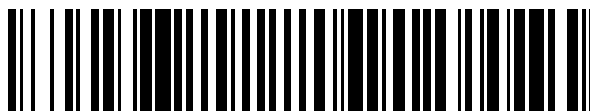


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 181**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2003 E 03793667 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1532169**

54 Título: **Variantes del alérgeno mayor PHI P 1 de hierba timotea**

30 Prioridad:

19.08.2002 EP 02018157

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

08.04.2013

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

**SUCK, ROLAND;
FIEBIG, HELMUT y
CROMWELL, OLIVER**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 400 181 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

Variantes del alérgeno mayor PHI P 1 de hierba timotea

5 La invención se refiere a variantes del alérgeno mayor Phl p 1 de hierba timotea caracterizadas porque se puede realizar una preparación hasta ahora no posible de moléculas monoméricas, solubles en medios fisiológicos y estables con ayuda de sistemas de expresión procariotas y su posterior purificación.

Antecedentes de la invención

10 Las alergias del tipo 1 tienen importancia en todo el mundo. Hasta el 25% de la población de los países industrializados sufre de dolencias, como rinitis alérgica, conjuntivitis o asma bronquial, provocadas por alérgenos que se encuentran en el aire (aeroalérgenos), que son liberados por diferentes fuentes, como polen vegetal, ácaros, gatos o perros. Hasta el 40% de estos alérgicos de tipo 1 muestran además reactividad IgE (inmunoglobulina E) específica con alérgenos del polen de gramíneas (Freidhoff y col., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78, 1190-201).

15 Las sustancias desencadenantes de las alergias de tipo 1 son proteínas, glicoproteínas o polipéptidos. En personas sensibilizadas, tras la absorción a través de las mucosas estos alérgenos reaccionan con las moléculas IgE que están unidas 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.

20 Dependiendo de la frecuencia relativa de alérgicos que presentan anticuerpos IgE contra determinados alérgenos, se diferencia entre alérgenos mayores y menores. En el caso de la hierba timotea (*Phleum pratense*), se han caracterizado hasta el momento 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), Phl p 6 (Petersen y col., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108, 49-54) y Phl p 2/3 (Dolecek y col., 1993) como alérgenos mayores y Phl p 4 (Löwenstein, 1978, Prog. Allergy 25, 1-62), así como los grupos 10 y 11 de *Lolium perenne* (Ansari y col., 1987, J. Allergy Clin. Immunol. 80, 229-235) como alérgenos menores.

25 Se ha clasificado el grupo 1 como uno de los grupos de alérgenos más relevantes de polen de gramíneas (Tamborini, E. y col., Eur. J. Biochem. 1997, 249:886-894), al cual pertenece Phl p 1 de hierba timotea. Los demás representantes del grupo 1 de otras gramíneas presentan homología parcial por encima del 95% con Phl p 1 (Petersen, A., y col., J. Allergy Clin. Immunol. 1995, 95: 987-994). A causa de la elevada homología, en la sensibilización con una gramínea también aparecen reacciones en los alérgenos de otras especies con reactividad cruzada. Por eso, estas moléculas tienen una gran importancia para las aproximaciones diagnósticas y terapéuticas.

30 Para el uso terapéutico de estos alérgenos se utiliza la reacción con células T auxiliares en las que se han reorientado las células TH2 patológicas a un tipo TH1. Con ello se consigue una modificación del perfil de citoquina de modo que se estimula la unión de células B con IgG en lugar de IgE.

35 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.

40 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).

45 Sería posible una optimización aún más amplia de la terapia con alérgenos preparados de forma recombinante. Cócteles definidos, dado el caso ajustados a pacientes individuales, 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 alergénicas.

Perspectivas realistas, que podrían conducir a una hiposensibilización segura con productos de expresión, ofrecen alérgenos recombinantes mutados dirigidos en los cuales se han eliminado de forma específica epítopos 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. Las primeras pruebas experimentales de la influencia alergenoespecífica de la respuesta inmune se obtuvieron en roedores mediante la inyección de ADN codificante de alérgeno (Hsu y col., 1996, Nature Medicine 2 (5), 540-544).

10 En el caso de Phl p 1, se trata de una proteína de 240 aminoácidos y un punto de glicosilación N. La proporción de glicosilación asciende a un 5% del peso molecular, el cual en el caso de la proteína natural asciende a aproximadamente 30-35 kDa (Petersen y col., Allergy Clin. Immunol. 1995, 95: 987-994; Suck y col., J. Immunol. Meth. 1999, 229:73-80).

Se conoce la secuencia de ácidos nucleicos de Phl p 1 (Laffer y col., J. Allergy Clin Immunol. 1994, 94: 689-698; Petersen y col., J. Allergy Clin. Immunol., 1995; 95: 987-94) y, por tanto, puede utilizarse para la preparación recombinante de la molécula.

15 No obstante, los anteriores intentos de preparación recombinante de la molécula en sistemas bacterianos o eucariotas, como p. ej. levaduras, de modo que se obtenga una forma monomérica estable no han tenido éxito a causa de su falta de solubilidad.

20 En el caso de la expresión bacteriana, Phl p 1 se deposita en forma de cuerpos de inclusión (inclusion bodies) (Vrtala y col., J. Allergy Clin. Immunol., 1996; 97: 781-7) y debe desnaturalizarse al principio antes de la purificación. A continuación, se extrae el medio desnaturalizante. Sin embargo, hasta ahora no se ha podido conseguir un repliegamiento completo de la proteína en la conformación soluble natural (Andersson, Lidholm, Int. Arch. Allergy Immunol. 2003;130:87-107).

Un posible motivo de impedimento para la formación de una conformación estable podría haber sido la ausencia de la glicosilación. Sin embargo, no se obtuvo ningún Ph p 1 estable ni en sistemas eucariotas, en los que es posible la glicosilación (K. Grobe, Tesis doctoral, 1998, Universidad de Hamburgo).

