

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 605**

51 Int. Cl.:

A61K 39/36 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C07K 16/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2002 E 02757980 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 1434793**

54 Título: **Alérgenos recombinantes con reducción de la unión a IgE sin disminución de la antigenicidad para células T**

30 Prioridad:

20.09.2001 AU PR779201

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

03.01.2014

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (100.0%)
GRATTAN STREET
PARKVILLE, VICTORIA 3052, AU**

72 Inventor/es:

**DEWEERD, NICOLE;
SINGH, MOHAN BIR;
BHALLA, PREM L. y
SWOBODA, INES**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 436 605 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

Alergenos recombinantes con reducción de la unión a IgE sin disminución de la antigenicidad para células T.

CAMPO DE LA INVENCION

5 En este documento se describen reactivos útiles en el tratamiento inmunoterapéutico o inmunoproláctico de enfermedades alérgicas. Más especialmente, la presente invención proporciona alergenos modificados que muestran una reducción de la capacidad de interacción con la IgE, incluyendo reducción de la actividad estimuladora de la producción de IgE, al tiempo que retiene la antigenicidad para las células T, lo que es útil en la inmunomodulación de las enfermedades alérgicas de tipo I. La presente invención además contempla un procedimiento de inmunomodulación de enfermedades alérgicas, como las enfermedades alérgicas de tipo I, mediante la administración de alergenos modificados que muestran una reducción de la capacidad de interacción con la IgE reteniendo la antigenicidad para las células T.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los detalles bibliográficos de las referencias proporcionadas en la presente memoria descriptiva se enumeran al final de la misma.

15 La referencia a cualquier técnica previa en esta memoria descriptiva no es, ni debe tomarse como tal, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que dicha técnica previa forme parte del conocimiento general común en cualquier país.

20 Las enfermedades alérgicas de tipo I, como la rinitis alérgica estacional, conjuntivitis, asma alérgica y dermatitis alérgica, representan un problema sanitario importante en los países industrializados (Wuthrich, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 90: 3-10, 1989). Se estima actualmente que el 15-20% de la población de los países desarrollados padece alguna forma de alergia (Miyamoto, *Advances in Allergology and Clinical Immunology*. Godard P, Bousquet J, Michel FB (eds.) pág. 343-347. The Parthenon Publishing Group, Cornforth, Reino Unido, 1992). Por tanto, el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades se ha convertido en punto de interés para la investigación científica.

25 Las bases inmunológicas y bioquímicas principales de las reacciones alérgicas de tipo I son la interacción de sustancias alérgicas (alergenos) con anticuerpos IgE unidos a receptores Fc de alta afinidad sobre la superficie de mastocitos y basófilos. Esta interacción da lugar al entrecruzamiento de los anticuerpos IgE específicos de alergeno que, a su vez, estimula una liberación inmediata y una producción en cascada de mediadores inflamatorios responsables de los síntomas alérgicos. Los alergenos están presentes en las partículas en suspensión como, por ejemplo, el polvo doméstico, en el polen de gramíneas, maleza y árboles, en las esporas de hongos y en la caspa animal.

35 En la actualidad, una forma de intervención terapéutica de las enfermedades alérgicas (como la rinitis, conjuntivitis y asma alérgica) supone la inyección del alergeno que se considera responsable de la respuesta alérgica. Esto se denomina tratamiento de hiposensibilización. Los extractos actualmente en uso para este procedimiento se preparan a partir de fuentes naturales y contienen, además de los alergenos, componentes como proteínas a las que los pacientes no son alérgicos.

40 El desarrollo de técnicas recombinantes ha proporcionado los medios para producir altos niveles de alergenos purificados con fines diagnósticos y terapéuticos. Sin embargo, el alto nivel de pureza de las preparaciones de alergenos recombinantes da lugar a índices anafilactogénicos altos incluso a dosis muy bajas. Por consiguiente, es necesaria una atención extrema cuando se administran a pacientes. Por tanto, se necesita desarrollar alergenos recombinantes con riesgo reducido de choque anafiláctico.

45 La principal causa externa de la rinitis alérgica estacional y del asma alérgica es el polen de gramíneas en suspensión (Smart y col., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 7: 243-248, 1983). Los calendarios de polen muestran que el polen de gramíneas es más abundante en primavera y al inicio del verano cuando florecen las gramíneas, que es cuando la incidencia del asma alérgica es máxima. Las fuentes más importantes de polen de gramíneas son los pastos agrícolas comunes que están ampliamente introducidos en todo el mundo, aunque varían con la temperatura y las zonas de clima tropical. En regiones de temperaturas frías, las gramíneas como el ballico, la poa común y la hierba timotea (todos pertenecientes a la subfamilia *Pooideae*) son de importancia clínica, mientras que en temperaturas cálidas y entornos subtropicales el polen de césped (subfamilia *Chloridoideae*) es la fuente más importante de alergenos. Los estudios más exhaustivos se han realizado en proteínas de polen de ballico y, en menor medida, en poa común y hierba timotea.

Los individuos sensibles a alérgenos de una gramínea son, a menudo, sensibles a los de diversos otros géneros de gramíneas. Esto es especialmente cierto para los pólenes de gramíneas de la subfamilia *Pooideae* (Smith y col., «*Analysis of rye-grass pollen allergens using two dimensional electrophoresis and immunoblotting*» En Kraft D (ed), Molecular Biology and Immunology of Allergens, CRC Press, Boca Raton, FL, 1994) donde se ha demostrado la reactividad inmunológica cruzada en experimentos de inhibición usando un ensayo de unión a IgE, la prueba radioalergosorbente (RAST). En estos experimentos, los extractos de polen de una gramínea eran capaces de inhibir la unión de IgE a extractos de otras gramíneas.

Los componentes alérgicos del polen de gramíneas pueden clasificarse en diferentes grupos según sus propiedades fisicoquímicas e inmunológicas. Los alérgenos principales que inducen una reacción alérgica al polen de las gramíneas de poáceas son alérgenos de los grupos 1 y 5, tanto según el criterio del número de pacientes alérgicos que responden al tratamiento como de cantidades relativas de unión de la IgE a los alérgenos (Singh y col., 1991; *supra*). En el caso del ballico perenne, *Lolium perenne*, los extractos de polen contienen más de 17 proteínas que tienen la capacidad de unirse a la IgE del suero de pacientes alérgicos al polen de gramíneas (Smith y col., 1993, *supra*). Sin embargo, se ha demostrado que los alérgenos de los grupos 1 y 5 juntos pueden inhibir en mayor grado la unión de IgE a los extractos de polen sin procesar (Bond y col., *J. Allergy. Immunol.* 91: 339, 1993).

Lol p 5, una proteína de 28-33 kDa, es el segundo alérgeno en prevalencia del ballico y causa alergia en el 85-90% de los individuos alérgicos al polen de gramíneas. La clonación molecular de los ADNc que codifican este alérgeno del grupo 5 (Singh y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1384- 1388, 1991; Ong y col., *Gene* 134: 235-240, 1993) han demostrado que Lol p 5 existe como una familia de homólogos pero con isoformas diferenciables que retienen sus reactividad con IgE incluso tras la separación en geles PAGE-SDS desnaturalizantes e inmunotransferencia (Singh y col., 1991, *supra*).

Swoboda I. y col. describen formas hipoalérgicas del alérgeno del polen del ballico Lol p 5 como candidatas para inmunoterapia (Swoboda I. y col., *Int. Arch. Allerg. Immunol.* 134: 1018-2438, 2001). Suphioglu describe la base molecular de reconocimiento de IgE de Lol p 5 (Suphioglu C. y col., *Mol. Immunol.* 35: 293-305, 1998) y Blaher describe la identificación de epítopes de células T de Lol p 9 (Blaher B. y col., *J. Allergy Clin. Immunol.* 98: 124-132, 1996). Burton describe el contacto con el receptor de células T y los restos de unión a MHC del epítipo de células T del alérgeno del ballico (Burton M. D. y col. *Allergy Clin Immunol.* 103: 255-61, 1999) y De Lalla describe la identificación de epítopes de células T en Lol p 5 mediante predicción de estructura por ordenador (Lalla De C. y col., *J. Immunol.* 163: 1725-1729, 1999). Ong describe los epítopes antigénicos y alérgicos de Lol p 5b usando fragmentación de genes (Ong E. K. y col., *Mol. Immunol.* 32: 295-302, 1995). En el documento WO95/06728 se describen péptidos de Lol p 5 que comprenden epítopes de células T y Swodoba describe mutantes de Lol p 5 con reducción de la capacidad de unión a IgE (Swodoba I. y col., *Europ. J. Immunol.* 32: 270-280, 2002). Schramm describe la preparación de variantes de Phl p 5b con reducción de la capacidad de unión a IgE pero que no conservan la reactividad con células T mediante ingeniería genética del alérgeno (Schramm G. y col., *J. Immunol.* 162: 2406-2414, 1999) y Muller describe epítopes de células T de alérgenos (Muller W. D. y col., *Allergologie* 22: 455-459, 1999). Wiedermann describe la inducción de tolerancia en mucosa con moléculas hipoalérgicas en un modelo murino de asma alérgica (Wiedermann U. y col., *Int. Arch. Allerg. Immunol.* 124: 391-394, 2001) y Bannon describe la modificación por ingeniería genética, caracterización y eficacia *in vitro* de los principales alérgenos de cacahuete para su uso en inmunoterapia (Bannon G. A. y col., *Int. Arch. Allerg. Immunol.* 124: 70-72, 2001). Akdis describe la regulación de la respuesta inmunitaria específica mediante modificaciones químicas y estructurales de los alérgenos (Akdis C. A. y col., *Int. Arch. Allerg. Immunol.* 121: 261-269, 2000) y Son describe la clonación y análisis inmunológico de Mal d 1 y Bet v 1 (Son D. Y. y col., *Europ. J. Nutr.* 38: 201-215, 1999). Kraft describe la importancia de alérgenos recombinantes para el diagnóstico y tratamiento de alergias mediadas por IgE (Kraft D. y col., *Int. Arch. Allerg. Immunol.* 118: 171-176, 1999), Larche describe terapias con alérgeno, IgE y tratamiento dirigido a mastocitos (Larche M. y col., *Pogr. Respirat. Res.* 31: 182-185, 2001) y Takai describe la combinación no anafiláctica de fragmentos parcialmente delecionados de Der f 1 para inmunoterapia específica de alérgeno (Takai T. y col., *Mol. Immunol.* 36: 1055-1065, 1999). Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar formas modificadas de alérgenos recombinantes útiles en la inmunoterapia e inmunoprofilaxis de afecciones alérgicas.

RESUMEN DE LA INVENCION

A lo largo de esta memoria descriptiva, siempre que el contexto no requiera otra cosa, la palabra «comprende» o variaciones como «comprendido» o «que comprende», se entenderá que supone la inclusión de un elemento, número entero o grupo de elementos o números enteros establecidos aunque sin la exclusión de ningún otro elemento, número entero o grupo de elementos o números enteros.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se refieren mediante un número identificador de secuencia (SEC ID N.º). Las SEC ID N.º se corresponden numéricamente con los identificadores de secuencia <400> 1 (SEC ID N.º 1), <400> 2 (SEC ID N.º 2), etc. En la tabla 1 se proporciona un resumen de los identificadores de secuencia. Después de las reivindicaciones se proporciona un listado de las secuencias.

ES 2 436 605 T3

- La presente invención proporciona un alérgeno recombinante modificado, en el que en su forma natural, el alérgeno se asocia con afecciones alérgicas en sujetos sensibilizados. Convenientemente, el alérgeno recombinante modificado comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de la secuencia de aminoácidos natural de modo que el alérgeno carezca de epítopes de IgE, o comprenda una reducción en el número de los mismos, y/o muestra una reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestra una reducción de la actividad estimuladora de producción de IgE manteniendo la antigenicidad de células T.
- 5
- Preferiblemente, la enfermedad alérgica es una enfermedad alérgica de tipo I.
- Preferiblemente, el alérgeno recombinante es un alérgeno de polen de gramíneas.
- Más preferiblemente, el alérgeno de gramíneas es el alérgeno del polen de ballico Lol p 5.
- 10 En una realización especialmente preferida, la presente invención proporciona un alérgeno Lol p 5 modificado que carece de epítopes de IgE, o comprende un número reducido de los mismos, y/o muestra una reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestra una reducción de la actividad estimuladora de producción de IgE manteniendo la antigenicidad de células T mientras dicha variante de Lol p 5 se selecciona a partir de una molécula compuesta por la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º 1 portadora de las mutaciones seleccionadas a partir del grupo compuesto por:
- 15
- a) K172N, F173L, T174A y V175A (mut 4),
 - b) K57A, G273A, K275A, K172A, F173L, T174A y V175A (mut 6) y
 - c) K57A, ΔG272, K172A, F173L, T174A y V175A (mut 8).
- (véanse las figuras 2 y 3).
- 20 En este documento se describe una composición que comprende un alérgeno modificado, como un alérgeno de gramíneas (p. ej., un alérgeno del polen de ballico) que carece de epítopes de IgE, o contiene un número reducido de los mismos, y/o muestra una reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestra una reducción de la actividad estimuladora de producción de IgE manteniendo su antigenicidad para las células T. La composición además comprende uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 25 En este documento se describe un procedimiento para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad alérgica en un sujeto administrando al sujeto una cantidad eficaz de un alérgeno modificado que carece de epítopes de IgE, o contiene un número reducido de los mismos, y/o muestra una reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestra una reducción de la actividad estimuladora de producción de IgE manteniendo la antigenicidad para las células T.
- 30 En la tabla 1 se proporciona un resumen de los identificadores de secuencia utilizados a través de la memoria descriptiva en cuestión.

