspondiente de las variantes alérgicas según la invención se pueden obtener preparados de depósito, por ejemplo mediante adsorción en hidróxido de aluminio.

40 Finalmente, es objeto de la presente invención el uso de como mínimo una variante alérgica según la invención o una molécula de ADN según la invención o un vector de expresión según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de alergias en cuya activación participan alérgenos del grupo 5 de *Pooideae*, o para la vacunación inmunoterapéutica de pacientes con alergias en cuya activación participan alérgenos del grupo 5 de *Pooideae* y/o para la prevención de tales alergias.

50

Protocolo de secuencia

<110> Merck Patent GmbH

<120> Derivados de Phl p 5a con alergenicidad reducida y reactividad frente a células T mantenida

<130> P 03/109

<140> DE 10325508.7

<141> 2003-06-04

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 855

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 1
gccgatctag gctacggccc ggccaaccca gctgccccgg cgcgggcta ccccccgcc 60
gccccggccg gagcggagcc agcaggtaag gcgacgaccg aggagcagaa gctgatcgag 120
aagatcaacg cgggcttcaa ggcggccttg gccgctgccc cgggcgtccc gccagcggac 180
aagtacagga cgttcgtcgc aaccttcggc gcggcctcca acaaggcctt cgcggagggc 240
ctctcggggc agccccaggc cgccgccgaa tccagctcca aggccgcgct cacctccaag 300
ctcgacgccg cctacaagct cgcctacaag acagccgagg gcgcgacgcc tgaggccaag 360
tacgaogcct acgtcgccac cctaagcgag gcgctccgca tcatcgccgg caccctcgag 420
gtccacgccg tcaagcccgc ggccgaggag gtcaaggtta tcctgcccgg cgagctgcag 480
gtcatcgaga aggtcgacgc cgccttcaag gtcgctgcca ccgccgcaa cgccgcgccc 540

ES 2 397 778 T3

gccaacgaca agttcacctg cttcgaggcc gccttcaaca acgcatcaa ggcgagcacg 600
 ggcggcgcct acgagagcta caagttcatc cccgccctgg aggccgccgt caagcaggcc 660
 tacgccgcca ccgtcgccac cgcgcccggag gtcaagtaca ccgtctttga gaccgcgctg 720
 aaaaaggcca tcaccgccat gtccgaggcc cagaaggctg ccaagcccgc tgccgctgcc 780
 accgccaccg caacctccgc cgttggcgcg gccaccggcg ccgccaccgc cgctactggt 840
 ggctacaaag tctga 855

<210> 2

<211> 284

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 2

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly Lys Ala Thr
 20 25 30

Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala
 35 40 45

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys Tyr Arg Thr
 50 55 60

Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly
 65 70 75 80

Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala
 85 90 95

Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala
 100 105 110

Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu
 115 120 125

Ser Glu Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val
 130 135 140

Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln

ES 2 397 778 T3

145		150		155		160									
Val	Ile	Glu	Lys	Val	Asp	Ala	Ala	Phe	Lys	Val	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala
			165	165					170					175	
Asn	Ala	Ala	Pro	Ala	Asn	Asp	Lys	Phe	Thr	Val	Phe	Glu	Ala	Ala	Phe
			180					185						190	
Asn	Asn	Ala	Ile	Lys	Ala	Ser	Thr	Gly	Gly	Ala	Tyr	Glu	Ser	Tyr	Lys
		195					200					205			
Phe	Ile	Pro	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Val	Lys	Gln	Ala	Tyr	Ala	Ala	Thr
	210					215					220				
Val	Ala	Thr	Ala	Pro	Glu	Val	Lys	Tyr	Thr	Val	Phe	Glu	Thr	Ala	Leu
225					230					235					240
Lys	Lys	Ala	Ile	Thr	Ala	Met	Ser	Glu	Ala	Gln	Lys	Ala	Ala	Lys	Pro
				245					250					255	
Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Ser	Ala	Val	Gly	Ala	Ala	Thr
			260					265					270		
Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr	Gly	Gly	Tyr	Lys	Val				
	275						280								