25 Por el contrario, como una causa de la nula solubilidad se supone una actividad proteolítica que conduce a la autodegradación de la molécula (Grobe y col., Eur. J. Biochem. 1999; 263: 33-40; Kirsten Gehlhar, Tesis doctoral, 1998, Universidad de Medicina de Lübeck, Alemania). Además, como causa de la agregación también entran en consideración interacciones hidrofóbicas entre las moléculas.

30 Por consiguiente, el objetivo en el que se basa la presente invención consiste en la preparación de variantes del alérgeno mayor Phl p 1 de hierba timotea que se caracterizan por una solubilidad mejorada con el mantenimiento de las características inmunológicas significativas desde un punto de vista terapéutico y diagnóstico y que pueden, por tanto, purificarse de una forma farmacéuticamente apropiada.

Figuras

35 Figura 1: SDS-PAGE de nPhl p 1 (n=natural) de tipo salvaje, así como de las variantes de plegamiento LM y HM de las variantes de alérgeno rPhl p 1-A236C (r = recombinante) en condiciones reductoras (en presencia de ditioneitol DTT) y no reductoras (sin DTT).

Trayectoria 1: Patrones de peso molecular (10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160, 220 kDa, Bench Mark Protein Ladder, Invitrogen, Karlsruhe, Alemania)

Trayectoria 2: Extracto de polen de *Phleum pratense*

40 Trayectoria 3: nPhl p 1

Trayectoria 4: rPhl p 1-LM

Trayectoria 5: rPhl p 1-HM

Figura 2: Filtración en gel con rPhl p 1-HM y rPhl p 1-LM en una columna Sephacryl S100.

La figura muestra que ambas variantes de plegamiento presentan distintos pesos moleculares aparentes.

Figura 3: Enzym-Allergo-Sorbent-Test (EAST) para la cuantificación de la unión a IgE de las variantes de plegamiento rPhl p 1-A236C -LM y -HM

5 En el eje horizontal se indica la concentración de un inhibidor de la unión entre IgE y nPhl p 1 en mol/l, en el eje vertical se indica el grado de la inhibición en [%]. La medida se realizó con nPhl p 1 en la fase sólida y un suero típico de un alérgico al polen de gramíneas.

Descripción detallada de la invención

10 Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que la introducción de un resto cisteína adicional, preferentemente en la parte carboxi-terminal (en especial a partir de la posición de aminoácido 140, muy preferiblemente entre las posiciones de aminoácido 230 y 240) de la molécula provoca una solubilidad mejorada según la invención con una actividad frente a IgE y reactividad frente a células T no modificadas.

La invención, por tanto, se refiere a variantes del alérgeno mayor de Phl p 1 de hierba timotea que presentan, respecto al tipo salvaje, un resto Cys adicional en una posición de aminoácido superior a la posición 140.

15 Además, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de las variantes según la invención del alérgeno mayor recombinante rPhl p 1 caracterizado porque se introduce en el gen Phl p 1 según métodos ya conocidos mediante inserción o intercambio un triplete de bases que codifica para un resto Cys, el gen así modificado se sobreexpresa en un organismo huésped y la variante de alérgeno obtenida mediante sobreexpresión se purifica.

20 La preparación recombinante procariota y la purificación pueden llevarse a cabo con o sin una parte de fusión introducida por ingeniería genética y produce siempre los mismos productos. Si se emplea una parte de fusión, se trata preferentemente de una etiqueta His. Los procedimientos de purificación varían en función del vector o sistema de expresión.

25 Asimismo, la presente invención comprende una secuencia primaria modificada selectivamente del alérgeno recombinante rPhl p 1 que posibilita su preparación recombinante en sistemas de expresión bacterianos u otros y la posterior purificación.

Por tanto, también son objeto de la invención moléculas de ADN que codifican para las variantes de alérgeno según la invención.

30 Las proteínas recombinantes son autoproteolíticamente inactivas y, por tanto, pueden almacenarse en forma monomérica estable en soluciones fisiológicas, tamponadas o, según la aplicación, en otras soluciones. La estimulación de células T no muestra diferencias significativas entre Phl p 1 recombinante y natural.

Por tanto, las variantes de alérgeno recombinantes y los fragmentos o variantes derivados pueden emplearse para la terapia de enfermedades alérgicas inducidas por polen de gramíneas.

A causa de esta idoneidad farmacéutica, la presente invención se refiere a las nuevas variantes de alérgeno también en su calidad de medicamento.

35 Asimismo, las variantes de alérgeno y los fragmentos preparados de forma recombinante se pueden emplear en el diagnóstico de alergias al polen.

40 En la preparación del alérgeno mayor Phl p 1 de hierba timotea modificado por ingeniería genética, el intercambio de aminoácidos se consigue mediante intercambio de nucleótidos dirigido, por ejemplo mediante PCR. En una forma de realización especialmente preferida, en el mutante rPhl p 1-A236C según SEC ID N° 2 la alanina de la posición 236 se intercambia por cisteína. No obstante, el punto de intercambio puede también encontrarse en otro punto cualquiera de la molécula. Normalmente, sin embargo, se localiza en la parte C-terminal de la molécula, preferentemente a partir de la posición 140, en particular entre las posiciones 230 y 240.

Como consecuencia del intercambio se elimina al mismo tiempo la actividad proteolítica conocida para Phl p 1.

Como otro efecto inesperado, en el aislamiento y la purificación de la molécula según la invención aparecen dos variantes de plegamiento que pueden separarse completamente entre ellas.

5 Mientras que una variante de conformación, denominada rPhl p 1-LM (LM = bajo peso molecular, por sus siglas en inglés), a causa de su comportamiento de elución similar o idéntico en el SDS-PAGE no reductor (Fig. 1) y la filtración en gel (p. ej., en Sepharcyl S-100, cf. Fig. 2) se comporta de forma muy similar a la proteína natural, la segunda variante, denominada rPhl p 1-HM (HM = elevado peso molecular, por sus siglas en inglés) presenta otra forma de plegamiento. También la reactividad IgE es distinta. Mientras que rPhl p 1-LM presenta una reactividad comparable a la de la proteína natural, rPhl p 1-HM no se une tan bien a anticuerpos IgE y es adecuada en determinada cantidad para la inmunoterapia específica debido a su hipoalergenidad.