TABLA 1

Resumen de identificadores de secuencia

ID DE SECUENCIA N.º:	DESCRIPCIÓN
1	Secuencia de aminoácidos de la isoforma A de Lol p 5
2	Secuencia de aminoácidos de la isoforma B de Lol p 5
3	Secuencia de aminoácidos de la isoforma A de Phl p 5
4	Secuencia de aminoácidos de la isoforma B de Phl p 5
5	Secuencia de aminoácidos de la isoforma Poa p 5

(continuación)

ID DE SECUENCIA N.º:	DESCRIPCIÓN
6	Secuencia de aminoácidos de la isoforma Poa p 5
7	Secuencia de aminoácidos de la variante de Lol p 5
8	Secuencia de aminoácidos de la variante D1 de Lol p 5
9	Secuencia de aminoácidos de la variante D2 de Lol p 5
10	Secuencia de aminoácidos de la variante D3 de Lol p 5
11	Secuencia de aminoácidos de la variante D4 de Lol p 5
12	Secuencia de aminoácidos de la variante D5 de Lol p 5
13	Secuencia de nucleótidos del cebador sentido utilizado para clonar D1
14	Secuencia de nucleótidos del cebador complementario utilizado para clonar D1
15	Secuencia de nucleótidos del cebador sentido utilizado para clonar D2
16	Secuencia de nucleótidos del cebador complementario utilizado para clonar D2
17	Secuencia de nucleótidos del cebador sentido utilizado para clonar D3
18	Secuencia de nucleótidos del cebador complementario utilizado para clonar D3
19	Secuencia de nucleótidos del cebador sentido utilizado para clonar D4
20	Secuencia de nucleótidos del cebador complementario utilizado para clonar D4
21	Secuencia de nucleótidos del cebador sentido utilizado para clonar D5
22	Secuencia de nucleótidos del cebador complementario utilizado para clonar D5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 La figura 1 es una representación en la que se muestra una comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de los alérgenos del grupo 5. Los guiones indican huecos introducidos para obtener el máximo alineamiento. Los restos idénticos a Lol p 5 A se indican mediante asteriscos.

10 La figura 2 es una representación en la que se muestra la secuencia de aminoácidos de Lol p 5 A en la que se indican las mutaciones introducidas en el alérgeno para obtener los mutantes D1, D2, D3, D4 y D5. Los aminoácidos de Lol p 5 A que se han cambiado se indican en recuadros, mientras que las secuencias nuevas aparecen en negrita.

La figura 3 es una representación esquemática de las variantes Lol p 5 mutadas; por ejemplo, mut 1 contiene la mutación D1.

15 La figura 4 es una representación en la que se muestran las secuencias de los cebadores utilizados para generar mutaciones en Lol p 5 A.

La figura 5 es un diagrama en el que se muestra el análisis mediante transferencia en ranuras de Lol p 5 (no mutado) y las nueve variantes mutadas (mut 1 a mut 9) de reactividades de las proteínas purificadas frente a un anticuerpo policlonal (p), un anticuerpo monoclonal (m) y a sueros de 7 pacientes alérgicos al polen de ballico.

La figura 6 es un diagrama en el que se muestran los análisis mediante inmunotransferencia de Lol p 5 (no mutado) y las nueve variantes mutadas (mut 1 a mut 9) de reactividades de las proteínas purificadas frente a un anticuerpo policlonal (p), un anticuerpo monoclonal (m) y al suero de un paciente alérgico al polen de ballico (paciente 2).

- 5 Las figuras 7 A, B y C son representaciones gráficas del ensayo de ELISA usando Lol p 5 no mutado purificado y cuatro de las proteínas mutadas (mut 3, mut 4, mut 6 y mut 9) que muestran una reducción en la reactividad de las variantes mutadas frente a un anticuerpo monoclonal (AcM A7) y a la IgE de dos pacientes (paciente 4 y paciente 27).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

- 10 En este documento se describen variantes de alergenios sustancialmente hipoalergénicas modificadas mediante ingeniería genética con incapacidad, o reducción de su capacidad, para interactuar con la IgE y que se proporcionan para su uso en inmunoterapia e inmunoprolifaxis. Se determina que ciertos tipos de modificaciones de la secuencia aminoterminal dan lugar a una falta de epítopes de IgE, o a un número reducido de los mismos, a la reducción de la actividad de los epítopes de IgE, reducción de la capacidad para interactuar con IgE y/o reducción de la actividad estimuladora de la producción de IgE.

- 15 Por consiguiente, en una realización se proporciona un alergenio recombinante modificado, en la que dicho alergenio en forma natural se asocia con enfermedades alérgicas en sujetos sensibilizados, donde dicho alergenio recombinante modificado comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de la secuencia de aminoácidos natural de modo que el alergenio carece de epítopes de IgE, o contiene un número reducido de los mismos, y/o muestra una reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestra una reducción de la actividad
20 estimuladora de la producción de IgE manteniendo la antigenicidad para células T.

- El término sujeto «sensibilizado» se usa en su sentido más amplio para incluir a un individuo que muestra los síntomas de una enfermedad alérgica y, más en particular, una enfermedad alérgica de tipo I en respuesta o asociado con el alergenio. Un «individuo» es, preferiblemente, un ser humano aunque también se extiende a un primate no humano, al ganado (p. ej., oveja, vaca, cerdo, caballo, burro o cabra), a un animal de experimentación
25 (p. ej., ratón, rata, conejo o cobaya) y a un animal de compañía (p. ej., perro o gato).

La descripción se dirige en particular a alergenios del polen de gramíneas.

- Por consiguiente, en otra realización se describe un alergenio de polen de gramíneas recombinante modificado, en la que dicho alergenio de polen de gramíneas en forma natural se asocia con enfermedades alérgicas de tipo I donde dicho alergenio de polen de gramíneas recombinante modificado comprende una secuencia de aminoácidos
30 modificada a partir de la secuencia de aminoácidos natural, de modo que el alergenio carezca de epítopes de IgE, o contenga un número reducido de los mismos, y/o muestre una reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestre una reducción de la actividad estimuladora de la producción de IgE manteniendo la antigenicidad para células T.

- En una realización especialmente preferida, el alergenio de polen de gramíneas es el alergenio Lol p 5 del polen de ballico. La referencia a «alergenio de ballico» incluye todos los alergenios de ballico o de gramíneas inmunológicamente relacionadas, u otros alergenios de gramíneas.
35

- Por consiguiente, esta realización contempla un alergenio de polen de ballico recombinante modificado que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de la secuencia de aminoácidos natural, de modo que el alergenio carezca de epítopes de IgE, o contenga un número reducido de los mismos, y/o muestre una
40 reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestre una reducción de la actividad estimuladora de producción de IgE manteniendo la antigenicidad para células T.

La retención de la antigenicidad para células T incluye referencia a la retención de epítopes de células T o a cualquier otra capacidad para interactuar con las células T para inducir una respuesta de células T.

- En adelante, la descripción se realiza en relación a Lol p 5. Esto se hace porque Lol p 5 representa, hasta el momento actual, un alergenio especialmente útil en el que poner en práctica la presente invención. Los procedimientos de la presente invención son especialmente aplicables al alergenio del polen de ballico Lol p 5.
45

- Durante el trabajo de preparación de la presente descripción los inventores expresaron Lol p 5 recombinante en *E. coli* como proteína no de fusión y encontraron que la eliminación del péptido señal N-terminal del ADNc antes de la clonación en el vector de expresión bacteriano daba lugar a una forma recombinante soluble del alergenio. Esta técnica permite evitar las estrictas condiciones desnaturizantes necesarias para el aislamiento del alergenio a partir de las células bacterianas. Se comprobó la similitud antigénica del Lol p 5 recombinante con su equivalente natural mediante experimentos de inhibición de tipo ELISA y los autores mostraron que la forma recombinante
50

5 inhibía por completo la unión a IgE de una forma aislada de su polen natural equivalente. El hecho de que las isoformas recombinantes únicas puedan inhibir la unión de IgE a alérgenos naturales implicaba además que las diferentes isoformas del alérgeno eran similares. Los inventores usaron alérgenos recombinantes en estudios de inhibición mediante inmunotransferencia donde se usaron sueros alérgicos reincubados con Lol p 5 recombinante como sonda para inmunotransferencias bidimensionales de las proteínas solubles de ballico. Se ha encontrado según la presente invención que la preincubación con una forma abolía por completo la unión a todas las diferentes formas codificadas por diferentes genes. Esto mostraba que incluso con microheterogeneidades de secuencias, las diferentes isoformas del alérgeno eran antigénicamente muy similares.

10 El siguiente paso en el desarrollo de la presente descripción fue determinar los restos de aminoácidos clave de las proteínas alérgicas que podrían cambiarse para eliminar o reducir la capacidad de interacción con la IgE mientras se mantenía la estructura general y la funcionalidad de los epítopes de células T.

15 Los autores determinaron qué restos de aminoácidos en las isoformas A y B de Lol p 5 estaban conservados. Se argumentó que estos restos de aminoácidos conservados podrían ser importantes para la unión a IgE ya que se observó reactividad cruzada entre diversos alérgenos de diferentes gramíneas. Mediante mutación selectiva de estos restos de aminoácidos conservados, se identificaron mutantes que no tenían capacidad de interacción con IgE o esta se había reducido, manteniendo la antigenicidad para células T.

20 Por consiguiente, otra realización comprende un alérgeno de polen de gramíneas del grupo 5, en el que dicho alérgeno de polen de gramíneas del grupo 5 comprende una sustitución, deleción y/o adición en uno o más restos de aminoácidos que están conservados en al menos dos alérgenos de polen de gramíneas del grupo 5 con reactividad inmunológica cruzada y en el que dicho alérgeno de polen de gramíneas del grupo 5 carece de epítopes de IgE, o contiene un número reducido de los mismos, y/o muestra reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestra reducción de la actividad estimuladora de producción de IgE en comparación con la correspondiente forma natural.

25 De acuerdo con esta realización, una secuencia de aminoácidos de referencia adecuada es SEC ID N.º 1, que es la secuencia de aminoácidos de la isoforma A de Lol p 5. La comparación de la secuencia de aminoácidos, como se observa en la figura 1, muestra los restos de aminoácidos conservados en las isoformas A y B de Lol p 5 y Phl p 5 y en las isoformas de Poa p 5. Los restos conservados en la figura 1 se indican mediante asteriscos. A continuación se introducen fácilmente mutantes que alteran uno o más de estos restos conservados.

30 Otra realización proporciona un alérgeno de polen de gramíneas del grupo 5 modificado que comprende un truncamiento o sustitución, deleción y/o adición de aminoácidos en la posición correspondiente a uno o más de los mutantes 1 a 9 de Lol p 5 como se muestra en la figura 3.

35 En una realización especialmente preferida, un alérgeno Lol p 5 modificado que carece de epítopes de IgE, o contiene un número reducido de los mismos, y/o muestra una reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestra una reducción de la actividad estimuladora de la producción de IgE manteniendo la antigenicidad para células T en la que dicha variante de Lol p 5 se selecciona entre una molécula compuesto por la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º 1 portadora de las mutaciones seleccionadas a partir del grupo compuesto por mut 4, mut 6 y mut 8. Las variantes de Lol p 5 identificadas como SEC ID N.º 8 a 12 se refieren en este documento como mutantes D1 a D5, respectivamente.

40 La descripción además proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o es complementaria a una secuencia que codifica un alérgeno recombinante modificado, en la que dicho alérgeno en forma natural se asocia con enfermedades alérgicas en sujetos sensibilizados, donde dicho alérgeno recombinante modificado comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de la secuencia de aminoácidos natural de modo que el alérgeno carezca de epítopes de IgE, o contenga un número reducido de los mismos, y/o muestre una reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestre una reducción de la actividad estimuladora de la producción de IgE manteniendo la antigenicidad de células T.

45 Otra realización proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o es complementaria a una secuencia que codifica un alérgeno recombinante modificado, en la que dicho alérgeno en forma natural se asocia con enfermedades alérgicas de tipo I en sujetos sensibilizados, donde dicho alérgeno recombinante modificado comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de la secuencia de aminoácidos natural de modo que el alérgeno carezca de epítopes de IgE, o contenga un número reducido de los mismos, y/o muestre una reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestre una reducción de la actividad estimuladora de la producción de IgE manteniendo la antigenicidad de células T.

50 Aún otra realización se dirige a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o es complementaria a una secuencia que codifica un alérgeno de polen de gramíneas recombinante modificado, en la que dicho alérgeno de polen de gramínea que está en forma natural se asocia con enfermedades

alérgicas de tipo I en sujetos sensibilizados, donde dicho alérgeno de polen de gramíneas recombinante modificado comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de la secuencia de aminoácidos natural de modo que el alérgeno carezca de epítopes de IgE, o contenga un número reducido de los mismos, y/o muestre una reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestre una reducción de la actividad estimuladora de la producción de IgE manteniendo la antigenicidad para células T.

Todavía aún otra realización se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o es complementaria a una secuencia que codifica un alérgeno de polen de ballico recombinante modificado que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de la secuencia de aminoácidos natural de modo que el alérgeno carezca de epítopes de IgE, o contenga un número reducido de los mismos, y/o muestre una reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestre una reducción de la actividad estimuladora de producción de IgE manteniendo la antigenicidad de células T.

Por tanto, una realización especialmente preferida proporciona moléculas de ácido nucleico purificadas que codifican un alérgeno de polen de gramíneas modificado y, más especialmente, un alérgeno de polen de gramíneas del grupo 5 modificado o un fragmento antigénico del mismo, o derivado u homólogo del mismo, o el equivalente funciona de dicha secuencia de ácido nucleico en el que el alérgeno de polen de gramíneas modificado carece de epítopes de IgE, contiene un número reducido de los mismos, y/o muestra una reducción de la capacidad de unión a IgE y/o muestra una reducción de la actividad estimuladora de producción de IgE manteniendo la antigenicidad para células T. Las secuencias de ácido nucleico preferidas codifican el miembro de la familia de alérgenos del grupo 5 Lol p 5. Una molécula de ácido nucleico especialmente útil codifica los mutantes mut 4, mut 6 y mut 8 de Lol p 5.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento pueden ser moléculas genómicas o de ADNc, o una molécula de ARNm correspondiente, y pueden denominarse gen. La referencia a un «gen», con respecto a la presente invención, significa cualquier secuencia contigua de nucleótidos cuya transcripción lleva a una molécula de ARNm o cuya secuencia es una molécula de ARNm, cuya molécula de ARNm es capaz de traducirse en una proteína. El gen que codifica un miembro de la familia de alérgenos de polen de gramíneas del grupo 5 significa la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína o un derivado u homólogo de la proteína que puede contener sustituciones, deleciones y/o adiciones de un único o múltiples aminoácidos en relación con la molécula natural correspondiente. Un gen de Lol p 5 modificado también hace referencia a ADNc complementarios a los ARNm correspondientes a la longitud completa o parcial de una proteína Lol p 5 que tiene al menos un truncamiento o sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos en relación con las moléculas de origen natural.