<210> 3

<211> 795

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 3																					
gccgatctag	gctacggccc	ggccacccca	gctgccccgg	ccgccggcta	cacccccgcc																60
gccccggccg	gagcggagcc	agcaggtaag	gcgacgaccg	aggagcagaa	gctgatcgag																120
aagatcaacg	ccggcttcaa	ggcggccttg	gccgctgccg	ccggcgctcc	gccagcggac																180
aagtacagga	cgcttcgctgc	aaccttcggc	gcggcctcca	acaaggcctt	cgcgaggggc																240
ctctcggggc	agccaagggg	cgccgccgaa	tccagctccg	gcgcgacgcc	tgaggccaag																300
tacgacgcct	acgtcgccac	cctaagcgag	gcgctccgca	tcatcgccgg	cacccctcgag																360
gtccacgccg	tcaagcccgc	ggccgaggag	gtcaaggtta	tccctgccgg	cgagctgcag																420
gtcatcgaga	aggtcgacgc	cgcttcaag	gtcgctgcca	ccgccgcca	cgccgcgccc																480

ES 2 397 778 T3

gccaacgaca agttcacctt cttcgaggcc gccttcaaca acgccatcaa ggcgagcagc 540
 ggcggcgcct acgagagcta caagttcatc cccgccctgg aggcgcgcgt caagcaggcc 600
 tacgccgcca ccgtcgccac cgcgccggag gtcaagtaca ccgtctttga gaccgcgctg 660
 aaaaaggcca tcaccgcat gtccgaggcc cagaaggctg ccaagcccgc tgccgctgcc 720
 accgccaccg caacctccgc cgttggcgcg gccaccggcg ccgccaccgc cgctactggt 780
 ggctacaaag tctga 795

<210> 4

<211> 264

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 4

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly Lys Ala Thr
 20 25 30

Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala
 35 40 45

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys Tyr Arg Thr
 50 55 60

Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly
 65 70 75 80

Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala Thr
 85 90 95

Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu
 100 105 110

Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala
 115 120 125

Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys
 130 135 140

Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro

ES 2 397 778 T3

145	150	155	160	
Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe Asn Asn Ala Ile	165	170	175	
Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala	180	185	190	
Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala	195	200	205	
Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile	210	215	220	
Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala	225	230	235	240
Thr Ala Thr Ala Thr Ser Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr	245	250	255	
Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val	260			

<210> 5

<211> 783

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 5

gccgatctag gctacggccc ggccacccca gctgccccgg cgcgcggeta ccccccgcc	60
gccccggccg gagcggagcc agcaggtaag ggcgacgacc aggagcagaa gctgatcgag	120
aagatcaacg cgggcttcaa ggcggccttg gccgctgccg cgggcgtccc gccagcggac	180
aagtacagga cgttcgtcgc aaccttcggc gcggcctcca acaaggcctt cgcggagggc	240
ctctcgggcg agcccaaggg cgcgcgcaa tccagctcca aggccgcgct cacctccaag	300
ctcgagcccg cctacaagct cgcctacaag acagccgagg gcgcgacgcc tgaggccaag	360
tacgacgcct acgtcgccac cctaagcgag gcgctccgca tcatcgccgg caccctcgag	420
gtccacgcg tcaagcccgc ggccgaggag gtcaaggtta tccctgccgg cgagctgcag	480
gtcatcgaga aggtcgacgc cgccttcaag gtcgctgcca ccagcaggg cgggccttac	540
gagagctaca agttcatecc cgcctgggag gccgccgtca agcaggceta cgcggccacc	600

ES 2 397 778 T3

gtcgcaccg cgccggaggt caagtacacc gtctttgaga ccgcgctgaa aaaggccatc 660
 accgccatgt ccgaggccca gaaggctgcc aagcccgctg ccgctgccac cgccaccgca 720
 acctccgcg ttggcgcgcc caccggcgcc gccaccgccc ctactggtgg ctacaaagtc 780
 tga 783

<210> 6

<211> 260

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 6

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly Lys Ala Thr
 20 25 30

Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala
 35 40 45

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys Tyr Arg Thr
 50 55 60

Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly
 65 70 75 80

Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala
 85 90 95

Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala
 100 105 110

Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu
 115 120 125

Ser Glu Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val
 130 135 140

Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln
 145 150 155 160

Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ser Thr

ES 2 397 778 T3

	165		170		175	
Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala	180		185		190	
Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys	195		200		205	
Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser	210		215		220	
Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala	225		230		235	240
Thr Ser Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly	245		250		255	
Gly Tyr Lys Val	260					