10 Sin embargo, en principio ambas formas de plegamiento son adecuadas tanto para aplicaciones terapéuticas como diagnósticas.

Por consiguiente, además, son objeto de la invención formas de plegamiento distintas de la variante de alérgeno rPhl p 1 según la invención y su uso para fines terapéuticos y diagnósticos.

15 Ambas variantes de plegamiento son monómeros estables fácilmente solubles y no tienen una actividad proteolítica/autoproteolítica demostrable.

Las variantes de alérgeno según la invención pueden obtenerse, por ejemplo, tras los dos procedimientos de preparación que se esbozan a continuación, con o sin parte de fusión artificial:

1) Expresión con parte de fusión artificial (etiqueta His)

20 En caso de emplear una etiqueta His, la purificación de la proteína cruda al principio insoluble se lleva a cabo mediante varias etapas de separación bioquímica que comprenden una o varias etapas de cromatografía de afinidad con quelato de ión metálico y la disociación de la etiqueta His. Para la purificación previa y posterior pueden entrar en acción otras cromatografías distintas, así como etapas de desnaturalización y renaturalización.

Preparación de la forma de plegamiento rPhl p 1-LM:

- desnaturalización de los cuerpos de inclusión aislados del organismo huésped con cloruro de guanidinio,
- 25 - renaturalización de la proteína disuelta en una cromatografía en columna de afinidad con quelato,
- disociación de la etiqueta His,
- primera filtración en gel,
- cromatografía de afinidad con quelato,
- aislamiento de la proteína objetivo en el flujo, segunda y última filtración en gel.

30 La otra forma de plegamiento - rPhl p 1-HM – puede obtenerse mediante la realización de las siguientes etapas del procedimiento en el caso de esta variante de purificación:

- desnaturalización de los cuerpos de inclusión aislados del organismo huésped con cloruro de guanidinio,
- renaturalización de la proteína disuelta en una cromatografía en columna de afinidad con quelato,
- disociación de la etiqueta His,
- 35 - primera filtración en gel,
- cromatografía de afinidad con quelato,
- elución de la proteína objetivo con un gradiente de imidazol,

- segunda y última filtración en gel.

2) Expresión sin parte de fusión (sin etiqueta His)

- Desnaturalización de los cuerpos de inclusión aislados del organismo huésped con cloruro de guanidinio en la que, como se describe más abajo, se obtiene una u otra forma de plegamiento en función del tiempo de desnaturalización.

- Renaturalización de la proteína disuelta mediante dilución en una solución tampón, en la que se emplea preferentemente Tris/HCl 20-50 mM pH 7-8 , aunque también son posibles otros tampones y valores de pH (p. ej., 7-10,5). Para la dilución, se añade preferentemente la mezcla desnaturalizante a un múltiplo de su volumen (por ejemplo, aproximadamente 10 a 80 veces, preferentemente de 20 a 60 veces) de la solución tampón preferentemente agitada o entremezclada de otro modo –por ejemplo mediante decantación, uso de pipetas o de bombas- dado el caso; no obstante, la solución tampón también puede añadirse a la mezcla desnaturalizante. La velocidad de la adición no es crítica: así que la cantidad total puede añadirse de golpe en pocos segundos o (preferentemente aunque no obligatoriamente) distribuida uniformemente a lo largo de varias horas.

- Concentración y purificación de la proteína renaturalizada mediante cromatografía de afinidad con quelato y a continuación elución con un gradiente de imidazol (se utiliza preferentemente un gradiente por etapas, aunque es igualmente posible un gradiente continuo). Alternativamente o adicionalmente a la cromatografía de afinidad con quelato, opcionalmente también puede realizarse una cromatografía de interacción hidrofóbica y/o una cromatografía de intercambio aniónico (las moléculas deben tratarse completamente cromatográficamente).

- Filtración en gel final.

Las formas de plegamiento alternativas estables LM y HM pueden obtenerse así de modo selectivo con una contaminación cruzada mínima mediante distintos tiempos de incubación en la etapa de desnaturalización. Para su preparación la forma LM puede incubarse en principio entre aproximadamente 1 y 50 horas. Sin embargo, normalmente oscila en un intervalo de entre 10 y 40 horas, preferentemente de 15 a 30, en el que un intervalo de 18 a 22 horas es especialmente preferido.

Para la variante HM se necesitan tiempos de incubación claramente más prolongados. Se encuentran en el orden de magnitud de 60 a 120 horas. Habitualmente, no obstante, se incuba entre 70 y 100 horas, en especial se prefiere moverse en un intervalo de 80 a 90 horas.

En cualquier caso, a la etapa de desnaturalización sigue la etapa de dilución anteriormente descrita con solución tampón.

El intervalo intermedio (aprox. de 50 a 60 horas) representa la fase de transformación. Mediante la etapa de dilución, el proceso de plegamiento aparentemente se fija, sin tener lugar ninguna otra cinética.

La purificación para la separación de LM y HM es posible mediante una cromatografía de interacción hidrofóbica o se consigue mediante filtración en gel, en la cual las formas tienen unos tiempos de retención claramente distintos.

Las variantes de alérgeno según la invención pueden obtenerse con una pureza elevada en sus variantes de plegamiento LM y HM y tienen valiosas propiedades farmacéuticas relevantes. De este modo pueden emplearse en forma de mezcla y también por separado en el diagnóstico (en particular rPhl p 1–LM debido al mantenimiento de la actividad IgE) y la terapia (en particular rPhl p 1–HM debido a la actividad IgE reducida) de enfermedades alérgicas.

Por consiguiente, la invención se refiere igualmente al uso de las variantes de alérgeno y/o sus derivados farmacéuticamente aplicables, incluidas sus mezclas en todas proporciones, para la preparación de un medicamento para la inmunoterapia específica (hiposensibilización), así como para el diagnóstico de alergias en cuya activación participa el alérgeno mayor Phl p 1 de hierba timotea.