La descripción además contempla a las moléculas de fusión. Por ejemplo, para algunos aspectos de la presente invención, es deseable producir una proteína de fusión que comprenda un alérgeno de polen de gramíneas modificado o un fragmento del mismo o un derivado del mismo y una secuencia de aminoácidos de otro péptido o proteína, siendo ejemplos de estos últimos enzimas como β -galactosidasa, fosfatasa, ureasa y similares. La mayoría de las proteínas de fusión se forman mediante la expresión de un gen recombinante en el que se han unido dos secuencias codificadoras de modo que sus marcos de lectura estén en fase. Alternativamente, las proteínas o péptidos pueden estar unidos *in vitro* por medios químicos. La presente invención abarca todas estas proteínas de fusión o derivados genéticos híbridos de un alérgeno de polen de gramíneas o sus secuencias de nucleótidos codificadoras. Además, mediante homólogos y derivados de una proteína alérgeno del polen de gramíneas significa que se incluyen derivados sintéticos de las mismas. Las secuencias de nucleótidos según se elucida en este documento, pueden usarse para sintetizar químicamente la proteína completa o generar cualquier cantidad de fragmentos (péptidos) mediante síntesis química por métodos bien conocidos (p. ej., síntesis en fase sólida). Todos estos péptidos sintetizados químicamente están incluidos en la presente invención. Por consiguiente, la descripción se extiende a miembros de la familia de alérgenos del polen de gramíneas modificados y aislados, a fragmentos de los mismos y a sus derivados, homólogos y moléculas inmunológicamente relacionadas obtenidas mediante sistemas recombinantes o síntesis química.

Los términos «aislado» y «purificado» se usan indistintamente en este documento y hacen referencia a péptidos, proteínas, fragmentos de proteínas y secuencias de ácido nucleico sustancialmente libres de material celular o medio de cultivo cuando se producen mediante técnicas de ADN recombinante o precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetizan químicamente. El término «de origen natural» según se usa en este documento se refiere a proteínas o fragmentos de las mismas purificados a partir de polen de gramíneas o de otras parte de la planta. También se incluye la referencia a una secuencia de aminoácidos determinada mediante una secuencia de ADNc pero que se asocia con afecciones alérgicas de forma similar a un alérgeno purificado de polen de gramíneas.

Entre los fragmentos de moléculas de ácido nucleico dentro del alcance la descripción se incluyen aquellos que codifican parte de los alérgenos del polen de gramíneas que muestran antigenicidad para células T pero carecen o muestran una reducción de la interacción con IgE en mamíferos, preferiblemente en seres humanos.

5 Son deseables los fragmentos y mutantes de alergenos del polen de gramíneas modificados producidos de forma sintética que no se unen a IgE y/o que tienen una capacidad de interacción con IgE mínima y/o una capacidad mínima para estimular la producción de IgE. Es preferible que esta actividad de interacción con IgE mínima no induzca la liberación de histamina. Por ejemplo, es preferible que el alergeno modificado no produzca entrecruzamiento de IgE sobre los mastocitos o basófilos. Actividad de interacción con IgE mínima se refiere a la actividad de interacción con IgE que es menor que la cantidad de interacción con IgE de proteínas de alergeno de polen de gramíneas «de origen natural» obtenidas mediante tecnología recombinante o de forma sintética o que la del alergeno completo nativo de polen de gramíneas purificado. La interacción con IgE también puede determinarse como actividad estimuladora de la producción de IgE. Entre los fragmentos preferidos también se incluyen fragmentos antigénicos que, cuando se administran a un individuo sensibilizado al polen de gramíneas o a un individuo alérgico a un alergeno con reactividad cruzada con el alergeno de polen de gramíneas, son capaces de modificar la respuesta alérgica del individuo al alergeno de polen de gramíneas.

15 Son especialmente deseables los fragmentos antigénicos descritos en este documento que tienen actividad estimulante de células T, es decir, antigenicidad de células T, y, por tanto, comprenden al menos un epítipo de células T. Se considera que los epítopes de células T están implicados en el inicio y en la perpetuación de las respuestas inmunitarias a un alergeno de una proteína que es responsable de los síntomas clínicos de la alergia.

Se piensa que estos epítopes de células T desencadenan acontecimientos tempranos a nivel de la célula T cooperadora mediante la unión a una molécula de HLA apropiada sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno y estimulando la subpoblación de células T pertinente.

20 Estos acontecimientos conllevan proliferación de células T, secreción de linfoquinas, reacciones inflamatorias locales, reclutamiento de células inmunes adicionales a la zona y activación de la cascada de células B que conduce a la producción de anticuerpos. Un isotipo de estos anticuerpos, IgE, es fundamentalmente importante en el desarrollo de los síntomas alérgicos y su producción se ve afectada al inicio de la cascada de acontecimientos, a nivel de las células T cooperadoras, por la naturaleza de las linfoquinas secretadas. Un epítipo de células T es el elemento básico o la unidad más pequeña de reconocimiento por un receptor de células T, donde el epítipo comprende aminoácidos esenciales para reconocimiento del receptor. Están dentro del alcance de esta descripción las secuencias de aminoácidos que mimetizan las de epítopes de células T y que modifican la respuesta alérgica a alergenos proteicos.

30 La exposición de los pacientes a alergenos proteicos purificados descritos en este documento o a fragmentos antigénicos de los mismos que comprenden al menos un epítipo de células T y derivados de alergenos proteicos puede hacer tolerantes o inducir anergia a subpoblaciones de células T apropiadas de modo que se convierten en insensibles al alergeno proteico y no participan en la estimulación de una respuesta inmunitaria tras dicha exposición. Además, la administración del alergeno proteico de la invención o un fragmento antigénico de la presente invención que comprende al menos un epítipo de células T puede modificar el perfil de secreción de linfoquinas en comparación con la exposición al alergeno proteico de origen natural o una porción del mismo (p. ej., producir un aumento de IL-4 y/o una disminución de IL-2). Asimismo, la exposición a este alergeno proteico o fragmento antigénico puede influir sobre subpoblaciones de células T que normalmente participan en la respuesta al alergeno, de modo que estas células T se retiran de los sitios de exposición normales al alergeno (p. ej., mucosa nasal, piel y pulmón) hacia los sitios de administración terapéutica del alergeno proteico o su fragmento. Esta redistribución de subpoblaciones de células T puede mejorar o reducir la capacidad del sistema inmunológico de un individuo para estimular la respuesta inmunitaria normal en el sitio de exposición normal al alergeno, dando lugar a una disminución de los síntomas alérgicos.

45 En este documento se describen vectores de expresión y células huésped transformadas para expresar las secuencias de ácido nucleico de la invención. Los vectores de expresión de la descripción comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica el alergeno de polen de gramíneas modificado, o un fragmento antigénico del mismo, o un derivado u homólogo del mismo, o el equivalente funcional de dicha secuencia de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico pueden expresarse en células huésped procariotas o eucariotas. Entre las células huésped adecuadas se incluyen células bacterianas como *E. coli*, células de insectos o células de mamíferos como células de ovario de hámster chino (CHO). Los vectores de expresión, promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión adecuados se pueden encontrar en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Entre los vectores adecuados para la expresión en levaduras se incluyen YepSec1 (Baldari y col., *EMBO J.* 6: 229-234, 1987), pMFa (Kurjan y Herskowitz, *Cell* 30: 933-943, 1982) y JRY88 (Schultz y col., *Gene* 54: 113-123, 1987).

55 Las células huésped pueden transformarse para que expresen las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento usando técnicas convencionales como coprecipitación con fosfato cálcico o cloruro cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano o electroporación. Los métodos adecuados para la transformación de células huésped pueden encontrarse en Sambrook y col., 1989, *supra*, y en otros libros de texto para laboratorio. Las secuencias de ácido nucleico también pueden sintetizarse usando técnicas convencionales.

Por consiguiente, otra realización proporciona un método de producción de un alérgeno de gramíneas recombinante modificado o un fragmento del mismo, o un derivado u homólogo del mismo, o una molécula inmunológicamente relacionada con el mismo que comprende cultivar un organismo que contiene una molécula de ADN recombinante replicable, comprendiendo dicha molécula un promotor capaz de expresarse en dicho organismo, un gen que codifica un alérgeno o miembro de la familia de alérgenos del polen de gramíneas modificado, un fragmento, homólogo o derivado del mismo, o una molécula inmunológicamente relacionada con el mismo, localizado antes del extremo 5' y transcrito a partir de dicho promotor, un marcador seleccionable y un vehículo de ADN que contiene un origen de replicación procariota o eucariota, en condiciones y durante un tiempo suficiente para que dicha molécula de ADN recombinante se mantenga de forma estable y dirija la síntesis del alérgeno de polen de gramíneas modificado o su fragmento, derivado, homólogo o molécula inmunológicamente relacionada con el mismo y, a continuación, aislando opcionalmente el mismo.

Los alérgenos de polen de gramíneas y los fragmentos (péptidos) de los mismos pueden purificarse a partir del medio de cultivo celular, de células huésped o ambos usando técnicas conocidas en la materia de purificación de péptidos y proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis e inmunopurificación con anticuerpos específicos para el alérgeno de polen de gramíneas modificado. Los términos «aislado» y «purificado» se usan indistintamente en este documento y hacen referencia a péptidos, proteínas, fragmentos de proteínas y secuencias de ácido nucleico sustancialmente libres de material celular o medio de cultivo cuando se producen mediante técnicas de ADN recombinante o precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetizan químicamente.

Otra realización proporciona preparaciones de proteínas que comprenden las variantes de Lol p 5 portadoras de las mutaciones mut 4, mut 6 o mut 8 y sus equivalentes, homólogos o derivados funcionales o inmunológicos.

Por tanto, en este documento se describen alérgenos de polen de gramíneas modificados o sus derivados que, cuando se administran a un individuo sensibilizado al polen de gramíneas, reduce la respuesta alérgica del individuo al polen de gramíneas, como el polen de ballico o el polen de gramíneas inmunológicamente relacionadas. Entre los alérgenos de polen de gramíneas modificado preferidos se incluyen la proteína Lol p 5 modificada o un derivado u homólogo de la misma. Otros alérgenos preferidos son Phl p 5 y Poa p 5.

Además de inducir una sustitución, adición y/o delección o truncamiento de aminoácidos, otro ejemplo de una modificación de proteínas o péptidos es la sustitución de restos de cisteína preferiblemente por alanina, serina, treonina, leucina o ácido glutámico para minimizar la dimerización mediante puentes disulfuro. Otro ejemplo de modificación de las proteínas y péptidos de la invención es mediante modificación química de las cadenas laterales de los aminoácidos o ciclización del péptido.

Para potenciar la estabilidad y/o reactividad, las proteínas o péptidos descritos en este documento también pueden modificarse para incorporar uno o más polimorfismos en la secuencia de aminoácido del alérgeno proteico a partir de una variación alélica natural. Adicionalmente, dentro del alcance de esta descripción pueden sustituirse por o añadirse aminoácidos D, aminoácidos no naturales o análogos no aminoácidos para producir una proteína o péptido modificado.

Otra realización se refiere a vectores recombinantes que comprenden secuencias de ADN que codifican proteínas que muestran actividad alérgica modificada a partir del polen de una especie de gramínea. Más en particular, la especie de gramínea pertenece a la familia *Poaceae* (*Gramineae*), e incluso más especialmente, al género *Lolium*. Aún incluso más especialmente, la proteína alérgica se caracteriza por presentar reactividad inmunológicamente cruzada con un anticuerpo frente a la proteína Lol plb del polen de *Lolium perenne*, en concreto:

Gramíneas pooides (festucas). Grupo 1: Triticaneae: *Bromus inermis*, bromus liso; *Agropyron repens*, grama inglesa; *A. cristatum*; *Secale cereale*, centeno; *Triticum aestivum*, trigo. Grupo 2: Poanea: *Dactylis glomerata*, dátilo; *L. multiflorum*, ballico italiano; *Poa pratensis*, poa común; *P. compressa*, gramínea pratense aplanada; *Avena sativa*, avena; *Holcus lanatus*, heno blanco o falsa poa; *Anthoxanthum odoratum*, grama de olor; *Arrhenatherum elatius*, gramínea avenoide; *Agrostis alba*, agrostis; *Phleum pratense*, fleo; *Phalaris arundinacea*, caña canaria. Gramíneas panicoides, *Paspalum notatum*, gramínea de Bahía, gramíneas andropogonoides: *Sorghum halepensis*, sorgo.

Pueden construirse diversos vectores de expresión para la producción de un alérgeno de polen de gramíneas modificado o un fragmento o derivado del mismo.

La descripción se extiende a anticuerpos monoclonales y policlonales frente a alérgenos de polen de gramíneas modificados o fragmentos, derivados u homólogos de los mismos.