<210> 7

<211> 723

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 7

gccgatctag gctacggccc ggccaccca gctgccccgg cgcgcggcta ccccccgcc	60
gccccggccg gagcggagcc agcaggtaag gcgacgaccg aggagcagaa gctgatcgag	120
aagatcaacg ccggcttcaa ggcggccttg gccgctgccc ccggcgctcc gccagcggac	180
aagtacagga cgttcgtcgc aaccttcggc gcggcctcca acaaggcctt cgcggagggc	240
ctctcggggc agcccaaggc cgccgcccga tccagctccg gcgcgacgcc tgaggccaag	300
tacgacgcct acgtcgccac cctaagcgag gcgctccgca tcatcgccgg caccctcgag	360
gtccacgccc tcaagcccgc ggccgaggag gtcaaggtta tccctgcccg cgagctgcag	420
gtcatcgaga aggtcgacgc cgccttcaag gtcgctgcca ccagcacggg cggcgcctac	480
gagagctaca agttcatccc cgccctggag gccgcccgtca agcaggccta cgccgccacc	540
gtcgccaccg cgccggaggt caagtacacc gtctttgaga ccgcgctgaa aaaggccatc	600
accgccatgt ccgagggcca gaaggctgcc aagcccgctg ccgctgccac cgccaccgca	660
acctccgccc ttggcgccgc caccggcgcc gccaccgccc ctactggtgg ctacaaagtc	720

tga

723

<210> 8

<211> 240

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 8

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly Lys Ala Thr
20 25 30

Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala
35 40 45

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys Tyr Arg Thr
50 55 60

Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly
65 70 75 80

Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala Thr
85 90 95

Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu
100 105 110

Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala
115 120 125

Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys
130 135 140

Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ser Thr Gly Gly Ala Tyr
145 150 155 160

Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala
165 170 175

Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe
180 185 190

ES 2 397 778 T3

Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys
 195 200 205

Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ser Ala Val
 210 215 220

Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 225 230 235 240

<210> 9

<211> 24

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 9
 gccgatctag gctacggccc ggcc 24

<210> 10

<211> 36

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 10
 aacataacta gtggcagcga ccttgaaggc ggcgtc 36

<210> 11

<211> 30

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 11
 atctaactag tacgggcggc gcctacgaga 30

<210> 12

<211> 33

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 12
aacataaagc tttcagactt tgtagccacc agt 33

<210> 13

<211> 27

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 13
ggagctggat tcggcggcgc ccttggg 27