Además, es objeto de la invención una preparación farmacéutica que contenga una variante de alérgeno según la invención y/o sus derivados farmacéuticamente aplicables, incluidas sus mezclas en todas proporciones, así como, dado el caso, excipientes y/o coadyuvantes. Así, los principios activos según la invención pueden mezclarse con al menos un excipiente o coadyuvante sólido, líquido y/o semilíquido y, dado el caso, combinarse con uno o varios principios activos diferentes en una forma de dosificación adecuada.

Si las moléculas de ADN en las que se basan las variantes de alérgeno según la invención se ligan con un vector de expresión adecuado, estas estructuras pueden emplearse además como preparados para una inmunoterapia (vacunación con ADN).

- 5 Por consiguiente, es igualmente objeto de la invención un vector de expresión de ADN recombinante, que contenga una molécula de ADN según la invención, para el tratamiento de alergias en cuya activación participa el alérgeno mayor Phl p 1 de hierba timotea mediante vacunación inmunoterapéutica con ADN.

Asimismo, es objeto de la invención el uso de dicho vector de expresión y/o sus derivados, incluidas sus mezclas en todas proporciones, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de alergias en cuya activación participa el alérgeno mayor Phl p 1 de hierba timotea mediante vacunación inmunoterapéutica con ADN.

- 10 Por último, es objeto de la invención una preparación farmacéutica que contenga dicho vector de expresión y/o sus derivados farmacéuticamente aplicables, incluidas sus mezclas en todas proporciones, así como, dado el caso, excipientes y/o coadyuvantes, para el tratamiento de alergias en cuya activación participa el alérgeno mayor Phl p 1 de hierba timotea mediante vacunación inmunoterapéutica con ADN.

- 15 En el sentido de esta invención, estas preparaciones farmacéuticas pueden utilizarse como agentes terapéuticos en medicina humana o veterinaria. Se tienen en consideración como excipientes sustancias orgánicas o inorgánicas que son apropiadas para la aplicación parenteral y que no reaccionan con las variantes de alérgeno del alérgeno mayor Phl p 1 de hierba timotea según la invención. Para la aplicación parenteral se emplean en particular soluciones, preferiblemente soluciones oleosas o acuosas, otras suspensiones, emulsiones o implantes. Las variantes de alérgeno según la invención también pueden someterse a liofilización y el producto liofilizado obtenido
20 puede emplearse, por ejemplo, para la elaboración de preparaciones inyectables. Las preparaciones mencionadas pueden esterilizarse y/o contener coadyuvantes, como lubricantes, conservantes, estabilizadores 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 de alérgeno según la invención se pueden obtener preparados de depósito, por ejemplo mediante adsorción en hidróxido de aluminio.

- 25 De por sí, en las mutaciones según la invención también son posibles otras modificaciones puntuales en otras posiciones, así como otras modificaciones, por ejemplo para aumentar la hipoalergenicidad. Estas modificaciones pueden tratarse, por ejemplo, de modificaciones químicas del extracto de alérgeno (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7), 377-382). Aunque también se pueden realizar por ingeniería genética a nivel de ADN, entrando en consideración p. ej. inserciones, deleciones e intercambios de aminoácidos, roturas de la proteína en fragmentos, así como fusiones
30 de la proteína o sus fragmentos con otras proteínas o péptidos.

En vista a la elevada homología de secuencia dentro de los alérgenos mayores del polen de gramíneas del grupo 1, se esperan todos los efectos aquí descritos para Phl p 1 referidos a la mejora de la solubilidad mediante la introducción de un resto cisteína y la aparición de variantes de plegamiento también para otros representantes de este grupo.

- 35 Por eso, incluso sin otras explicaciones, se asume que un especialista puede utilizar la descripción anterior en el alcance más amplio. Por eso, las formas de realización descritas a continuación a modo de ejemplo para la variante rPhl p 1-A236C según las tablas 1 y 2 deben interpretarse solamente como una publicación descriptiva, en ningún caso limitante de cualquiera de las maneras.

- 40 Todos los materiales de cromatografía son distribuidos comercialmente por la empresa Amersham Biosciences (Freiburg, Alemania).

En las cromatografías de afinidad con quelato descritas, la elección del ión metálico no es crítica, puede emplearse tanto Ni como Cu.

Ejemplo 1: Obtención de rPhl p 1-A236C-LM y -HM

- Variante de purificación con etiqueta His

- 45 La secuencia codificante para Phl p 1 se amplificó con oligonucleótidos específicos 5' y 3' mediante PCR y se ligó a un vector pProEx (GIBCO, La Jolla, EE.UU.) sobre los sitios de corte Ehe I y Hind III. El cebador 3' se modificó en la posición de bases 706/707 de GC a TG de modo que a partir de un triplete que codifica para alanina se origina uno

que codifica para cisteína. La transformación se realizó en *E. coli* Origami. El vector de partida escogido pProEx proporciona la secuencia 6xHis localizada en el extremo N-terminal, seguida de una secuencia de reconocimiento para la proteasa TEV.

5 Las moléculas rPhl p 1-A236C etiquetadas con 6xHIS primarias recombinantes que tras la expresión bacteriana están presentes como agregados insolubles, se disuelven tras pre-purificación con cloruro de guanidinio (GdmCl) 6M, Tris/HCl 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8,0. Sigue una cromatografía de afinidad quelato de Ni en dos etapas:

10 En una primera etapa, las proteínas enlazadas a sefarosa quelante bajo condiciones desnaturalizantes se transfieren mediante un gradiente durante 90 min desde la solución desnaturalizante a un tampón consistente en tampón fosfato 50 mM y NaCl 500 mM (pH 7,4). Sigue una elución por etapas con imidazol 500 mM en tampón fosfato. La proteína de fusión renaturalizada se disocia mediante una proteasa específica TEV en rPhl p 1 y la parte de fusión 6xHis.

Para la preparación de una segunda cromatografía de afinidad, se lleva a cabo una filtración en gel con Sephadex G-25 y tampón fosfato como medio de elución, mediante la cual se elimina el imidazol.