Los anticuerpos monoclonales son útiles para la selección de bibliotecas de ADNc o para proteínas producidas de forma recombinante purificadas o incluso en el tratamiento para reducir la actividad de una proteína introducida. En la siguiente descripción, en referencia al polen de gramíneas, los alérgenos proteicos incluyen sus derivados,

homólogos y moléculas inmunológicamente relacionadas, así como derivados de síntesis químicas de los mismos. En la siguiente descripción también se incluyen anticuerpos específicos frente a Lol p 5 modificado purificado y a fragmentos, derivados y homólogos del mismo. Se contempla que estos anticuerpos son útiles para el desarrollo de ensayos de detección (inmunoensayos) para alérgenos de polen de gramíneas modificados especialmente durante el seguimiento de un régimen terapéutico o diagnóstico y en la purificación de miembros de la familia de pólenes de gramíneas producidos de forma recombinante o mediante síntesis y en la purificación de miembros de la familia de pólenes de gramíneas producidos de forma recombinante o mediante síntesis y, en particular, del alérgeno de polen de gramíneas del grupo 5. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Adicionalmente, se ha previsto incluir cualquier segundo anticuerpo (monoclonal o policlonal) dirigido frente al primer anticuerpo descrito anteriormente. La descripción además contempla el uso de estos primeros o segundos anticuerpos en ensayos de detección y, por ejemplo, en el control del efecto de un diagnóstico o una preparación farmacéutica administrada. Además, está dentro de su alcance incluir anticuerpos frente a cualquier molécula formando complejos con un alérgeno proteico de polen de gramíneas modificado. Por consiguiente, un anticuerpo frente a un alérgeno proteico de polen de gramíneas abarca anticuerpos frente a este alérgeno proteico, o a partes antigénicas del mismo, y a cualquier molécula asociada (p. ej., regiones lipídicas, moléculas vehículo, proteínas fusionadas y similares).

Los miembros de la familia de pólenes de gramíneas, o fragmentos de los mismos, considerados en este documento se purifican y, a continuación, se utilizan en la producción de anticuerpos. Se pueden obtener anticuerpos tanto policlonales como monoclonales mediante inmunización con miembros de la familia de proteínas de polen de gramíneas modificadas recombinantes o sintéticas y ambos tipos son útiles para inmunoensayos. Los métodos de obtención de ambos tipos de sueros son bien conocidos en la técnica. Los sueros policlonales son menos preferidos aunque son relativamente fáciles de preparar mediante inyección de un animal de laboratorio adecuado con una cantidad eficaz de un alérgeno de polen de gramíneas modificado purificado, o partes antigénicas del mismo, obtención del suero del animal y aislamiento de sueros específicos mediante cualquiera de las técnicas de inmuoadsorción conocidas. Aunque los anticuerpos producidos por este método pueden utilizarse en prácticamente cualquier tipo de inmunoensayo, generalmente están menos favorecidos debido a la posible heterogeneidad del producto.

El uso de anticuerpos monoclonales en un inmunoensayo es especialmente preferido debido a la capacidad de producirse en grandes cantidades y la homogeneidad del producto. La preparación de líneas celulares de hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales derivados mediante la fusión de una línea celular inmortal y linfocitos sensibilizados frente a la preparación inmunogénica puede realizarse mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-499, 1975; Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519, 1976).

A diferencia de la preparación de sueros policlonales, la elección del animal depende de la disponibilidad de líneas inmortales apropiadas capaces de fusionarse con linfocitos. Ratones y ratas han sido los animales de elección en tecnología de hibridomas y se utilizan de forma preferente. También pueden utilizarse seres humanos como fuente de linfocitos sensibilizados si se dispone de líneas celulares humanas (o no humanas) inmortalizadas apropiadas. A los fines de esta descripción, pueden inyectarse al animal de elección aproximadamente de 0,1 mg a aproximadamente 20 mg de alérgeno de polen de gramíneas modificado purificado o partes del mismo. Normalmente el material de inyección se emulsiona en adyuvante completo de Freund. También puede que sean necesarias inyecciones de recuerdo. La detección de producción de anticuerpos puede realizarse probando los antisueros con el antígeno adecuadamente marcado. Los linfocitos pueden obtenerse extirpando el bazo o los ganglios linfáticos de los animales sensibilizados en condiciones estériles y sometidos a fusión. Alternativamente, los linfocitos pueden estimularse o inmunizarse *in vitro*.

La presencia de los alérgenos de polen de gramíneas modificados contemplados en este documento, o anticuerpos específicos para los mismos, en un suero de paciente, tejido o extracto de tejido vegetal o de mamífero, puede detectarse utilizando anticuerpos preparados como se indica anteriormente, monoclonales o policlonales, en prácticamente cualquier tipo de inmunoensayo. Previamente se ha descrito una amplia gama de técnicas de inmunoensayo (patentes de EE. UU. N.º 4.015.043, 4.424.276 y 4.018.653). Entre estas se incluyen ensayos tanto de un único sitio o de dos sitios o de tipo «sándwich» entre los tipos no competitivos, así como los ensayos de unión competitivos tradicionales. Los ensayos de tipo sándwich están entre los ensayos más útiles y utilizados con mayor frecuencia y su uso está favorecido en las realizaciones descritas en este documento. Se conocen diversas variaciones de la técnica de ensayo de tipo sándwich y se pretende que todas ellas estén incluidas en esta descripción. Brevemente, en un ensayo directo típico, un anticuerpo sin marcar se inmoviliza en un sustrato sólido y la muestra de ensayo se pone en contacto con la molécula unida. Tras un periodo de incubación adecuado, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo antígeno-anticuerpo secundario, se añade a continuación un segundo anticuerpo marcado con una molécula indicadora capaz de producir una señal detectable y, a continuación, se incuba dejando tiempo suficiente para la formación de un complejo terciario de anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado (p. ej., anticuerpo-proteína alérgeno de polen de gramíneas modificada-anticuerpo). El material que no ha reaccionado se elimina mediante lavado y la presencia del antígeno se determina mediante observación de una señal producida por la molécula indicadora. Los resultados pueden ser cualitativos, mediante simple observación de la señal visible, o pueden cuantificarse comparando con una muestra control que

5 contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones en el ensayo directo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra del ensayo se mezclan primero, se incuban y, a continuación, se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia, incluyendo cualquier variación mínima de modo que sea fácilmente aparente.

Aunque la siguiente descripción se refiere a la detección del alérgeno de polen de gramíneas modificado, se aplica igualmente para detectar anticuerpos frente al mismo y se pretende que sea una descripción suficiente del mismo.

10 En el ensayo directo de tipo sándwich típico, un primer anticuerpo que tiene especificidad por el alérgeno de polen de gramíneas modificado, o por partes antigénicas del mismo, contemplado en esta invención, se une covalentemente o de forma pasiva a una superficie sólida. La superficie sólida es, típicamente, vidrio o un polímero, siendo los polímeros utilizados con más frecuencia celulosa, poli(acrilamida), nailon, poliestireno, polivinilcloruro o polipropileno. El soporte sólido puede estar en forma de tubos, perlas, discos de microplacas o cualquier otra superficie adecuada para la realización de un inmunoensayo. Los procesos de unión son bien conocidos en la técnica y, generalmente, consisten en la unión por entrecruzamiento covalente o adsorción física, el complejo 15 polímero-anticuerpo se lava como preparación para la muestra problema. A continuación se añade una alícuota de la muestra de prueba al complejo en fase sólida y se incuban de aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente 37° C durante un periodo de tiempo suficiente que permita la unión de cualquier subunidad presente en el anticuerpo. El periodo de incubación variará, aunque generalmente estará en el intervalo de aproximadamente 2-40 minutos o durante la noche si es más conveniente. Tras el periodo de incubación, la fase 20 sólida con la subunidad de anticuerpo se lava, seca e incuban con un segundo anticuerpo específico para una porción del hapteno. El segundo anticuerpo está unido a una molécula indicadora que se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo al hapteno.

25 Por «molécula indicadora» según se usa en la presente memoria descriptiva, se entiende una molécula que, por su naturaleza química, proporciona cualquier señal analíticamente identificable que permite la detección del anticuerpo unido al antígeno. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. Las moléculas indicadoras utilizadas con mayor frecuencia en este tipo de ensayo son enzimas, fluoróforos o moléculas que contienen radionúclidos (es decir, radioisótopos). En el caso de un inmunoensayo enzimático, se conjuga una enzima con el segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o periodato. Como se reconocerá fácilmente, sin embargo, existe una amplia variedad de técnicas de conjugación diferentes que están fácilmente disponibles para los expertos en la materia. Entre las enzimas utilizadas con frecuencia se incluyen peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, β-galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos utilizados con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción, tras la hidrólisis mediante la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Por ejemplo, el *p*-nitrofenil fosfato es adecuado para su uso con conjugados de fosfatasa alcalina; para los conjugados con peroxidasa se usan con frecuencia 1,2-fenilendiamina, ácido 5-aminosalicílico o toluidina. 35 También es posible emplear sustratos fluorogénicos que dan lugar a un producto fluorescente en lugar de los sustratos cromogénicos indicados anteriormente. En todos los casos se añade el anticuerpo marcado con la enzima al complejo del primer anticuerpo con el hapteno, lo que permite la unión y, a continuación, se elimina mediante lavado el exceso de reactivo. Después se añade una solución que contiene el sustrato apropiado al complejo terciario de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato reaccionará con la enzima ligada al segundo anticuerpo, proporcionando una señal visual cualitativa, que puede además ser cuantificada, normalmente mediante espectrofotometría, para obtener una indicación de la cantidad de hapteno presente en la muestra. El término «molécula indicadora» también se extiende al uso de aglutinación celular o inhibición de la aglutinación, como de glóbulos rojos o partícula de látex, y similares.

45 Alternativamente, los compuestos fluorescentes, como fluoresceína y rodamina, pueden estar químicamente conjugados a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa mediante iluminación con luz de una longitud de onda en particular, el anticuerpo marcado con el fluorocromo absorbe la energía luminosa, lo que induce un estado de excitabilidad en la molécula que va seguido por la emisión de luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Como en el EIA, se permite que el anticuerpo marcado con fluorescencia se una al primer complejo anticuerpo-hapteno. Tras la eliminación mediante lavado del reactivo no unido, el complejo terciario remanente se expone a la luz de longitud de onda apropiada; la fluoresceína observada indica la presencia del hapteno de interés. Las técnicas de inmunofluorescencia y EIA están ambas muy bien establecidas en la técnica y son especialmente preferidas para el método actual. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas indicadoras, como radioisótopos y moléculas químico o bioluminiscentes. Será fácilmente aparente para el experto en la materia cómo variar el método para adaptarlo al objetivo requerido. También será aparente que lo 55 anteriormente indicado puede usarse para detectar directa o indirectamente (es decir, mediante anticuerpos) la proteína alérgeno de polen de gramíneas de esta invención.

60 Por consiguiente, una realización descrita en este documento proporciona un método de detección de un alérgeno de polen modificado o un derivado u homólogo del mismo o una proteína alérgica inmunológicamente reactiva con dicho alérgeno de polen de gramíneas modificado con dicho alérgeno de polen de gramíneas modificado o un derivado u homólogo presente en suero, extracto de tejido, extracto de planta u otro fluido biológico o composición

que comprende las etapas de poner en contacto dicho fluido o composición de prueba con un anticuerpo frente a dicho alérgeno proteico de polen de gramíneas durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se forme un complejo proteína alérgica modificada-anticuerpo y se someta dicho complejo a un sistema de detección. Para los métodos de purificación, también puede ser eficaz un anticuerpo frente a un alérgeno nativo para purificar un alérgeno modificado y esta realización está incluida en este documento.

La descripción también va dirigida a un kit para el ensayo rápido y conveniente para anticuerpos frente a alérgenos de polen de gramíneas modificados o derivados, homólogos o moléculas inmunológicamente relacionadas con los mismos en líquidos corporales de mamíferos, como suero, extractos de tejidos o fluidos tisulares, sobrenadantes de cultivos celulares *in vitro* y lisados celulares. El kit está compartimentalizado para alojar un primer recipiente adaptado para contener un componente antigénico del mismo, y un segundo recipiente adaptado para contener un anticuerpo frente al alérgeno de polen de gramíneas, estando dicho anticuerpo marcado con una molécula indicadora capaz de proporcionar una señal detectable. Si la molécula indicadora es una enzima, entonces se proporciona un tercer recipiente adaptado para contener un sustrato para dicha enzima. En un ejemplo de uso del kit en cuestión, la muestra de prueba se pone en contacto con los contenidos del primer recipiente durante un tiempo y en las condiciones para que un anticuerpo, si está presente en la muestra, se una al alérgeno del polen de gramíneas en este primer recipiente.

Debido a la presencia de alérgenos en el entorno, la rinitis alérgica y el asma estacional continúan teniendo una morbilidad e impacto socioeconómico significativos sobre las comunidades de países occidentales, a pesar de los avances hechos en su farmacología e inmunología. Aunque el espectro disponible de fármacos, incluyendo antihistamínicos y esteroides, han dado lugar a una mejora en el tratamiento de la enfermedad alérgica, estos tienen efectos secundarios desafortunados asociados con su uso prolongado. Debido a estos problemas, se ha mostrado un interés renovado en la inmunoterapia de enfermedades alérgicas. La inmunoterapia supone la inyección de potentes extractos de alérgenos a pacientes desensibilizados frente a reacciones alérgicas. Desafortunadamente, las preparaciones de polen utilizadas como alérgenos son polivalente y de mala calidad. Por consiguiente, las concentraciones utilizadas son, con frecuencia, altas para inducir respuestas IgG, aunque pueden ser letales debido al desencadenamiento de reacciones sistémicas, como la anafilaxia. El producto génico clonado o los péptidos sintéticos en base a la secuencia de alérgenos proporcionan un medio más seguro para el tratamiento ya que puede controlarse su calidad, caracterizarse y estandarizarse.

Por consiguiente, en este documento se describe un método para la desensibilización de un mamífero (p. ej., ser humano) alérgico al polen de gramíneas que comprende la administración a dicho mamífero de una cantidad desensibilizante eficaz de un alérgeno de polen de gramíneas modificado que carece, o comprende un número reducido, y/o muestra una reducción de la actividad de unión a IgE y/o muestra una reducción de la actividad de estimulación de la producción de IgE, o un fragmento o derivado, homólogo o molécula inmunológicamente relacionada con el mismo, durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca la desensibilización del mamífero (p. ej., ser humano) al polen de gramíneas.

En este documento se describe un método de tratamiento de la sensibilidad al polen de ballico o a un polen inmunológicamente relacionado con el de ballico en un mamífero (p. ej., un ser humano) sensibilizado frente a dicho polen, que comprende la administración a un mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición terapéutica descrita en este documento. La descripción además proporciona un método para tratar la sensibilidad al alérgeno del polen de ballico o a un alérgeno con reactividad inmunológica cruzada con el alérgeno del polen de ballico, que comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha preparación de proteínas descrita en este documento.