<210> 14

<211> 45

<212> ADN

<213> Phleum pratense

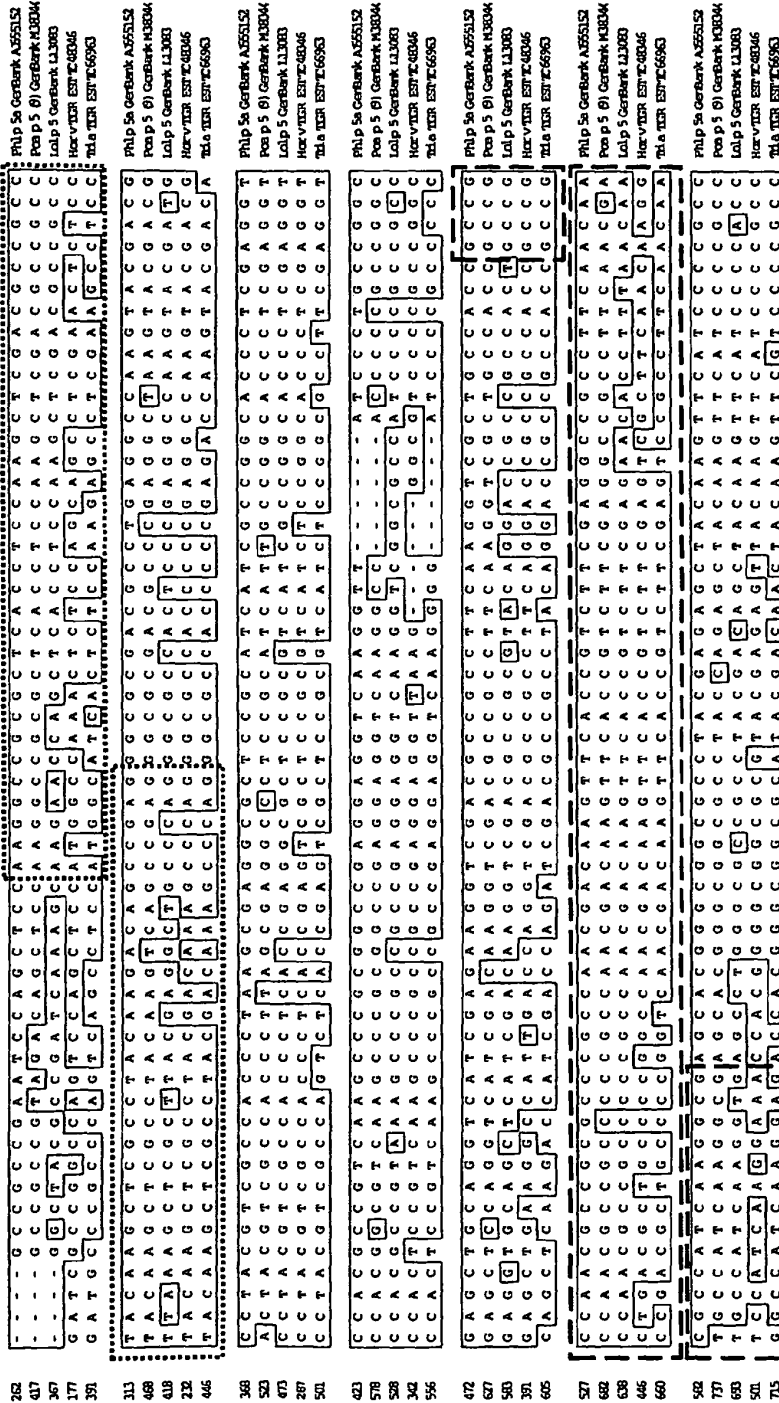
<400> 14
gccgccgaat ccagctccgg cgcgacgcct gaggccaagt acgac 45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Variantes del alérgeno Poa p 5 del grupo 5, las cuales, en comparación con los alérgenos conocidos de tipo salvaje, presentan una reactividad IgE reducida y mantienen en gran parte la reactividad con linfocitos T, caracterizadas porque en comparación con los alérgenos de tipo salvaje conocidos les falta un segmento que corresponde al segmento de la secuencia de aminoácidos 94 – 113 del PhI p 5a o los segmentos que corresponden a los segmentos de la secuencia de aminoácidos 94 – 113 y 175 – 198 del PhI p 5a.
2. Variantes alérgicas según la reivindicación 1 caracterizadas porque se obtienen mediante métodos de ingeniería genética recombinantes.
3. Molécula de ADN que codifica para una variante alérgica según la reivindicación 1 o 2.
- 10 4. Vector de expresión recombinante que contiene una molécula de ADN según la reivindicación 3, funcionalmente unido a una secuencia de control de expresión.
5. Un organismo huésped no humano, transformado con una molécula de ADN según la reivindicación 3 o un vector de expresión según la reivindicación 4.
- 15 6. Procedimiento para la preparación de una variante alérgica según la reivindicación 1 o 2 mediante cultivo de un organismo huésped según la reivindicación 5 y obtención de la variante alérgica correspondiente a partir del cultivo.
7. Variante alérgica según la reivindicación 1 o 2 como medicamento.
8. Preparación farmacéutica que contiene como mínimo una variante alérgica según la reivindicación 1 o 2 y, dado el caso, otros principios activos y/o coadyuvantes para el tratamiento de alergias en cuya activación participan alérgenos del grupo 5 de *Pooideae*.
- 20 9. Uso de como mínimo una variante alérgica según la reivindicación 1 o 2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de alergias en cuya activación participan alérgenos del grupo 5 de *Pooideae*.
10. Molécula de ADN según la reivindicación 3 como medicamento.
11. Vector de expresión recombinante según la reivindicación 4 como medicamento.
- 25 12. Preparación farmacéutica que contiene como mínimo una molécula de ADN según la reivindicación 10 o al menos un vector de expresión según la reivindicación 11 y, dado el caso, otros principios activos y/o coadyuvantes para la vacunación inmunoterapéutica con ADN de pacientes con alergias en cuya activación están implicados alérgenos del grupo 5 de *Pooideae* y/o para la prevención de dichas alergias.
- 30 13. Preparación farmacéutica según la reivindicación 12 que contiene hidróxido de aluminio, un oligonucleótido inmunoestimulador con CpG o una combinación de ambos como coadyuvantes .
14. Uso de al menos una molécula de ADN según la reivindicación 10 o al menos un vector de expresión según la reivindicación 11 para la preparación de un medicamento para la vacunación inmunoterapéutica con ADN de pacientes con alergias en cuya activación participan alérgenos del grupo 5 de *Pooideae* y/o para la prevención de dichas alergias.