15 La mezcla de proteínas con el tampón intercambiado se introduce ahora en una segunda cromatografía de afinidad con quelato de Ni. Así se obtiene una parte del rPhl p 1 disociada satisfactoriamente en el flujo. Se trata en este caso de la forma LM de la molécula. En la columna se queda enlazada, junto con las moléculas no disociadas, la variante de conformación HM, aparentemente debido a los restos histidina expuestos. Estas variantes disociadas se eluyen en un gradiente de imidazol antes que las proteínas de fusión no disociadas, con lo cual también se puede obtener esta forma con una elevada pureza. En una última etapa, se lleva a cabo una filtración en gel con Superdex 20 75 para la purificación final y la transferencia a un disolvente deseado.

Tab. 1 Resumen de los procedimientos de preparación y purificación según la invención con el uso de una etiqueta His

1. Expresión	
2. Aislamiento de los cuerpos de inclusión	
25 3. Desnaturalización	
4. Cromatografía de afinidad 1 con quelato de Ni (renaturalización)	
5. Disociación de la etiqueta His	
6. Filtración en gel (Sephadex G-25)	
30 7. Cromatografía de afinidad 2 con quelato de Ni:	Flujo: rPhl p 1-LM Eluato: rPhl p 1-HM, Proteína de fusión His-rPhl p 1 no disociada
8. Filtración en gel (Superdex 75)	

Ejemplo 2: Obtención de rPhl p 1-A236C-LM y -HM

- Variante de purificación sin etiqueta His

35 En primer lugar se procede según el ejemplo 1, donde, no obstante, el vector escogido no produce ninguna proteína de fusión como producto principal.

Ahora las moléculas rPhl p 1-A236C primarias recombinantes que tras la expresión bacteriana están presentes como agregados insolubles, se disuelven tras la pre-purificación con cloruro de guanidinio (GdmCl) 6M, Tris/HCl 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8,0. Sigue una dilución de 40 veces en Tris 20 mM pH 8,0. Para ello se decanta la solución 40 desnaturalizante en la solución diluyente agitada con un agitador magnético.

a) Preparación de la forma LM

Los cuerpos de inclusión se incuban 20 h en la solución desnaturalizante y a continuación se diluyen como se ha descrito arriba.

b) Preparación de la forma HM

5 Los cuerpos de inclusión se incuban 85 h en la solución desnaturalizante y a continuación se diluyen como se ha descrito arriba.

A la correspondiente mezcla de dilución (renaturalización) se añade NaCl 500 mM. Las moléculas disueltas en la mezcla renaturalizante se concentran mediante una cromatografía de afinidad con quelato de Cu y se eluyen con imidazol 200 mM en tampón fosfato en una etapa (o gradualmente mediante imidazol 500 mM en tampón fosfato).

10 Opcionalmente, la cromatografía de afinidad con quelato puede emplearse antes de la elución de la proteína para el condicionamiento de modo que, por ejemplo, se emplee una solución de NaCl 3 M para lavar y una solución de imidazol 200 mM y NaCl 3 M para eluir. Entonces, el eluato con elevado contenido en sales puede emplearse directamente en una cromatografía de interacción hidrofóbica.

En una última etapa, se lleva a cabo una filtración en gel con Superdex 75 para la purificación final y la transferencia a un disolvente deseado.

15 **Tab. 2** Resumen de los procedimientos de preparación y purificación según la invención sin el uso de una etiqueta His

1. Expresión	
2. Aislamiento de los cuerpos de inclusión	
3. Desnaturalización	Duración 20 h: LM Duración 85 h: HM
4. Dilución	
5. Cromatografía de afinidad con quelato de Cu	
6. Filtración en gel (Superdex 75)	

25 **Ejemplo 2: Uniones a IgE distintas del tipo salvaje así como de las variantes de plegamiento LM y HM de la variante de alérgeno rPhl p 1-A236C**

30 En un ensayo de inhibición EAST realizado según Suck y col. (Int. Arch. Allergy Immunol. 2000; 121: 284-291) con una mezcla de suero de alérgicos se comparan entre sí nPhl p 1 natural y las variantes HM y LM de rPhl p 1 recombinantes en relación a la intensidad de su unión a IgE (Fig. 3). Se muestra que la variante HM presenta una unión a IgE claramente reducida respecto a la proteína Phl p 1 natural, mientras que la variante LM presenta una unión a IgE comparable a la proteína Phl p 1 natural.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Merck Patent GmbH

<120> Variantes del alérgeno mayor Phl p 1 de hierba timotea

<130> P 02/129

<140> EP 02 018 157.4

<141> 2002-08-19

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 723

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(720)

<223>

<400> 1

atc ccc aag gtt ccc ccc ggc ccg aac atc acg gcg acc tac ggc ggc 48
Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Gly
1 5 10 15

aag tgg ctg gac gcg aag agc acc tgg tac ggc aag ccg acg gcc gcc 96
Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Ala Ala
20 25 30

ggt ccc aag gac aac ggc ggc gcg tgc ggg tac aag gac gtg gac aag 144
Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
35 40 45

ccc ccg ttc agc ggc atg acc ggc tgc ggc aac acc ccc atc ttc aag 192
Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
50 55 60