A través del uso de los péptidos y de la proteína descritos en este documento, pueden obtenerse preparaciones de composición homogénea, bien definida y con actividad biológica, y administrarse con fines terapéuticos (p. ej., para modificar la respuesta alérgica de un individuo sensibilizado frente al polen de *L. perenne*). La administración de estos péptidos o proteína puede, por ejemplo, modificar la respuesta IgE al alérgeno de polen de gramíneas. Los péptidos purificados también pueden usarse para estudiar el mecanismo de inmunoterapia de la alergia a *L. perenne* y para diseñar los derivados modificados o análogos útiles en inmunoterapia.

La descripción se dirige, por tanto, al uso de un alérgeno modificado en la producción de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de individuos sensibilizados al alérgeno.

Por tanto, en este documento se describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad desensibilizadora y terapéuticamente eficaz del alérgeno de polen de gramíneas modificado y, en particular, alérgeno de polen de gramíneas del grupo 5 o derivados, homólogos o moléculas inmunológicamente relacionadas con el mismo y uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Se contempla que los principios activos de una composición farmacéutica que comprende el alérgeno de polen de gramíneas modificado profiláctico muestran una actividad terapéutica excelente, por ejemplo, en la desensibilización de humanos alérgicos al polen de gramíneas cuando se administra en cantidades que dependen del caso en particular. Por ejemplo, pueden administrarse de aproximadamente 0,5 Fg a aproximadamente 20 mg por kilogramo de peso corporal por día. La

pauta posológica puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse diariamente varias dosis divididas o la dosis puede reducirse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. El principio activo puede administrarse de forma conveniente, por ejemplo, por vía oral, intravenosa (cuando es soluble en agua), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o supositorios, o implantarse (p. ej., usando moléculas de liberación lenta). Dependiendo de la vía de administración, puede que sea necesario que los principios activos que comprende la composición farmacéutica de la invención estén recubiertos por un material que proteja a dichos principios de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar dichos principios. Por ejemplo, el alérgeno de polen de gramíneas modificado puede administrarse en un adyuvante, coadministrarse con inhibidores de enzimas o en liposomas. El adyuvante se usa en su sentido más amplio e incluye cualquier compuesto estimulante del sistema inmunológico, como el interferón. Entre los adyuvantes contemplados en este documento se incluyen resorcinoles, tensioactivos no iónicos como polioxietilén oleil éter y n-hexadecil polietilén éter. Entre los inhibidores enzimáticos se incluye la tripsina pancreática. Los liposomas incluyen emulsiones FC de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales. A los fines de inducir anergia en las células T, la composición farmacéutica se administra preferiblemente en forma no inmunogénica (p. ej., esta no contiene adyuvante).

Los principios activos también pueden administrarse por vía parenteral o intraperitoneal. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de ambos, y en aceites. En condiciones normales de conservación y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para su uso en inyección incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones o polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables. En todos los casos, la forma debe estar estéril o debe ser fluida hasta el grado en que se pueda usar con jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de producción y conservación y debe protegerse de la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, iropilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerida en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Las prevenciones de la acción de microorganismos pueden conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los principios activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los compuestos enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de la esterilización mediante filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás componentes requeridos entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la técnica de liofilización, en la que obtiene un polvo del principio activo más cualquier componente adicional deseado de la solución previamente esterilizada por filtración.

Cuando un alérgeno de polen de gramíneas modificado, o un fragmento del mismo, se protege de forma adecuada como se describe anteriormente, el principio activo puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o puede estar incluido en una cápsula con cuerpo de gelatina dura o blanda, o puede estar comprendido en comprimidos o incorporarse directamente a los alimentos de la dieta. Para la administración terapéutica oral, el principio activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos orales, pastillas para chupar, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Estas composiciones y preparaciones deberían contener al menos el 1% en peso del principio activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones, por supuesto puede llevar y estar convenientemente entre aproximadamente el 5 y el 80% del peso de la unidad. La cantidad de principio activo en estas composiciones terapéuticamente útiles es aquella en la que se obtiene una dosis adecuada. Las composiciones o preparaciones preferidas descritas en este documento se preparan de manera que una forma de unidad de dosis oral contenga entre aproximadamente 10 Fg y 2.000 mg de principio activo.

Los comprimidos, pastilla para chupar, pastillas, cápsulas y similares también pueden contener los compuestos enumerados a continuación: un aglutinante como goma de tragacanto, goma de acacia, almidón de maíz o gelatina, excipientes como fosfato dicálcico; un agente desintegrante como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante como estearato de magnesio y puede añadirse un agente edulcorante como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente aromatizante como menta, aceite de gaulteria o sabor a cereza. Cuando la forma de unidad de dosis es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo indicado anteriormente, un vehículo líquido. Pueden presentarse otros materiales diversos como recubrimiento o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosis. Por ejemplo, los comprimidos, pastillas o cápsulas

5 pueden estar recubiertas con goma laca shellac, azúcar o ambas. Un jarabe o elixir puede contener el principio activo, sacarosa como agente edulcorante, metilo y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante como sabor a cereza o a naranja. Por supuesto, todo material utilizado en la preparación de cualquier forma de unidad de dosis debe estar farmacéuticamente puro y ser sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el principio activo puede incorporarse en preparaciones y formulaciones de liberación mantenida.

10 Según se usa en este documento «vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable» incluye cualquiera o todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de estos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso de estos en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse a las composiciones principios activos suplementarios.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

15 Generación de proteínas mutantes de Lol p 5

Para obtener mediante ingeniería genética variantes de alérgeno no reactivas con IgE hipoalérgicas fue necesario determinar si podían seleccionarse restos claves de las proteínas que pudieran cambiarse manteniendo la estructura general y los epítopes de células T intactos. Puesto que la frecuencia más alta de unión a IgE se observa en fragmentos peptídicos que abarcan la mitad del extremo C-terminal de Lol p 5, los inventores introdujeron mutaciones predominantemente en el extremo C-terminal del alérgeno. Para identificar las posiciones de los aminoácidos en Lol p 5 que probablemente tienen influencia sobre la capacidad de interacción con IgE de la proteína, se compararon las secuencias proteicas de las isoformas A y B de Lol p 5 con alérgenos del grupo 5 de otras gramíneas (figura 1). Se empleó la mutagénesis dirigida a sitio para sustituir restos que estaban altamente conservados entre el grupo 5 de alérgenos (figura 2). Se generaron proteínas mutantes en uno o tres dominios (figura 3).

Se expresaron Lol p 5 no mutados y variantes de Lol p 5 mutadas en formas solubles en *E. coli* usando el sistema del vector de expresión pQE (Qiagen). La expresión bacteriana (véase a continuación) de proteínas usando este vector introduce una etiqueta de polihistidina en el extremo N-terminal de las moléculas que es útil para la purificación de proteínas recombinantes mediante un paso de cromatografía de afinidad con metales quelantes. A continuación, se comprobó la reactividad con IgE de las proteínas control no sometidas a mutagénesis y las mutadas, así como la reactividad con el anticuerpo monoclonal anti-Lol p 5 A 7 (AcM A7) y antisuero policlonal anti-Lol p 5 en transferencia en ranuras (figura 5), inmunotransferencias (figura 6) y ensayos de tipo ELISA (figura 7). Los resultados muestran una reducción importante en la actividad de unión a IgE en el caso de algunas de las proteínas mutadas (p. ej., mut 4, mut 6 y mut 9). Estas moléculas alérgicas modificadas mediante ingeniería genética son potencialmente útiles para inmunoterapia más segura y eficaz para enfermedades alérgicas de tipo I y la técnica descrita puede aplicarse generalmente para producir variantes de alérgenos no reactivas con IgE.

EJEMPLO 2

Expresión y purificación de Lol p 5 recombinante y proteínas mutantes

40 Las secuencias codificadoras de Lol p 5 y las proteínas mutantes se introdujeron en marco dentro del vector de expresión pQE31 (QIAGEN). El vector permite la expresión de proteínas recombinantes con una etiqueta de 6 restos de histidina en el extremo N-terminal. La expresión y recuperación de las proteínas se llevó a cabo como se indica en el manual de expresión de QIA. Las proteínas etiquetadas con histidina se purificaron usando una resina de afinidad por metales TALON (Clontech) siguiendo el método de purificación en lote/columna de flujo por gravedad como se señala en el manual del usuario de la resina de afinidad por metales TALON (Clontech).

45 EJEMPLO 3

Gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) e inmunotransferencia

Para el PAGE-SDS se hirvieron 1,3 Fg de Lol p 5 y de cada una de las proteínas mutantes durante 5 minutos con tampón de muestra de proteínas 10x. Las muestras se cargaron en un mini gel de acrilamida al 15% p/v que se desarrolló a 200 V durante 490 minutos en tampón glicina 0,2 M, Tris 0,025 M, SDS al 0,1 % p/v.

Para la tinción, los geles se agitaron en Azul brillante de Coomassie R250 al 0,1% p/v durante al menos una hora. Los geles se destiñeron en metanol al 20% v/v, ácido acético glacial al 7% v/v, glicerol al 3% v/v durante una noche con dos cambios de tampón.

5 Los geles se transfirieron en la célula de un equipo de inmunotransferencia mini-Protean II de BIORAD en tampón Tris 0,025 M, glicina 0,2 M, metanol al 20 % v/v a una membrana de nailon Nytran 0.2 Fm (Schleicher y Schuell) a 100 V durante 1 hora a 4°C.

EJEMPLO 4

Análisis de transferencia en ranuras

10 Para el análisis de transferencia en ranuras se añadieron 0,7 Fg de proteínas mutantes y Lol p 5 en las ranuras del sistema múltiple de transferencia en ranuras Hybri-Slot (Life Technologies, Inc.) y se transfirió a la membrana de nailon Nytran 0.2 Fm (Schleider & Schuell) bajo succión a partir de vacío al agua.

EJEMPLO 5

Incubación de las transferencias con anticuerpos y sueros de pacientes

15 Antes de la incubación con anticuerpos o sueros se bloquearon todas las inmunotransferencias y transferencias en ranuras con leche descremada en polvo al 10% p/v en PBS (cloruro sódico 150 mM, fosfato sódico monobásico monohidrato 36 mM, fosfato sódico dibásico dihidrato 7 mM) durante 1 hora con agitación. Las transferencias se lavaron una vez con PBS, Tween 20 al 0,5% v/v, dos veces con PBS y se incubaron durante la noche con anticuerpos monoclonales (AcM A7: diluido 1:5), anticuerpos policlonales (B1: diluido 1:50) o sueros de pacientes. Todas las diluciones se prepararon en PBS, BSA al 0,5% p/v, azida sódica al 0,1% p/v y se agitaron con las transferencias durante la noche a temperatura ambiente. Tras lavar como se indicó anteriormente, las transferencias se incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón (AcM A7) o anti-conejo (B1) conjugados con fosfatasa alcalina diluidos 1:5000 en PBS, Tween 20 al 0,5% v/v, BSA al 1% p/v durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Todas las transferencias se lavaron como se indicó anteriormente. Los anticuerpos anti-ratón y anti-conejo unidos se detectaron mediante una reacción colorimétrica (10 ml de tampón de la fosfatasa alcalina (Tris 0,1 M, pH 9,5, cloruro sódico 0,1 M, cloruro de magnesio 0,05 M) con 66 Fl de la solución madre de BCIP (bromocloroindol fosfato al 5% p/v en dimetilformamida al 100% v/v). Las transferencias incubadas con sueros de pacientes se incubaron con anticuerpo anti-humano marcado con I^{125} como sonda (Bioclone) diluido 1:5 en PBS, Tween 20 al 0,5% v/v, BSA al 1% p/v (tampón B) durante la noche con agitación a temperatura ambiente. Todas las transferencias se lavaron como se indicó anteriormente. Tras el lavado, el anticuerpo anti-IgE humano marcado con I^{125} se detectó mediante exposición en una película Biomax MS de Kodak a -70°C.

20

25

30

EJEMPLO 6

ELISA directo

Los pocillos de una placa de ELISA (Greiner) se recubrieron con alícuotas de 50 Fl de diluciones de 100, 500, 1.000, 5.000 y 10.000 ng/ml de Lol p 5 y las cuatro proteínas mutantes, y se incubaron durante toda la noche a 4°C. A continuación, los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS y Tween 20 al 0,5% v/v. Tras el bloqueo con tampón B a temperatura ambiente durante una hora, los pocillos se lavaron de nuevo y se incubaron con 50 Fl de una dilución apropiada de suero del paciente en tampón B a 4°C durante la noche. Los pocillos se lavaron como se indica anteriormente antes de la incubación con 50 Fl de una dilución 1:2000 de anticuerpo anti-IgE humana (conjugado con fosfatasa alcalina: Sigma) en tampón B a temperatura ambiente durante una hora. Tras una serie de lavados finales, se detectó el anticuerpo anti-IgE humano unido con el sistema de micropocillos de sustrato de la fosfatasa Blue Phos (Kirkegaard & Perry Laboratories). El desarrollo de color se detectó mediante un lector de placas Spectracount a 630 nm (Packard).

35

40

Los expertos en la materia apreciarán que la invención descrita en este documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas a las específicamente descritas. Se entenderá que en la invención se incluyen todas estas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las fases, características, composiciones y compuestos referidos o indicados en esta memoria descriptiva, de forma individual o colectiva, y cualquiera o todas las combinaciones y dos o más de dichas fases o características.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The University of Melbourne
 Singh, Mohan B (solo en EE. UU.)
 Bhalla, Prem L (solo en EE. UU.)
 Swoboda, Ines (solo en EE. UU.)