Figura 1

Alineación de fragmentos relevantes de secuencias de ADNc homólogas a Phi p 5a de la especie *Pooideae: Lolium perenne* (Lol p), *Poa pratensis* (Poa p) *Triticum aestivum* (Tri a) y *Hordeum vulgare* (Hor v)



Numeración: posiciones de los nucleótidos de las entradas de ADN
 Secuencias de Phi p 5a, Poa p 5 y Lol p 5: secuencias de ADNc de la base de datos "Gen-Bank" del centro National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, EE.UU.
 Secuencias Hor v y Tri a: secuencias EST de la base de datos EST del instituto Institute for Genomic Research (TIGR), Rockville, EE.UU.
 Marco continuo: identidad de la secuencia para Phi p 5a (referido a GenBank AJ555152)
 Marco de puntos: delección correspondiente a los aminoácidos 94-113 (referido a GenBank AJ555152)
 Línea discontinua: delección correspondiente a los aminoácidos 175-198 (referido a GenBank AJ555152)

Figura 2

Alineación de secuencias de aminoácidos homólogas a Phl p 5a (fragmentos de secuencia relevantes deducidos a partir de secuencias de ADN) de las especies *Poideae*: *Lolium perenne* (Lol p), *Poa pratensis* (Poa p) *Triticum aestivum* (Tri a) y *Hordeum vulgare* (Hor v)

169	P P A D K Y R T F V A T F G A A S N K A F A E G L S G E P K	Phlp 5a GenBank AJ55152
324	P A A N K Y K T F V A T F G A A S N K A F A E A L S T E P K	Poa p 5 (θ) GenBank M38344
286	P P A D K Y K T F V E T F G T A T N K A F V E G L A S - - -	Lolp 5 GenBank L13083
82	P P A D K Y K T F E A T F A A A S N K A F A E V L K G A A T	Hor v TIGR EST C48346
296	P P A D K Y K T F E A T F S A A S N X A F A D V L K A A A S	Tri a TIGR EST C66963
.....		
259	G - - A A E S S S S K A A L T S K L D A A Y K L A Y K T A E : G	Phlp 5a GenBank AJ55152
414	G - - A A V D S S K A A L T S K L D A A Y K L A Y K S A E : G	Poa p 5 (θ) GenBank M38344
367	- - - G Y A D Q S K N Q L T S K L D A A L K L A Y E A A Q : G	Lolp 5 GenBank L13083
172	G Q I A G Q S S S M A K L S S S L E L S Y K L A Y D K A Q : G	Hor v TIGR EST C48346
386	G Q M P A Q S A S M A S L S K S L E A S Y K L A Y D K A Q : G	Tri a TIGR EST C66963
.....		
343	A T P E A K Y D A Y V A T L S E A L R I I A G T L E V H A V	Phlp 5a GenBank AJ55152
498	A T P E A K Y D D Y V A T L S E A L R I I A G T L E V H G V	Poa p 5 (θ) GenBank M38344
448	A T P E A K Y D A Y V A T L T E A L R V I A G T L E V H A V	Lolp 5 GenBank L13083
262	A T P E A K Y D A Y V A T L T E S L R V I S G T L E V H S V	Hor v TIGR EST C48346
476	A T P E T K Y D T Y V A S L T E S L R V I S G A F E V H S V	Tri a TIGR EST C66963
.....		
433	K P A A E E V K V - - I P A G E L Q V I E K V D A A F K V A	Phlp 5a GenBank AJ55152
588	K P A A E E V K A - - T P A G E L Q V I D K V D A A F K V A	Poa p 5 (θ) GenBank M38344
538	K P A A E E V K V G A I P A A E V Q L I D K V D A A Y R T A	Lolp 5 GenBank L13083
352	K P A A E E V K - - G V P A G E L K A I D Q V D A A F R T A	Hor v TIGR EST C48346
566	K P A A E E V K G K X I P A P Q L K T I D Q I D A A Y R T A	Tri a TIGR EST C66963
.....		
517	A T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N A I K A S T G G	Phlp 5a GenBank AJ55152
672	A T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K A S T G G	Poa p 5 (θ) GenBank M38344
628	A T A A N A A P A N D K F T V F E N T F N N A I K V S L G A	Lolp 5 GenBank L13083
436	A T A A D A A P A N D K F T V F E S L Q Q G P S R K P R C G	Hor v TIGR EST C48346
650	A T A A D A A P V N D K F T V F E S A F N K A I K E T T G G	Tri a TIGR EST C66963
.....		
607	A Y E S Y K F I P A L E A A V K Q A Y A A T V A T A P E V K	Phlp 5a GenBank AJ55152
762	A Y Q S Y K F I P A L E A A V K Q S Y A A T V A T A P A V K	Poa p 5 (θ) GenBank M38344
718	A Y D S Y K F I P T L V A A V K Q A Y A A K Q A T A P E V K	Lolp 5 GenBank L13083
526	A Y E S Y K F I P A L E A A V K Q A Y A A T V A A A P E V K	Hor v TIGR EST C48346
740	A Y D N Y K F V P A L E S A V K Q A Y A A T V A S A P E V K	Tri a TIGR EST C66963
.....		
697	Y T V F E T A L K K A I T A M S E A Q K A A K P A A A A T A	Phlp 5a GenBank AJ55152
852	Y T V F E T A L K K A I T A M S Q A Q K A A K P A A A A T G	Poa p 5 (θ) GenBank M38344
808	Y T V S E T A L K K A V T A M S E A E K E A T P A A A A T A	Lolp 5 GenBank L13083
616	F T V F Q T A L S K A I N A M T Q A G K V A K P A A A A T A	Hor v TIGR EST C48346
830	Y A V F Q A A L S K A I N A M V E A E K D A G A A A A G G Y	Tri a TIGR EST C66963

