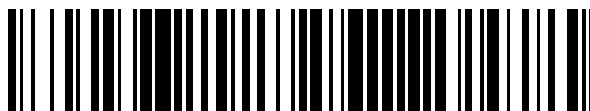


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 217**

51 Int. Cl.:

A61K 39/36 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2006** **E 09175143 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013** **EP 2172215**

54 Título: **Variantes hipoalergénicas del alérgeno principal del polen de betula verrucosa**

30 Prioridad:

29.12.2005 IT MI20052517

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.02.2014

73 Titular/es:

**LOFARMA S.P.A. (100.0%)
VIALE CASSALA, 40
20143 MILANO, IT**

72 Inventor/es:

**MISTRELLO, GIOVANNI;
ZANOTTA, STEFANIA;
RONCAROLO, DANIELA y
FALAGIANI, PAOLO**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 441 217 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes hipoalergénicas del alérgeno principal del polen de *betula verrucosa*.

- 5 La presente invención proporciona variantes de secuencia hipoalergénicas de la proteína Bet v 1, moléculas de ácido nucleico que codifican las mismas, composiciones farmacéuticas que contienen las mismas y su uso en la profilaxis y la terapia de enfermedades alérgicas provocadas por el polen de las plantas de la especie *Betula verrucosa*.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las alergias son provocadas por una disfunción del sistema inmunitario, que reacciona contra las proteínas inocuas contenidas en el polen, los ácaros, epitelios y ciertos alimentos produciendo anticuerpos de la clase IgE.

- 15 Datos recientes indican que más del 10% de la población en los países occidentales padece esta enfermedad, cuyos síntomas pueden deteriorarse con el tiempo y dar lugar a, por ejemplo, asma o una sensibilización a otros alérgenos haciendo así más difícil la elección de la terapia adecuada.

- 20 La inmunoterapia hiposensibilizante específica, a diferencia de la terapia farmacológica, es el único tratamiento etiológico de enfermedades alérgicas que puede cambiar favorablemente los parámetros inmunológicos en los que se basan estas enfermedades.

- 25 La inmunoterapia hiposensibilizante consiste en la administración de dosis crecientes de extractos normalizados (vacunas) obtenidos a partir de la misma sustancia que provoca la enfermedad (1). De este modo, una especie de tolerancia inmunológica a dicha sustancia se induce gradualmente en el paciente con la posterior desaparición de los síntomas alérgicos.

- 30 Sin embargo, el riesgo de provocar efectos secundarios graves (2), aunque marcadamente reducidos con el uso de vacunas de liberación lenta o vacunas administradas a través de vías alternativas a las inyecciones, ha limitado de hecho la aplicación de la inmunoterapia hiposensibilizante específica en el tratamiento de enfermedades alérgicas.

- 35 En los últimos años, la mayor parte de la atención se ha centrado en el desarrollo de vacunas eficaces, más seguras. En particular, el desarrollo de vacunas que consisten en proteínas recombinantes mutagenizadas, es decir, variantes hipoalergénicas capaces de influir favorablemente en el progreso natural de la enfermedad sin provocar efectos secundarios no deseados (3), ha representado un objetivo importante.

- 40 El polen de plantas conocidas taxonómicamente como *Fagales* (abedul, aliso, avellano, roble, carpe) es una de las causas más importantes de rinitis alérgica y asma en las regiones templadas. Los dos alérgenos principales del polen del abedul, Bet v 1 (ADNc depositado en GenBank con el núm. de acceso X15877) y Bet v 2 (núm. de acceso M65179) son proteínas con un peso molecular de 17 y 14 kD, respectivamente (4, 5). Cerca del 95% de los pacientes con alergia al polen del abedul producen anticuerpos IgE contra Bet v 1 y el 60% de estos pacientes muestran reactividad contra Bet v 1 solo (6).

- 45 Bet v 1 está presente de manera natural en más de diez isoformas que muestran una identidad de secuencia comprendida entre 84,4% y 99,4% (7). Este alérgeno pertenece a la familia de las "proteínas relacionadas con la patogénesis", es decir, proteínas ubicuas producidas por plantas en respuesta al estrés patológico o ambiental, donde se supone que sus funciones están relacionadas con el transporte de esteroides (8,9). La alta homología de secuencia con los alérgenos del grupo 1 en el polen de otras plantas del orden *Fagales* explica por qué los pacientes con IgE específicas para Bet v 1 muestran síntomas alérgicos durante la temporada de polinización de diferentes plantas que pertenecen al mismo orden taxonómico (10). La alergia al polen del abedul se acompaña frecuentemente de reacciones adversas provocadas por la ingesta de frutas (por ejemplo, cereza, manzana, pera) o vegetales (por ejemplo, apio y zanahoria) frescas. La razón es que tales alimentos contienen proteínas caracterizadas por una alta homología de estructura y secuencia con Bet v 1, que son reconocidas por IgE específicas producidas por el alérgeno principal del abedul (11). La inmunoterapia con el alérgeno Bet v 1 puede ser eficaz en el tratamiento de la alergia al polen del abedul así como la polinosis a otras plantas del orden *Fagales* y la alergia a alimentos que contienen alérgenos que reaccionan de manera cruzada con Bet v 1 (12).