tcc ggc ccg ggc tgc ggc tcc tgc ttc gag atc aag tgc acc aag ccc 240

ES 2 400 181 T3

Ser 65	Gly	Arg	Gly	Cys	Gly 70	Ser	Cys	Phe	Glu	Ile 75	Lys	Cys	Thr	Lys	Pro 80	
gag Glu	gcc Ala	tgc Cys	tcc Ser	ggc Gly 85	gag Glu	ccc Pro	gtg Val	gtg Val	gtc Val 90	cac His	atc Ile	acc Thr	gac Asp	gac Asp 95	aac Asn	288
gag Glu	gag Glu	ccc Pro	atc Ile 100	gcc Ala	gcg Ala	tac Tyr	cac His	ttc Phe 105	gac Asp	ctc Leu	tcc Ser	ggc Gly	atc Ile 110	gcg Ala	ttc Phe	336
ggg Gly	tcc Ser	atg Met 115	gcc Ala	aag Lys	aag Lys	ggc Gly	gac Asp 120	gag Glu	cag Gln	aag Lys	ctg Leu	cgc Arg 125	agc Ser	gcc Ala	ggc Gly	384
gag Glu	gtg Val 130	gag Glu	atc Ile	cag Gln	ttc Phe	cgc Arg 135	cgc Arg	gtc Val	aag Lys	tgc Cys	aag Lys 140	tac Tyr	ccg Pro	gag Glu	ggc Gly	432
acc Thr 145	aag Lys	gtg Val	acc Thr	ttc Phe	cac His 150	gtg Val	gag Glu	aag Lys	ggg Gly	tcc Ser 155	aac Asn	ccc Pro	aac Asn	tac Tyr	ctg Leu 160	480
gcg Ala	ctg Leu	ctg Leu	gtg Val	aag Lys 165	ttt Phe	gtc Val	gcc Ala	ggc Gly	gac Asp 170	ggc Gly	gac Asp	gtg Val	gtg Val	gcg Ala 175	gtg Val	528
gac Asp	atc Ile	aag Lys	gag Glu 180	aag Lys	ggc Gly	aag Lys	gac Asp	aag Lys 185	tgg Trp	atc Ile	gcg Ala	ctc Leu	aag Lys 190	gag Glu	tgc Ser	576
tgg Trp	gga Gly	gcc Ala 195	atc Ile	tgg Trp	agg Arg	atc Ile	gac Asp 200	acc Thr	ccg Pro	gag Glu	gtg Val	ctc Leu 205	aag Lys	ggc Gly	ccc Pro	624
ttc Phe 210	acc Thr	gtc Val	cgc Arg	tac Tyr	acc Thr 215	acc Thr	gag Glu	ggc Gly	ggc Gly	acc Thr 220	aag Lys	ggc Gly	gag Glu	gcc Ala	aag Lys	672
gac Asp 225	gtc Val	atc Ile	ccc Pro	gag Glu	ggc Gly 230	tgg Trp	aag Lys	gcc Ala	gac Asp 235	acc Thr 235	tgc Cys	tac Tyr	gag Glu	tcc Ser	aag Lys 240	720
tga																723
<210>	2															-
<211>	240															
<212>	PRT															
<213>	Phleum pratense															
<400>	2															
Ile 1	Pro	Lys	Val	Pro 5	Pro	Gly	Pro	Asn	Ile 10	Thr	Ala	Thr	Tyr	Gly 15	Gly	
Lys	Trp	Leu	Asp 20	Ala	Lys	Ser	Thr 25	Trp	Tyr	Gly	Lys	Pro	Thr 30	Ala	Ala	
Gly	Pro	Lys 35	Asp	Asn	Gly	Gly	Ala 40	Cys	Gly	Tyr	Lys	Asp 45	Val	Asp	Lys	

ES 2 400 181 T3

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
 50 55 60
 ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
 65 70 75 80
 Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
 85 90 95
 Glu Glu Pro Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Ile Ala Phe
 100 105 110
 Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
 115 120 125
 Glu Val Glu Ile Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly
 130 135 140
 Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
 145 150 155 160
 Ala Leu Leu Val Lys Phe Val Ala Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
 165 170 175
 Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Ala Leu Lys Glu Ser
 180 185 190
 Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Glu Val Leu Lys Gly Pro
 195 200 205
 Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Gly Glu Ala Lys
 210 215 220
 Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Cys Tyr Glu Ser Lys
 225 230 235 240

REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante del alérgeno mayor PhI p 1 de hierba timotea caracterizada porque presenta un resto Cys adicional respecto al tipo salvaje en una posición de aminoácido superior a 140, caracterizada porque el tipo salvaje presenta una secuencia de aminoácidos que corresponde a SEC ID N° 2, en la que esta secuencia de aminoácidos del tipo salvaje es, no obstante, distinta a la secuencia de aminoácidos según SEC ID N° 2 en la que presenta un resto Ala en la posición de aminoácido 236.
2. Variante de alérgeno según la reivindicación 1, caracterizada porque se encuentra un resto Cys adicional entre las posiciones de aminoácido 230 y 240.
- 10 3. Variante de alérgeno según la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque el resto Cys adicional procede de un intercambio de aminoácido.
4. Variante de alérgeno rPhI p 1-A236C según SEC ID N° 2 según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 3 caracterizada porque el resto Cys adicional se ha introducido mediante el intercambio de Ala 236.
- 15 5. Molécula de ADN que codifica para una variante de alérgeno según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 4.
6. Molécula de ADN según SEC ID N° 1 que codifica para la variante de alérgeno según la reivindicación 4.
7. Procedimiento para la preparación de una variante del alérgeno mayor rPhI p 1 según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 4 caracterizado porque según los métodos ya conocidos
 - 20 - se introduce en el gen correspondiente un triplete de bases mediante inserción o intercambio que codifica para un resto Cys,
 - el gen así modificado se sobreexpresa en un organismo huésped y
 - se purifica la variante de alérgeno obtenida mediante sobreexpresión.
8. Procedimiento para la preparación y purificación de una variante del alérgeno mayor recombinante rPhI p 1 según la reivindicación 7 en forma soluble, caracterizado porque al inicio la proteína cruda insoluble se desnaturaliza, a continuación se renaturaliza mediante dilución y se purifica mediante etapas de purificación bioquímicas.
- 25 9. Procedimiento para la purificación de una variante del alérgeno mayor recombinante rPhI p 1 según la reivindicación 7 en forma soluble, caracterizado porque partiendo de la proteína inicialmente insoluble sobreexpresada provista de una etiqueta His con fines de purificación se realizan varias etapas de purificación bioquímica que incluyen una cromatografía de afinidad con quelato de iones metálicos en dos etapas y la disociación de la etiqueta His.
- 30 10. Variante de alérgeno según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizada porque se presenta en distintas formas de plegamiento.
- 35 11. Forma de plegamiento rPhI p 1 -LM de la variante de alérgeno según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 4 que se obtiene mediante la realización de las siguientes etapas del procedimiento:
 - Sobreexpresión de la variante de alérgeno rPhI p 1 provista de una etiqueta His en un organismo huésped
 - Desnaturalización de los cuerpos de inclusión aislados del organismo huésped con cloruro de guanidinio
 - Renaturalización de la proteína disuelta en una columna cromatográfica de afinidad con quelato
 - Disociación de la etiqueta His