Numeración: posiciones de los nucleótidos de las entradas de ADN

Secuencias de Phl p 5a, Poa p 5 y Lol p 5: secuencias de ADNc de la base de datos "Gen-Bank" del centro *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), Bethesda, EE.UU.

Figura 3

SDS-PAGE de mutantes de delección puros en forma de proteínas de fusión con histidina

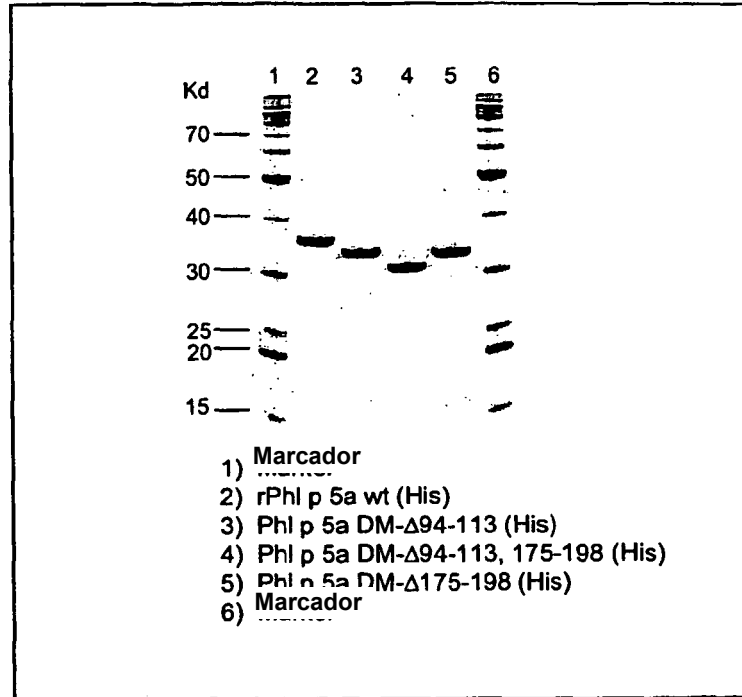


Figura 4

SDS-PAGE de las proteínas sin fusionar puras Phlp 5a DM- Δ 94-113, 175-198 y rPhlp 5a wt (arriba) y ensayo de identidad con anticuerpos α Phl p 5 (abajo)