<120> Reactivos inmunoterapéuticos e inmunoproliféricos

<130> 2564369/EJH

<140> Internacional
 <141> 2002-09-13

<150> AU PR7792
 <151> 2001-09-20

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> isoforma

<400> 1

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

Ala Ala Thr Pro Ala Ala Ala Gly Gly Lys Ala Thr Thr Asp Glu Gln
 20 25 30

Lys Leu Leu Glu Asp Val Asn Ala Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala
 35 40 45

Ala Ala Ala Asn Ala Pro Pro Ala Asp Lys Phe Lys Ile Phe Glu Ala
 50 55 60

Ala Phe Ser Glu Ser Ser Lys Gly Leu Leu Ala Thr Ser Ala Ala Lys
 65 70 75 80

Ala Pro Gly Leu Ile Pro Lys Leu Asp Thr Ala Tyr Asp Val Ala Tyr
 85 90 95

Lys Ala Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val
 100 105 110

Thr Ala Leu Thr Glu Ala Leu Arg Val Ile Ala Gly Ala Leu Glu Val

ES 2 436 605 T3

```

115                               120                               125

His Ala Val Lys Pro Ala Thr Glu Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile Pro
 130                               135                               140

Thr Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp Lys Ile Asp Ala Ala Phe Lys Ile
145                               150                               155                               160

Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Thr Asn Asp Lys Phe Thr Val
                               165                               170                               175

Phe Glu Ser Ala Phe Asn Lys Ala Leu Asn Glu Cys Thr Gly Gly Ala
                               180                               185                               190

Tyr Glu Thr Tyr Lys Phe Ile Pro Ser Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln
                               195                               200                               205

Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Ala Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val
 210                               215                               220

Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met Thr Gln Ala Gln
225                               230                               235                               240

Lys Ala Gly Lys Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Val
                               245                               250                               255

Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala
                               260                               265                               270

Gly Gly Tyr Lys Ala
 275

```

```

<210> 2
<211> 138
<212> PRT
<213> isoforma

```

```

<400> 2

```

```

Ala Thr Pro Ala Thr Ala Ala Thr Pro Thr Pro Ala Thr Pro Ala Thr
 1                               5                               10                               15

```

```

Pro Ala Ala Val Pro Ser Glu Ile Lys Ile Val Val Tyr Thr Val Glu
 20                               25                               30

```

ES 2 436 605 T3

Thr Gly Ala Thr Asn Phe Val Glu Gly Leu Ala Ser Gly Tyr Ala Asp
 35 40 45

Gln Ser Lys Asn Gln Thr Ser Ala Leu Lys Leu Glu Gln Tyr Ala Thr
 50 55 60

Ala Lys Val Gly Ala Ala Ala Val Leu Ile Val Arg Thr Ala Asn Thr
 65 70 75 80

Asn Ile Lys Val Ser Leu Ala Asp Ser Thr Leu Val Lys Gln Thr Thr
 85 90 95

Ser Thr Lys Val Ser Glu Glu Glu Ala Thr Thr Ala Thr Pro Thr Pro
 100 105 110

Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Pro Ala Ala Ala Tyr Thr Ala Thr
 115 120 125

Pro Ala Ala Thr Pro Ala Thr Thr Pro Val
 130 135

<210> 3
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> isoforma

<400> 3

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

Asp Ala Ala Glu Ile Lys Ile Leu Gly Gly Val Gln Tyr Arg Thr Val
 20 25 30

Thr Gly Pro Ala Asn Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly
 35 40 45

Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Thr Ser Ala Lys Leu Thr Tyr
 50 55 60

Ala Thr Ser Ile Thr Ala Lys Val Ala Val Ile Glu Val Val Ala Ala
 65 70 75 80

Asp Glu Ile Lys Ala Ser Ser Ala Thr Thr Thr Lys Ser Glu Ala Pro

ES 2 436 605 T3

85 90 95
 Pro Leu Pro Pro Pro Pro Gln Pro Pro Pro Leu Ala Gly Ala Thr Val
 100 105 110

<210> 4
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> isoforma

<400> 4

Ala Ala Gly Glu Ile Lys Ile Val Arg Gln Ala Thr Ser Pro Arg His
 1 5 10 15

Pro Arg Pro Arg Gln Gly Ala Gly Val Ser Ala Ser Val Phe Ser Ala
 20 25 30

Ser Val Pro Gly Met Ala Ile Val Ala Thr Ala Asp Ala Ile Lys Ser
 35 40 45

Asp Cys Ala Thr Ser Glu Val Ser Lys Val Gln Ala Thr Ser Gly Ala
 50 55 60

Ala Val Val
 65

<210> 5
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> isoforma

<400> 5

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

Ala Pro Ala Gly Ala Ala Pro Ile Lys Ile Gly Val Ala Val Tyr Thr
 20 25 30

Val Thr Gly Ala Ser Asn Phe Ala Glu Ala Leu Ser Thr Glu Pro Lys
 35 40 45

Gly Ala Ala Ala Ala Ser Ser Asn Ala Val Thr Ser Ala Lys Leu Ser
 50 55 60

ES 2 436 605 T3

Tyr Val Ala Thr Leu Ser Ile Thr Gly Lys Ala Ala Val Ile Val Val
65 70 75 80

Ala Ala Asp Ile Lys Ala Ser Gln Ser Ala Ser Thr Ala Thr Lys Ser
85 90 95

Ala Val Thr Ala Thr Ala Thr Gly Ala Val Gly Ala Val Gly Ala Gly
100 105 110

Tyr Lys Thr Gly Ala Ala Pro Thr Val
115 120

<210> 6
<211> 98
<212> PRT
<213> isoforma

<400> 6

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

Ala Gly Ala Ala Pro Met Ile Lys Ile Val Gly Gly Val Ala Asn Tyr
20 25 30

Thr Val Thr Gly Ala Ala Ser Asn Phe Ala Glu Ala Leu Ser Thr Glu
35 40 45

Pro Lys Gly Ala Ala Ala Asp Ser Ser Lys Ala Ala Thr Ser Ala Lys
50 55 60

Leu Ser Asp Tyr Ala Thr Ser Ile Thr Gly Ala Lys Ala Thr Ala Val
65 70 75 80

Ile Val Val Ala Ala Asp Ile Lys Ala Ser Gln Ser Ala Ser Thr Ala
85 90 95

Ala Val

<210> 7
<211> 305
<212> PRT
<213> Lol p 5

<400> 7

ES 2 436 605 T3

Met Ala Val Gln Lys Tyr Thr Val Ala Leu Phe Leu Ala Val Ala Leu
1 5 10 15

Val Ala Gly Pro Ala Ala Ser Tyr Ala Ala Asp Ala Gly Tyr Thr Pro
20 25 30

Ala Ala Ala Ala Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Thr Pro Ala Ala Ala
35 40 45

Gly Gly Lys Ala Thr Thr Asp Glu Gln Lys Leu Leu Glu Asp Val Asn
50 55 60

Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Asn Ala Pro Pro Ala
65 70 75 80

Asp Lys Phe Lys Ile Phe Glu Ala Ala Phe Ser Glu Ser Ser Lys Gly
85 90 95

Leu Leu Ala Thr Ser Ala Ala Lys Ala Pro Gly Leu Ile Pro Lys Leu
100 105 110

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

Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Thr Ala Leu Thr Glu Ala Leu Arg
130 135 140

Val Asn Leu Ala Ala Ile Ala Gly Ala Leu Glu Val His Ala Val Lys
145 150 155 160

Pro Ala Thr Glu Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile Pro Thr Gly Glu Leu
165 170 175

Gln Ile Val Asp Lys Ile Asp Ala Ala Phe Lys Ile Ala Ala Thr Ala
180 185 190

Ala Asn Ala Ala Pro Thr Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Ser Ala
195 200 205

Phe Asn Lys Ala Leu Asn Glu Cys Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Thr Tyr
210 215 220

ES 2 436 605 T3

Lys Phe Ile Pro Ser Leu Glu Ala Ala Val Lys Asp Ala Tyr Ala Ala
 225 230 235 240

Thr Val Ala Ala Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala
 245 250 255

Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met Thr Gln Ala Gln Lys Ala Gly Lys
 260 265 270

Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala Thr Gly Ala
 275 280 285

Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Lys
 290 295 300

Ala
 305

- <210> 8
- <211> 276
- <212> PRT
- <213> Variante D1 de Lol p 5
- <400> 8

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

Ala Ala Thr Pro Ala Ala Ala Gly Gly Lys Ala Thr Thr Asp Glu Gln
 20 25 30

Lys Leu Leu Glu Asp Val Asn Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala
 35 40 45

Ala Ala Asn Ala Pro Pro Ala Asp Ala Phe Lys Ile Phe Glu Ala Ala
 50 55 60

Phe Ser Glu Ser Ser Lys Gly Leu Leu Ala Thr Ser Ala Ala Lys Ala
 65 70 75 80

Pro Gly Leu Ile Pro Lys Leu Asp Thr Ala Tyr Asp Val Ala Tyr Lys
 85 90 95

Ala Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Thr
 100 105 110

ES 2 436 605 T3

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

Ala Val Lys Pro Ala Thr Glu Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile Pro Thr
 130 135 140

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

Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Thr Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe
 165 170 175

Glu Ser Ala Phe Asn Lys Ala Leu Asn Glu Cys Thr Gly Gly Ala Tyr
 180 185 190

Glu Thr Tyr Lys Phe Ile Pro Ser Leu Glu Ala Ala Val Lys Asp Ala
 195 200 205

Tyr Ala Ala Thr Val Ala Ala Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe
 210 215 220

Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met Thr Gln Ala Gln Lys
 225 230 235 240

Ala Gly Lys Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala
 245 250 255

Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly
 260 265 270

Gly Tyr Lys Ala
 275

- <210> 9
- <211> 276
- <212> PRT
- <213> Variante D2 de Lol p 5

<400> 9

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

ES 2 436 605 T3

Ala Ala Thr Pro Ala Ala Ala Gly Gly Lys Ala Thr Thr Asp Glu Gln
 20 25 30

Lys Leu Leu Glu Asp Val Asn Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala
 35 40 45

Ala Ala Asn Ala Pro Pro Ala Asp Lys Phe Lys Ile Phe Glu Ala Ala
 50 55 60

Phe Ser Glu Ser Ser Lys Gly Leu Leu Ala Thr Ser Ala Ala Lys Ala
 65 70 75 80

Pro Gly Leu Ile Pro Lys Leu Asp Thr Ala Tyr Asp Val Ala Tyr Lys
 85 90 95

Ala Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Thr
 100 105 110

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

Ala Val Lys Pro Ala Thr Glu Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile Pro Thr
 130 135 140

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

Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Thr Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe
 165 170 175

Glu Ser Ala Phe Asn Lys Ala Leu Asn Glu Cys Thr Gly Gly Ala Tyr
 180 185 190

Glu Thr Tyr Lys Phe Ile Pro Ser Leu Glu Ala Ala Val Lys Asp Ala
 195 200 205

Tyr Ala Ala Thr Val Ala Ala Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe
 210 215 220

Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met Thr Gln Ala Gln Lys
 225 230 235 240

Ala Gly Lys Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala

ES 2 436 605 T3

245 250 255

Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly
 260 265 270

Ala Tyr Ala Ala
 275

<210> 10
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> Variante D3 de Lol p 5

<400> 10

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

Ala Ala Thr Pro Ala Ala Ala Gly Gly Lys Ala Thr Thr Asp Glu Gln
 20 25 30

Lys Leu Leu Glu Asp Val Asn Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala
 35 40 45

Ala Ala Asn Ala Pro Pro Ala Asp Lys Phe Lys Ile Phe Glu Ala Ala
 50 55 60

Phe Ser Glu Ser Ser Lys Gly Leu Leu Ala Thr Ser Ala Ala Lys Ala
 65 70 75 80

Pro Gly Leu Ile Pro Lys Leu Asp Thr Ala Tyr Asp Val Ala Tyr Lys
 85 90 95

Ala Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Thr
 100 105 110

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

Ala Val Lys Pro Ala Thr Glu Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile Pro Thr
 130 135 140

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

ES 2 436 605 T3

Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Thr Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe
 165 170 175

Glu Ser Ala Phe Asn Lys Ala Leu Asn Glu Cys Thr Gly Gly Ala Tyr
 180 185 190

Glu Thr Tyr Lys Phe Ile Pro Ser Leu Glu Ala Ala Val Lys Asp Ala
 195 200 205

Tyr Ala Ala Thr Val Ala Ala Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe
 210 215 220

Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met Thr Gln Ala Gln Lys
 225 230 235 240

Ala Gly Lys Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala
 245 250 255

Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly
 260 265 270

Tyr Lys Ala
 275

- <210> 11
- <211> 276
- <212> PRT
- <213> Variante D4 de Lol p 5

<400> 11

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

Ala Ala Thr Pro Ala Ala Ala Gly Gly Lys Ala Thr Thr Asp Glu Gln
 20 25 30

Lys Leu Leu Glu Asp Val Asn Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala
 35 40 45

Ala Ala Asn Ala Pro Pro Ala Asp Lys Phe Lys Ile Phe Glu Ala Ala
 50 55 60

Phe Ser Glu Ser Ser Lys Gly Leu Leu Ala Thr Ser Ala Ala Lys Ala

ES 2 436 605 T3

```

65          70          75          80

Pro Gly Leu Ile Pro Lys Leu Asp Thr Ala Tyr Asp Val Ala Tyr Lys
           85          90          95

Ala Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Thr
           100         105         110

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

Ala Val Lys Pro Ala Thr Glu Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile Pro Thr
           130         135         140

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

Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Thr Asn Asp Asn Leu Ala Ala Phe
           165         170         175

Glu Ser Ala Phe Asn Lys Ala Leu Asn Glu Cys Thr Gly Gly Ala Tyr
           180         185         190

Glu Thr Tyr Lys Phe Ile Pro Ser Leu Glu Ala Ala Val Lys Asp Ala
           195         200         205

Tyr Ala Ala Thr Val Ala Ala Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe
210         215         220

Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met Thr Gln Ala Gln Lys
225         230         235         240

Ala Gly Lys Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala
           245         250         255

Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly
           260         265         270

Gly Tyr Lys Ala
           275

```

<210> 12

<211> 276

ES 2 436 605 T3

<212> PRT

<213> Variante D5 de Lol p 5

<400> 12

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

Ala Ala Thr Pro Ala Ala Ala Gly Gly Lys Ala Thr Thr Asp Glu Gln
20 25 30

Lys Leu Leu Glu Asp Val Asn Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala
35 40 45