- Filtración en gel
 - Nueva cromatografía de afinidad con quelato
 - Aislamiento de la proteína objetivo del flujo
 - Filtración en gel
- 5 **12.** Forma de plegamiento rPhI p 1 -HM de la variante de alérgeno según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 4 que se obtiene mediante la realización de las siguientes etapas del procedimiento:
- Sobreexpresión de la variante de alérgeno rPhI p 1 provista de una etiqueta His en un organismo huésped
 - Desnaturalización de los cuerpos de inclusión aislados del organismo huésped con cloruro de guanidinio
 - Renaturalización de la proteína disuelta en una columna cromatográfica de afinidad con quelato
- 10 - Disociación de la etiqueta His
- Filtración en gel
 - Nueva cromatografía de afinidad con quelato
 - Elución de la proteína objetivo con un gradiente de imidazol
 - Filtración en gel
- 15 **13.** Variante de alérgeno según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 4 y de la 10 a la 12 como medicamento.
14. **14.** Uso de una variante de alérgeno según la reivindicación 13 y/o sus derivados farmacéuticamente aplicables, incluidas sus mezclas en todas proporciones, para la preparación de un medicamento para la inmunoterapia específica de alergias en cuya activación participa el alérgeno mayor PhI p 1 de hierba timotea.
- 20 **15.** Preparación farmacéutica que contenga una variante de alérgeno según la reivindicación 13 y/o sus derivados farmacéuticamente aplicables, incluidas sus mezclas en todas proporciones, así como, dado el caso, excipientes y/o coadyuvantes.
16. **16.** Uso de una variante de alérgeno según una o varias de las reivindicaciones de la 1 a la 4 y de la 10 a la 12 y/o sus derivados, incluidas sus mezclas en todas proporciones, para el diagnóstico *in vitro* de alergias en cuya activación participa el alérgeno mayor PhI p 1 de hierba timotea.
- 25 **17.** Vector de expresión de ADN recombinante que contiene una molécula de ADN según la reivindicación 7 o 8 para el tratamiento de alergias en cuya activación participa el alérgeno mayor PhI p 1 de hierba timotea mediante la vacunación inmunoterapéutica con ADN.
18. **18.** Uso del vector de expresión según la reivindicación 17 y/o sus derivados, incluidas sus mezclas en todas proporciones, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de alergias en cuya activación participa el alérgeno mayor PhI p 1 de hierba timotea mediante vacunación inmunoterapéutica con ADN.
- 30 **19.** Preparación farmacéutica que contiene un vector de expresión según la reivindicación 17 y/o sus derivados farmacéuticamente aplicables, incluidas sus mezclas en todas proporciones, así como, dado el caso, excipientes y/o coadyuvantes, para el tratamiento de alergias en cuya activación participa el alérgeno mayor PhI p 1 de hierba timotea mediante vacunación inmunoterapéutica con ADN
- 35

Figura 1:

SDS-PAGE de nPhl p 1, rPhl p 1-LM y rPhl p 1-HM

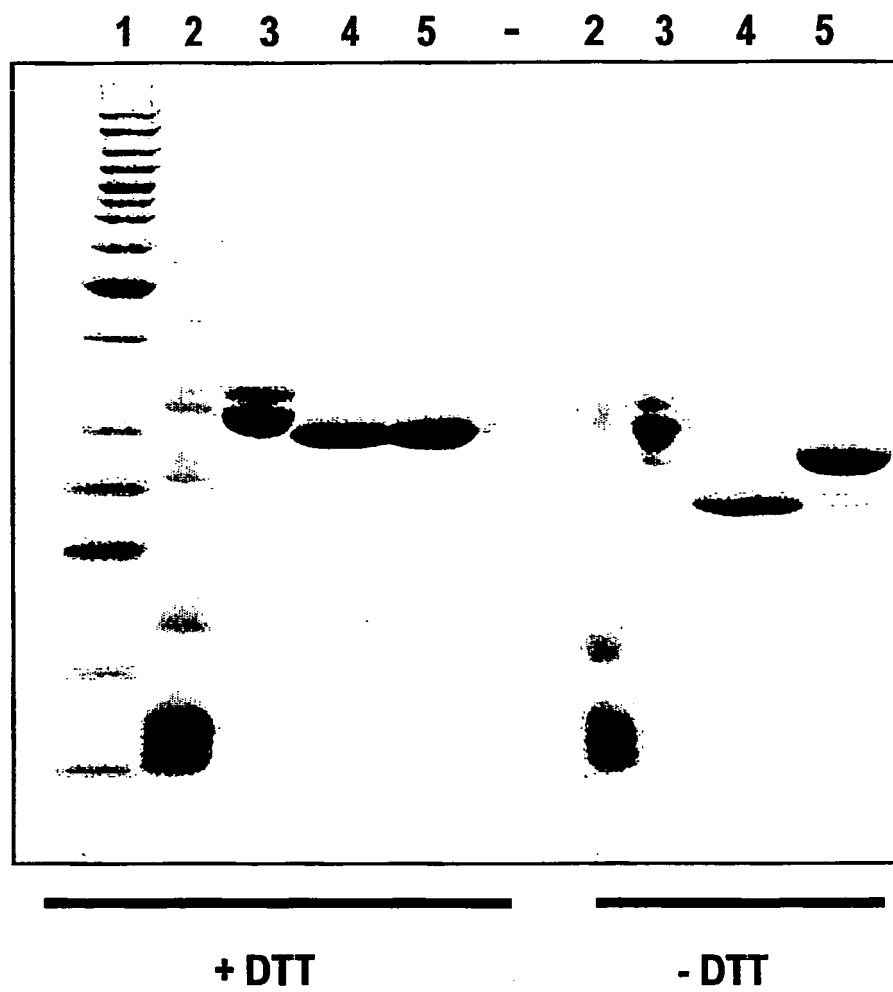
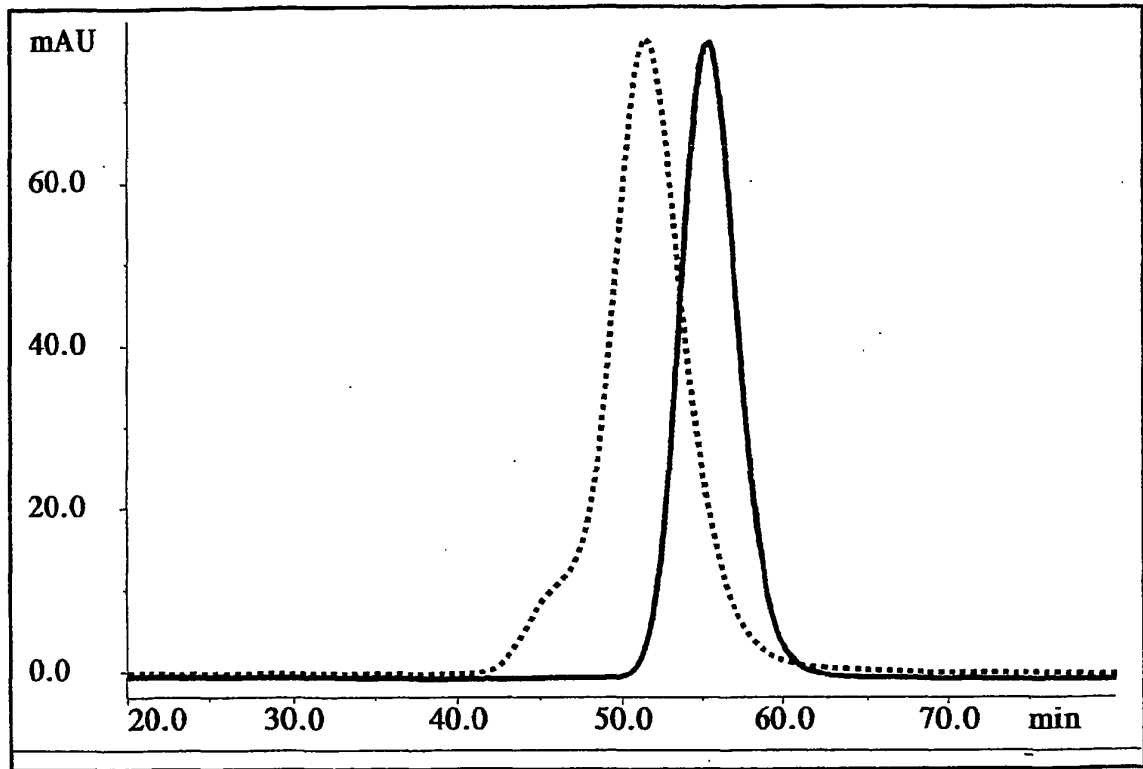


Figura 2: Filtración en gel de rPhl p 1-HM y rPhl p 1-LM



.....rPhl p 1-HM

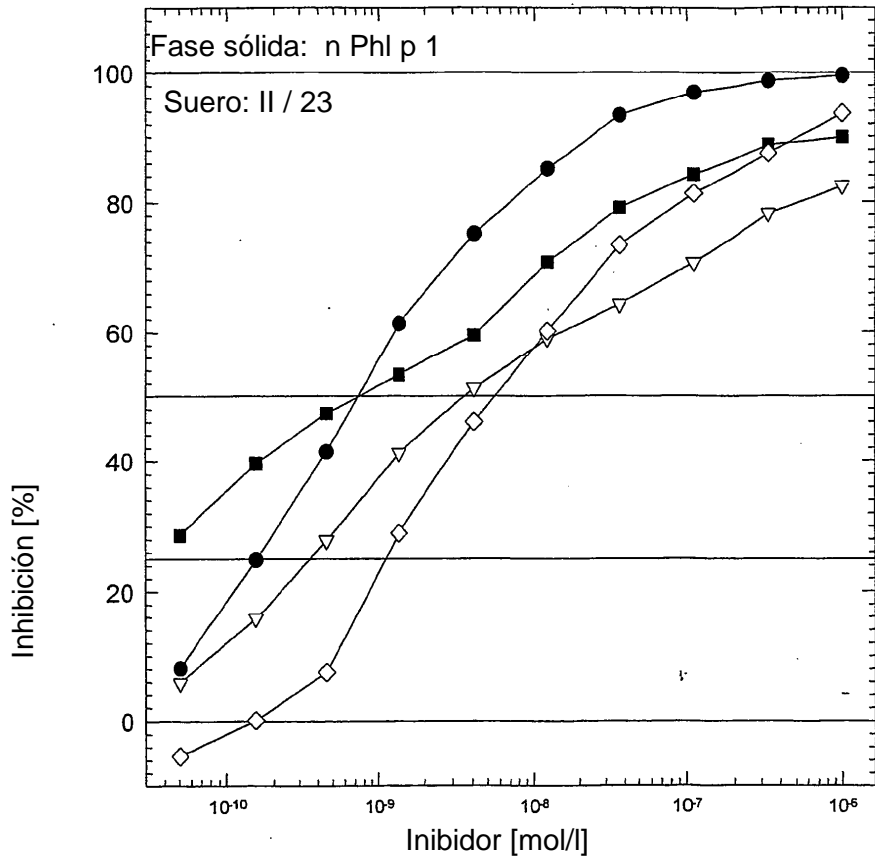
_____ rPhl p 1-LM

Elución a: 51.41 min

55.22 min

Figura 3:

Ensayo de inhibición EAST de las variantes de plegamiento rPhl p 1-T236C-LM y -HM



- n Phl p1, a partir de 10^{-6} mol / l
- ▽ r Phl p1 HM, a partir de 10^{-6} mol / l
- r Phl p1 LM, a partir de 10^{-6} mol / l
- ◇ Phleum pratense - extracto, a partir de 50 µg/ml