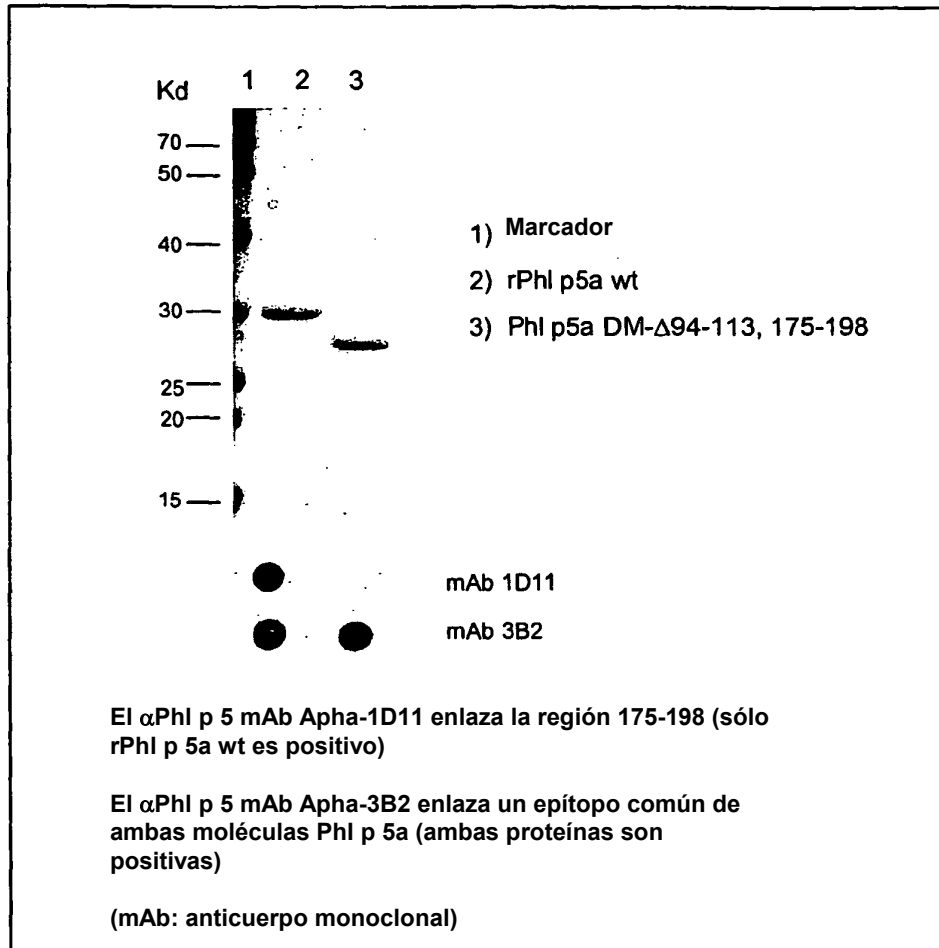
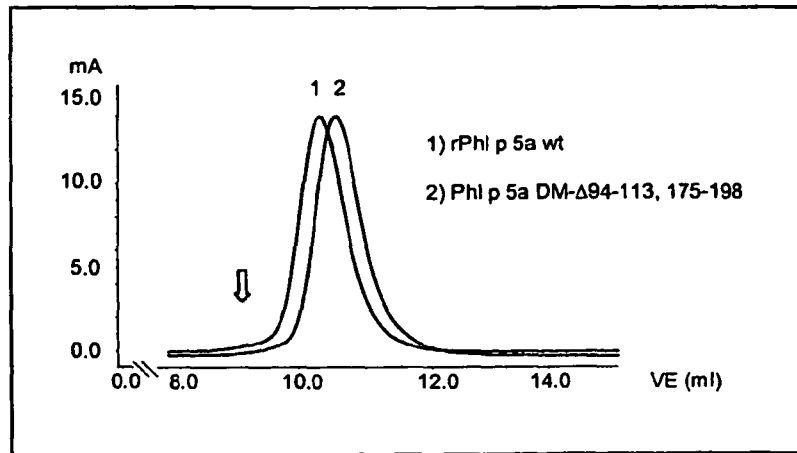


Figura 5

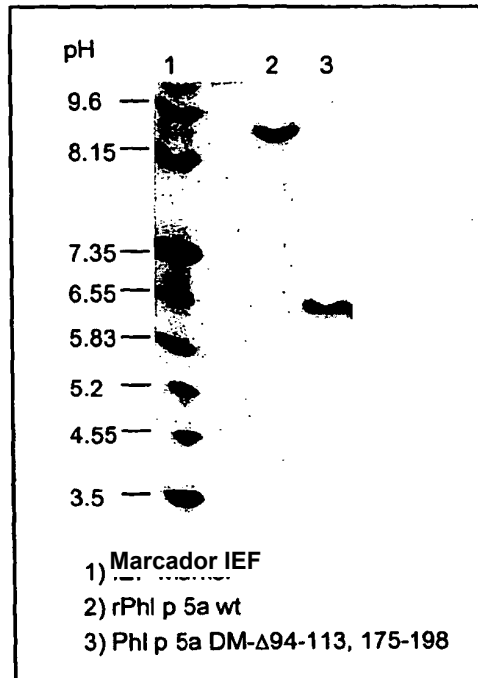
Cromatografía analítica SEC del mutante de delección Phl p 5a DM- Δ 94-113,175-198 y del tipo salvaje Phl p 5a recombinante (proteína no fusionada pura)



Columna: Superdex 75 HR10/30 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia)
Eluyente: PBS
Flecha: volumen de exclusión

Figura 6

Isoelectroenfoque no desnaturalizante del mutante de delección PhI p 5a DM- Δ 94-113,175-198 y del tipo salvaje PhI p 5a recombinante (proteína no fusionada pura)



pl rPhI p 5a wt = 8.7
pl rPhI p 5a DM- Δ 94-113, 175-198 = 6.4

Figura 7

Ensayo con tiras reactivas para comprobar la capacidad de enlace IgE de los mutantes de delección de Phl p 5a (no desnaturalizante)