Ala Ala Asn Ala Pro Pro Ala Asp Lys Phe Lys Ile Phe Glu Ala Ala
50 55 60

Phe Ser Glu Ser Ser Lys Gly Leu Leu Ala Thr Ser Ala Ala Lys Ala
65 70 75 80

Pro Gly Leu Ile Pro Lys Leu Asp Thr Ala Tyr Asp Val Ala Tyr Lys
85 90 95

Ala Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Thr
100 105 110

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

Ala Val Lys Pro Ala Thr Glu Glu Val Pro Ala Ala Lys Ile Pro Thr
130 135 140

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

Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Thr Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe
165 170 175

Glu Ser Ala Phe Asn Lys Ala Leu Asn Glu Cys Thr Gly Gly Ala Tyr
180 185 190

Glu Thr Tyr Lys Phe Ile Pro Ser Leu Glu Ala Gly Ala Ala Asp Ala
195 200 205

ES 2 436 605 T3

Tyr Ala Ala Thr Val Ala Ala Ala Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe
 210 215 220

Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met Thr Gln Ala Gln Lys
 225 230 235 240

Ala Gly Lys Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala
 245 250 255

Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly
 260 265 270

Gly Tyr Lys Ala
 275

<210> 13
 <211> 24
 <212> **ADN**
 <213> **secuencia artificial**

<220>
 <223> **cebador sentido para D1**

<400> 13
 cctccggcgg acgcgttcaa gatc 24

<210> 14
 <211> 24
 <212> **ADN**
 <213> **secuencia artificial**

<220>
 <223> **cebador complementario para D1**

<400> 14
 gatcttgaac gcgtccgccg gagg 24

<210> 15
 <211> 29
 <212> **ADN**
 <213> **secuencia artificial**

<220>
 <223> **cebador sentido para D2**

<400> 15
 gctgctggtg cctacgcagc ctgatcagc 29

<210> 16

ES 2 436 605 T3

<211> 29
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador complementario para D2

 <400> 16
 gctgatcagg ctgcgtaggc accagcagc 29

<210> 17
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador sentido para D3

 <400> 17
 ccaccgccgc tgcttgaggc tacaagc 28

<210> 18
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador complementario para D4

 <400> 18
 gctttgtagc ctcaagcagc ggcggtgg 28

<210> 19
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador sentido para D5

 <400> 19
 ccaccaacga taacttgcc gccttcgaga gtgc 34

<210> 20
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador complementario para D5

 <400> 20
 gcactctcga aggcggccaa gttatcgttg gtgg 34

<210> 21
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> sequència artificial

<220>
 <223> cebador sentido para D6

<400> 21
 cctcgaggcc ggggccgcgc aggcctac 28

<210> 22
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> sequencia artificial

<220>
 <223> cebador complementario para D5

<400> 22
 cgtaggcctg cgcggccccg gcctcgagg 29

BIBLIOGRAFÍA

- Bond, J.F, Segal, D.B, Yu X-B, Theriault, K.A, Pollock, M.S, Yeung H. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91: 339, 1993.
- Baldari *et al.*, *EMBO J.* 6: 229-234, 1989.
- 5 Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495-499, 1975.
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519, 1976.
- Kurjan and Herskowitz, *Cell* 30: 933-943, 1982.
- Miyamoto T: *Advances in Allergology and Clinical Immunology.* Godard P, Bousquet J, Michel FB (eds) pp. 343-347. The Parthenon Publishing Group, Comforth, UK, 1992.
- 10 Ong, E.K, Griffith, I.J., Knox, R.B., Singh, M.B. *Gene* 134: 235-240, 1993.
- Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Schultz *et al.*, *Gene* 54: 113-123, 1987.
- Singh, M.B., Hough, T., Theerakulpisut, P., Avjioglu, A., Davies, S., Smith, P.M., Taylor, P., Simpson, R.J., Ward. L.D., McCluskey, J., Puy, R., Knox, R.B. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88: 1384-1388, 1991.
- Smart, I.J., Heddle, R.J., Zola, H., Bradley, J., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 72: 243-248, 1983.
- Smith, P.M., Ong, E.K, Avjioglu, A., Singh, M.B., Knox, R.B. Analysis of rye-grass pollen allergens using two dimensional electrophoresis and immunoblotting. In Kraft D (ed), *Molecular Biology and Immunology of Allergens*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.
- 20 Smith, P.M., Ong, E.K., Knox, R.B., Singh, M.B. *Mol. Immunol.* 31: 491-498, 1994.
- Wuthrich, B., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 90: 3-10, 1989.

REIVINDICACIONES

1. Una variante recombinante del alergeno proteico Lol p 5 compuesta por las secuencias de aminoácidos de SEC ID N.º 1 portadoras de las mutaciones seleccionadas entre el grupo compuesto por:
- a) K172N, F173L, T174A y V175A (mut 4),
 - 5 b) K57A, G273A, K275A, K172N, F173L, T174A y V175A (mut 6) y
 - c) K57A, ΔG272, K172A, F173L, T174A y V175A (mut 8).
2. La variante recombinante del alergeno de la reivindicación 1, que comprende un número de reducido de epítopes IgE y/o muestra una reducción en la capacidad de unión a IgE y/o muestra una reducción de la estimulación de producción de IgE manteniendo la antigenicidad para células T.
- 10 3. La variante recombinante del alergeno de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho alergeno proteico en forma natural se asocia con una enfermedad alérgica de tipo I en sujetos sensibilizados.
4. La variante recombinante del alergeno de la reivindicación 3, en la que la enfermedad alérgica de tipo I es sensibilidad al polen de ballico.
- 15 5. La variante recombinante del alergeno de la reivindicación 3, en la que dicho sujeto sensibilizado es un ser humano, un primate, ganado, animal de experimentación o animal de compañía.
6. La variante recombinante del alergeno de la reivindicación 5, en la que dicho sujeto sensibilizado es un ser humano.
7. Una composición que comprende una variante recombinante del alergeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 20 8. Una variante recombinante del alergeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en un método de tratamiento del cuerpo del ser humano o del animal mediante terapia.
9. Uso de una variante recombinante del alergeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la producción de un medicamento para su uso en un método para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad alérgica.

Lol p 5 A	ADAGYTPAAAATPATPAATPAAA-----GGKATTDQKLLLEDVN	[SEC ID N.º:1]
Lol p 5 B	****A**TP****A**TAATP*TPATPATPAAVPS*****E****I*KI*	[SEC ID N.º:2]
Ph1 p 5 A	**L**G**TP*---**GYTP*TPAAPAGADAA--*****E****I*KI*	[SEC ID N.º:3]
Ph1 p 5 B	*****---A*****AG*****-----*****E****I*KI*	[SEC ID N.º:4]
Poa p 5 (41)	**V**GAP*TL--*****TP***PAAGYTPAAPAGAAP*****I*KI*	[SEC ID N.º:5]
Poa p 5 (60)	**LS*GAP*T-----**PAAGYTPAAPAGAAP*****MI*KI*	[SEC ID N.º:6]
Lol p 5 A	AGFKAAVAANAAPPADKFKIFEAAFSESSKGLLATSAAKAPG-----	[SEC ID N.º:1]
Lol p 5 B	*****V*****Y*T*VET*G-----*ATN**FVEGLASGYA	[SEC ID N.º:2]
Ph1 p 5 A	*****L*G*GVQ-***YRT*V*T*GPA*-----N**FAEGLSPEPK	[SEC ID N.º:3]
Ph1 p 5 B	V*****R--Q*A*****T***SPRHRP*ROGAG-----	[SEC ID N.º:4]
Poa p 5 (41)	V*****GV*AV*Y*T*V*T*G-----*ASN**FAEALSTEPK	[SEC ID N.º:5]
Poa p 5 (60)	V*****GGV*A*N*Y*T*V*T*G-----AASN**FAEALSTEPK	[SEC ID N.º:6]
Lol p 5 A	-----LIPKLDTAVDVAYKAAEGATPEAKYDAFVTALTEALRVIAG	[SEC ID N.º:1]
Lol p 5 B	---DQSKNQ*TS**A*LKL**E**Q*****Y*AT*****I***	[SEC ID N.º:2]
Ph1 p 5 A	GAAESSKAA*TS**A**KL**T*****Y*AT*S****I***	[SEC ID N.º:3]
Ph1 p 5 B	-----*VS**A**S*****V*****F*S**AS*****I***	[SEC ID N.º:4]
Poa p 5 (41)	GAAAASSNAV*TS**A**KL**S*****YVATLS*****I***	[SEC ID N.º:5]
Poa p 5 (60)	GAAADSSKAA*TS**A**KL**S*****DY*AT*S****I***	[SEC ID N.º:6]
Lol p 5 A	ALEHVAVKPATEEVPAAKIPTGELQIVDKIDAFAFKIAATAANAAPTNDKFT	[SEC ID N.º:1]
Lol p 5 B	T*****A**KVGA**AA*V*LI**V***YRT*****A*****	[SEC ID N.º:2]
Ph1 p 5 A	T*****A**KV---**A**VIE*V*****V*****A*****	[SEC ID N.º:3]
Ph1 p 5 B	V*****V***PGM***A****I*****V*****AT**AD****	[SEC ID N.º:4]
Poa p 5 (41)	T*****G***K--A**A****VI**V*****V*****A*****	[SEC ID N.º:5]
Poa p 5 (60)	T***G***A***K--AT*A****VI**V*****V*****A*****	[SEC ID N.º:6]

Figura 1

Lol p 5 A	VFESAFNKALNECTGGAYETYKFI	PSLEAAVKQAYAAATVAAAPVKYAVFE	[SEC ID N.º:1]
Lol p 5 B	***NT**N*IKVSL*A**DS***TLV***	*****KQ*T*****T*S*	[SEC ID N.º:2]
Ph1 p 5 A	***A***DEIKAS***S***A***	*****T*****T***	[SEC ID N.º:3]
Ph1 p 5 B	***A***IK*S***D***C***	*****A*****T***	[SEC ID N.º:4]
Poa p 5 (41)	***A***D*IKAS***Q***S***	*****T**A*****	[SEC ID N.º:5]
Poa p 5 (60)	***A***D*IKAS***Q***S***	*****T**A*****	[SEC ID N.º:6]
Lol p 5 A	AALTKAITAMTQAQKAGKPA	AAA-----ATGAATVAT	[SEC ID N.º:1]
Lol p 5 B	T**K**V**SE**E**EAT***	TATPTPAAATATATPAAAY*TATPAA**	[SEC ID N.º:2]
Ph1 p 5 A	T**K**SE***A**PPLPPPP	PPPL-----	[SEC ID N.º:3]
Ph1 p 5 B	*****SEV*SKVQ*-----	*****A	[SEC ID N.º:4]
Poa p 5 (41)	T**K**S***S***A***V-----	TATATGAVGA***VGA**	[SEC ID N.º:5]
Poa p 5 (60)	T**K**S***S***A***-----	TGTATAAVGA*****	[SEC ID N.º:6]
Lol p 5 A	GAATAAAGAA-----	TAAAGGYKA	[SEC ID N.º:1]
Lol p 5 B	*T**P**A*T*-----	TP*****V	[SEC ID N.º:2]
Ph1 p 5 A	-----*AG*-----	A***T***V	[SEC ID N.º:3]
Ph1 p 5 B	***T***-SGAA*V***	***V	[SEC ID N.º:4]
Poa p 5 (41)	*****GYKTGAA*PT***	***V	[SEC ID N.º:5]
Poa p 5 (60)	-----*A***	***V	[SEC ID N.º:6]

Figura 1 (continuación)

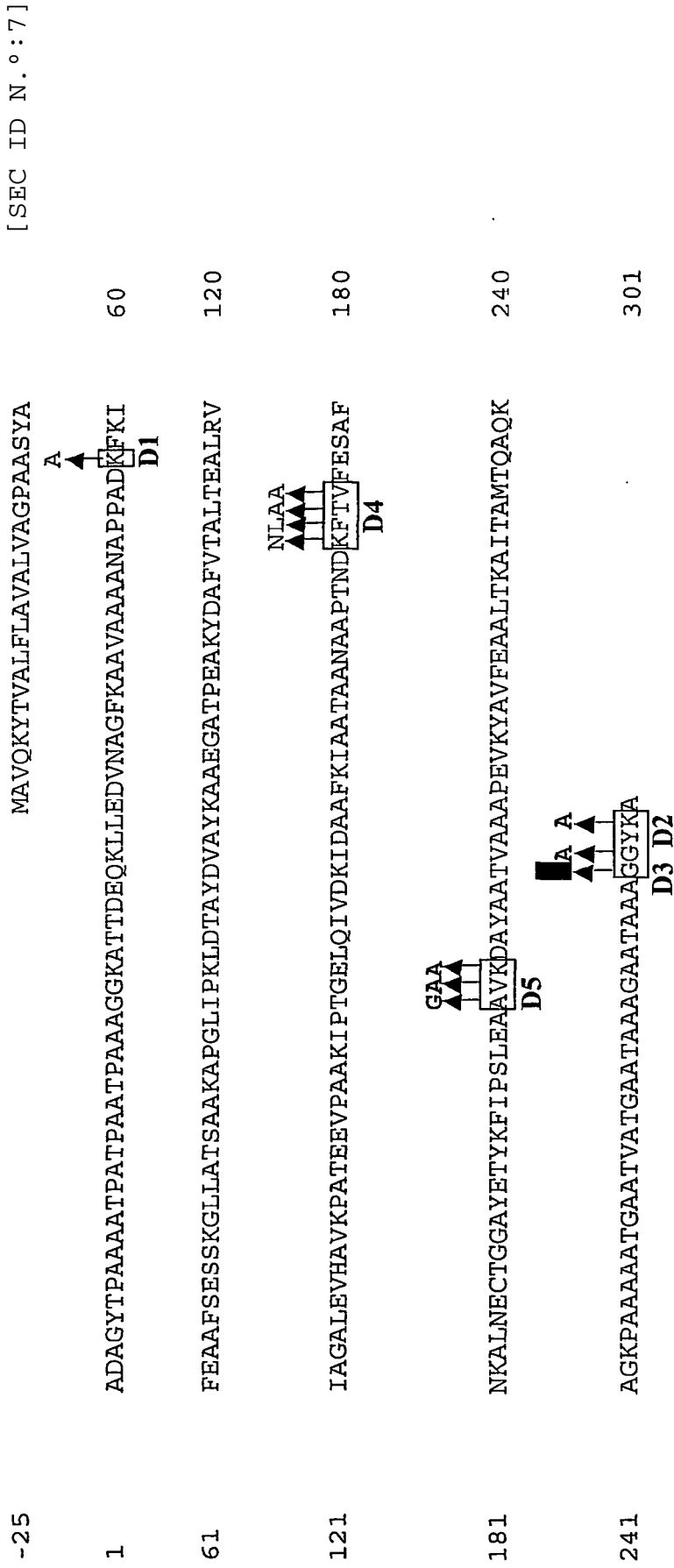


Figura 2

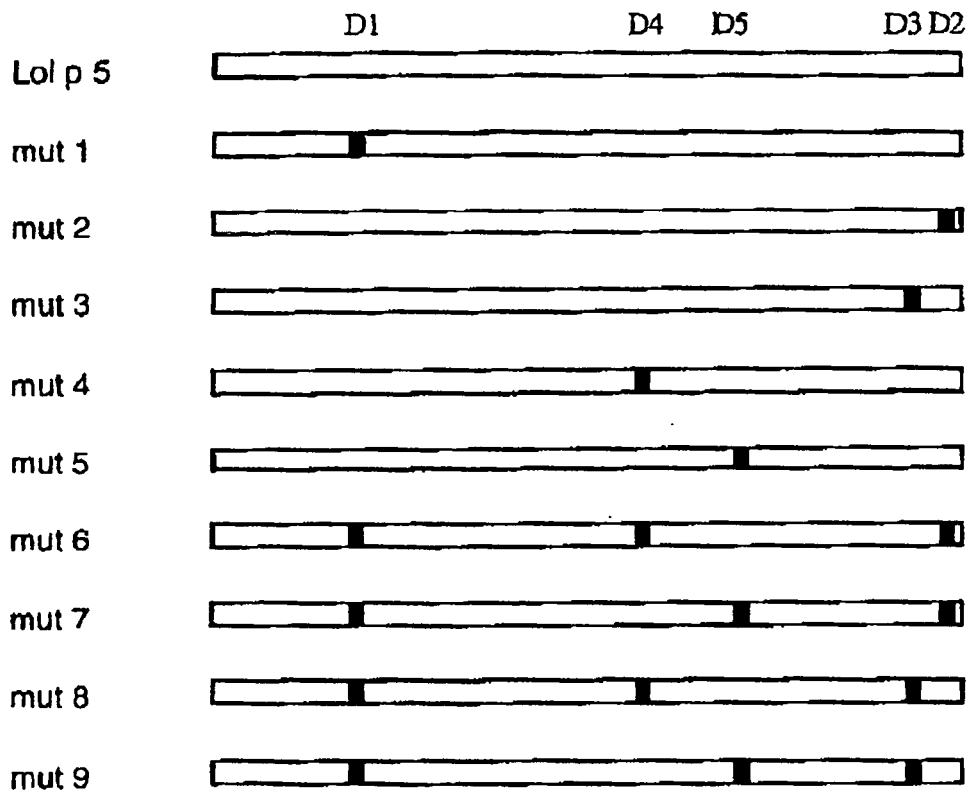


Figura 3

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')
D1 sent	CCTCCGGCGGACGCGTTCAAGATC [SEC ID N.º:13]
D1 comp	GATCTTGAACGCGTCCGCCGGAGG [SEC ID N.º:14]
D2 sent	GCTGCTGGTGCCTACGCAGCCTGATCAGC [SEC ID N.º:15]
D2 comp	GCTGATCAGGCTGCGTAGGCACCAGCAGC [SEC ID N.º:16]
D3 sent	CCACCGCCGCTGCTTGAGGCTACAAAGC [SEC ID N.º:17]
D3 comp	GCTTTGTAGCCTCAAGCAGCGGCGGTGG [SEC ID N.º:18]
D4 sent	CCACCAACGATAACTTGGCCGCCTTCGAGAGTGC [SEC ID N.º:19]
D4 comp	GCACTCTCGAAGGCGGCCAAGTTATCGTTGGTGG [SEC ID N.º:20]
D5 sent	CCTCGAGGCCGGGGCCGCGCAGGCCTACG [SEC ID N.º:21]
D5 comp	CGTAGGCCTGCGCGGCCCGGCCTCGAGG[SEC ID N.º:22]

Figura 4

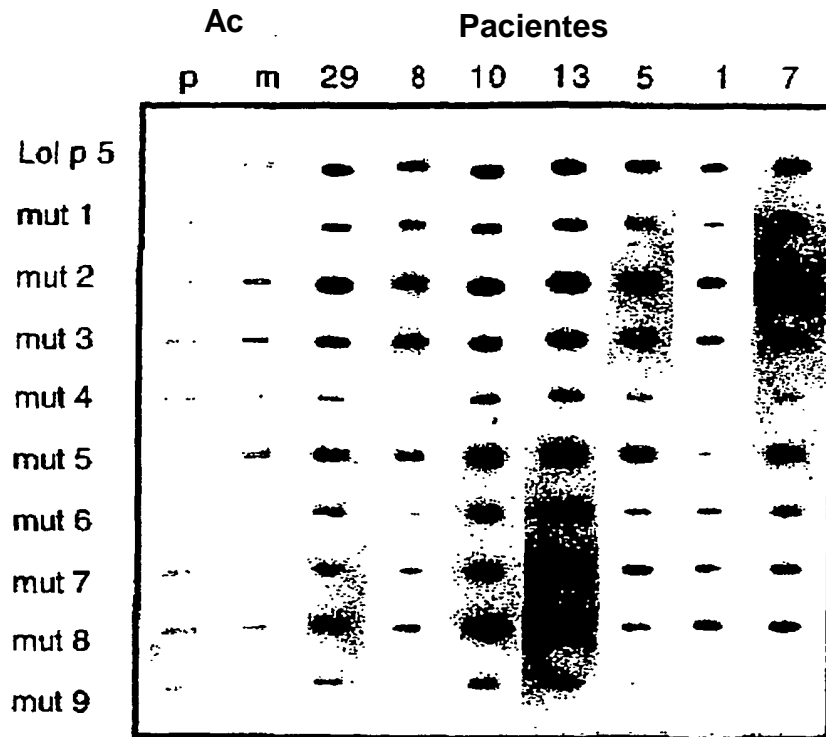


Figura 5

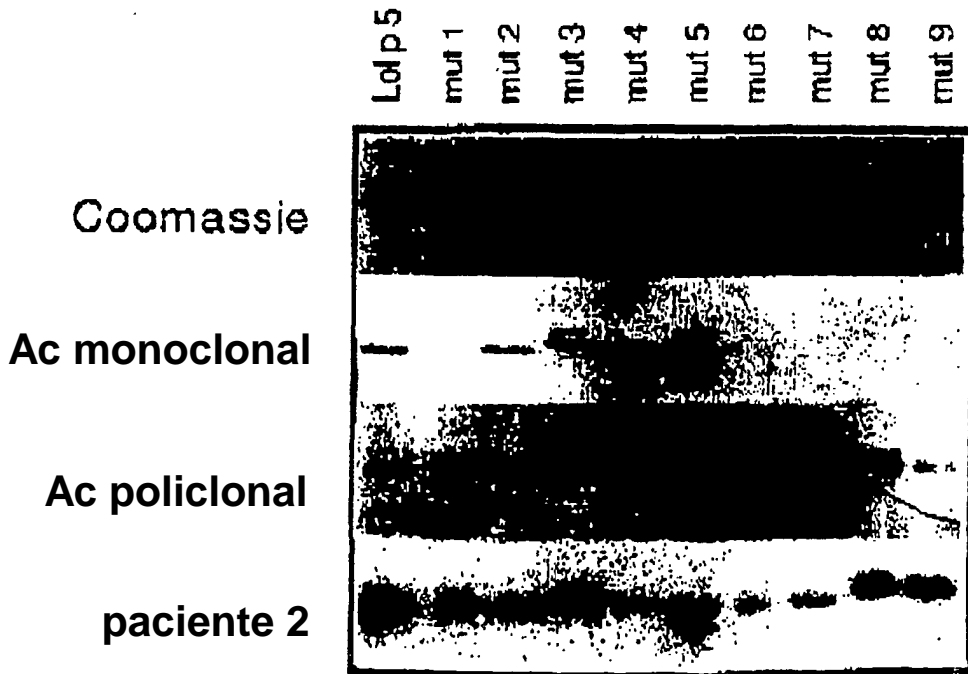


Figura 6

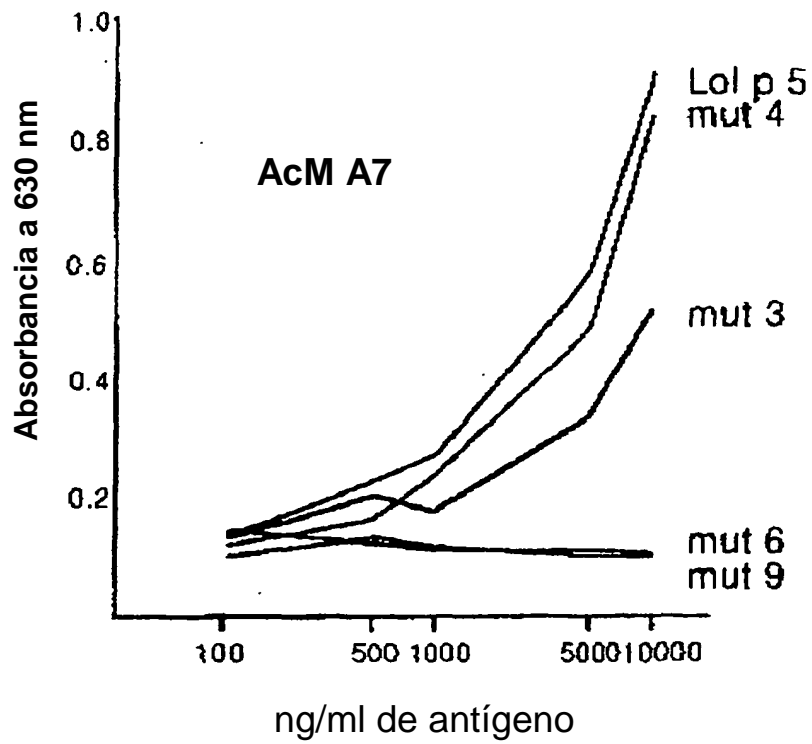


Figura 7A

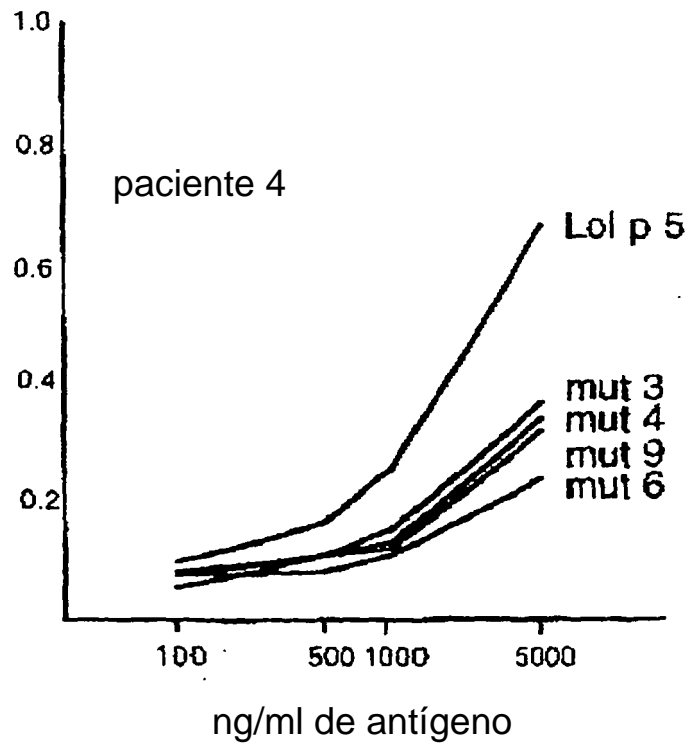


Figura 7B

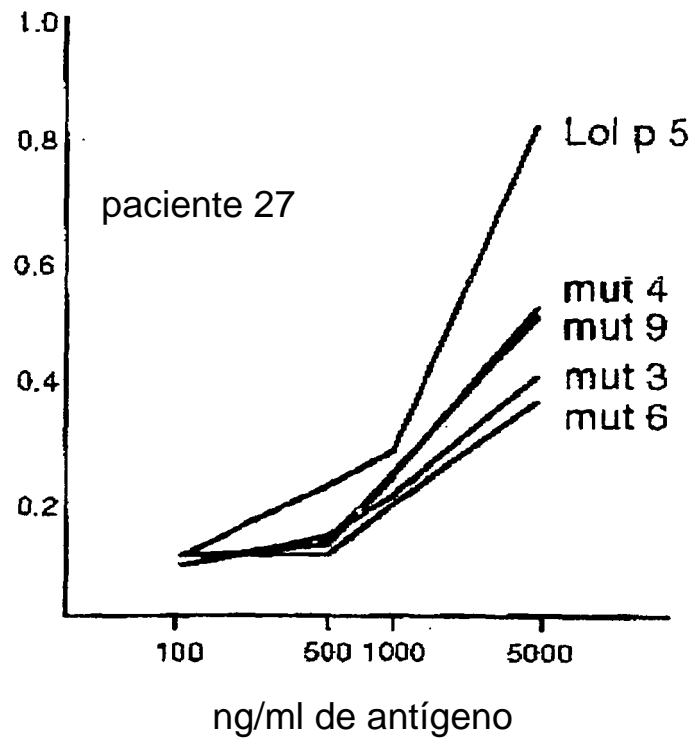


Figura 7C