IP: sueros de alérgicos al polen de gramíneas clínicamente definidos

Figura 8

Prueba de la reactividad IgE reducida de los mutantes de delección de Phl p 5a mediante un ensayo de inhibición EAST con dos sueros individuales representativos (a y b) y una mezcla de sueros (c)

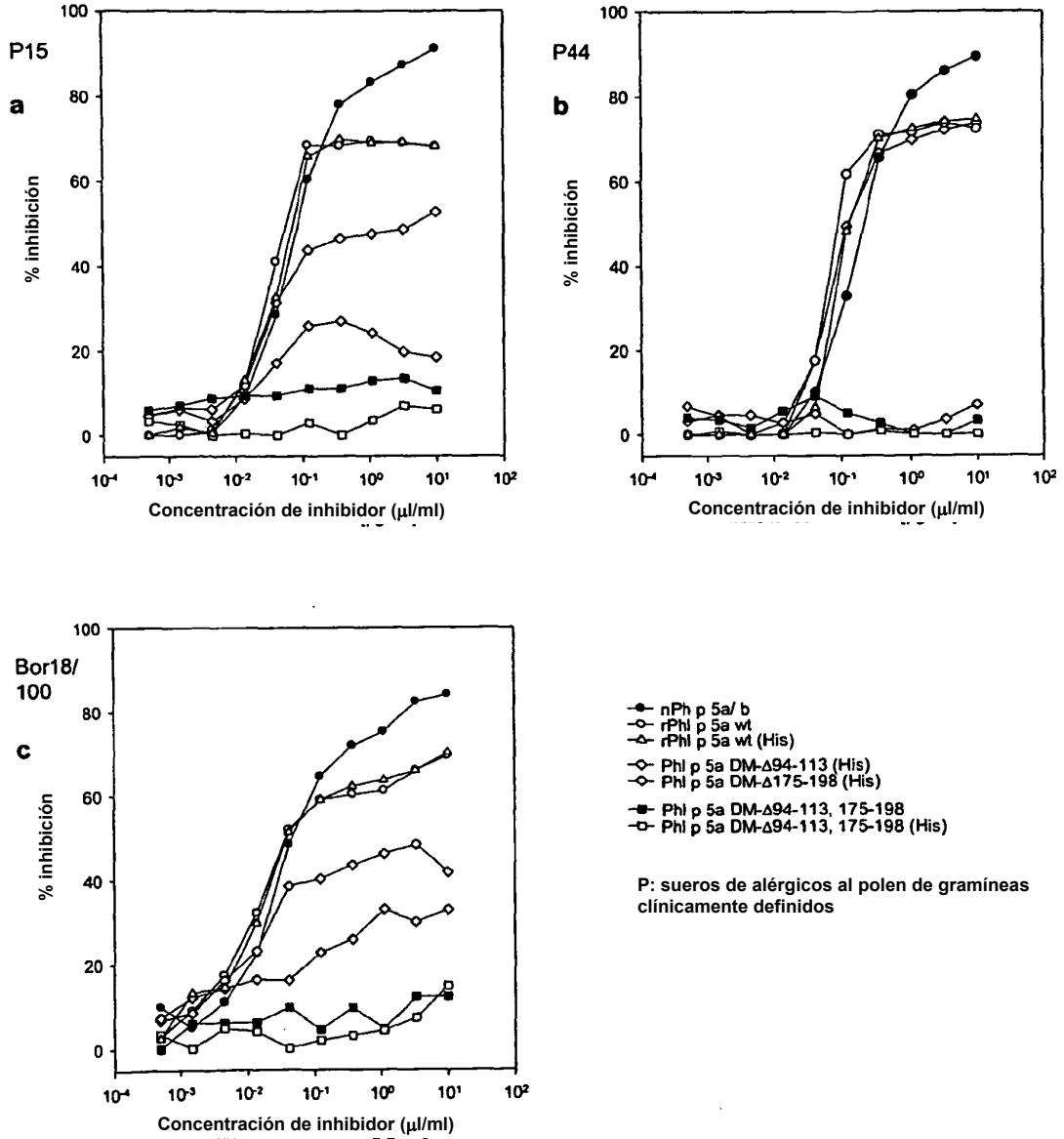


Figura 9

Prueba de la hipoalergenicidad del mutante de delección de Phl p 5a Phl p 5a DM-Δ94-113, 175-198 mediante un ensayo de activación de basófilos con basófilos de seis alérgicos al polen de gramíneas diferentes (P)