- 55 Un factor que se correlaciona con los efectos beneficiosos de la inmunoterapia hiposensibilizante es la inducción de anticuerpos IgG específicos para el alérgeno sensibilizante. Tales anticuerpos (protectores) pueden inhibir la unión de IgE al antígeno, específicamente a Bet v 1, alterando la conformación tridimensional de esta molécula (13, 14). El desarrollo de vacunas que consisten en proteínas recombinantes que poseen menos alergenidad y propiedades inmunogénicas inalteradas podría mejorar la terapia de enfermedades alérgicas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 65 Se ha encontrado ahora que sustituyendo o eliminando uno o más residuos de aminoácido dentro de la secuencia de proteína del alérgeno Bet v 1, éste se hace menos reactivo contra a los anticuerpos IgE.

En un primer aspecto, la invención proporciona una proteína hipoalergénica que es una variante de secuencia del alérgeno Bet v 1, caracterizada por:

mostrar una actividad reducida contra IgE en comparación con el alérgeno Bet v 1 silvestre (SEQ ID NO:1);

2) tener una secuencia de aminoácidos que:

es al menos 87%, preferentemente al menos 94%, más preferentemente al menos 97% idéntica a SEQ ID NO:1;

en una alineación de secuencia con SEQ ID NO: 1, presenta una sustitución o eliminación del residuo de Lys correspondiente a al aminoácido 54 de SEQ ID NO:1.

Se prefieren variantes de sustitución en vez de eliminación, especialmente aquellas en las que el residuo de Lys en las posiciones indicadas se sustituye por un aminoácido neutro o polar. Más preferentemente, dicho aminoácido neutro o polar se selecciona de Ala, Thr, Gly, Pro, Leu, Ile, Ser, Phe, aún más preferentemente de Ala, Thr y Ser.

En una realización preferida, la proteína hipoalergénica consiste en SEQ ID NO:2.

Las variantes de sustitución y/o eliminación del alérgeno Bet v 1 de acuerdo con esta invención, en comparación con su contraparte silvestre, muestran una reducción de la reactividad de IgE de al menos 25%, preferentemente al menos 50%, más preferentemente al menos 80%, contra el suero de pacientes alérgicos al polen de *Betula verrucosa*.

La reactividad de IgE de la proteína SEQ ID NO:2 de un conjunto de sueros de pacientes alérgicos se sometió a prueba en un ensayo ELISA (figura 1). En comparación con el alérgeno Bet v 1 silvestre (SEQ ID NO:1), se observó una reducción media de 56% de la reactividad de IgE con SEQ ID NO: 2, cuando se incubó esta proteína con varias diluciones (de 1:2 a 1:8) de conjuntos de suero de pacientes alérgicos al polen del abedul.

Estos resultados se confirmaron por experimentos de inhibición ELISA, que permiten evaluar la reactividad de epítomos homólogos de diferentes proteínas. Estos resultados indican claramente que las sustituciones del aminoácido en la posición 54 de SEQ ID NO:1 disminuye el reconocimiento del alérgeno Bet v 1 por IgE.

Además, la reactividad de las proteínas de SEQ ID NO:2 contra IgE de un conjunto de suero positivo para polen de *Betula verrucosa* se sometió a ensayo por inmunotransferencia de tipo Western. También en este caso, se observó una reducción de la reactividad de IgE en el suero analizado, que, en comparación con Bet v 1 (SEQ ID NO:1), era de 88% para SEQ ID NO:2.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un péptido inmunológicamente activo correspondiente a un fragmento de Bet v 1 que contiene de 15 a 35, más preferentemente de 15 a 20 residuos de aminoácido y que porta las sustituciones y/o eliminaciones descritas anteriormente. Como se usa en la presente descripción, la expresión "péptido inmunológicamente activo" indica un péptido que es capaz de provocar una respuesta inmune dependiente de IgE.

De acuerdo con la invención pueden prepararse fácilmente variantes de sustitución y/o eliminación mediante mutagénesis de la secuencia de ADNc de Bet v 1 (SEQ ID NO:6) usando métodos y técnicas conocidos por cualquier experto en la técnica.

Las secuencias de ADNc que codifican para las variantes de sustitución única SEQ ID NO:2 se identifica en SEQ ID NO:7.

En otros aspectos, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína Bet v 1 hipoalergénica descrita en la presente descripción, o un péptido derivado de la misma, y un vector de expresión que contiene dicha molécula de ácido nucleico funcionalmente unida a elementos genéticos que controlan la expresión de dicha proteína o péptido en células eucariotas o procariotas; tales como promotores de la transcripción, potenciadores, secuencias señal y líder u otras secuencias involucradas en la regulación de la transcripción. Los ejemplos de vectores incluyen plásmidos, virus y fagos aunque puede emplearse también cualquier otro vector que se utilice comúnmente en ingeniería genética.

La invención comprende además una célula huésped procariota o eucariota que se transforma o transfecta con un vector tal como se describió anteriormente. Las células procariotas tales como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, o células eucariotas tales como *Saccharomyces cerevisiae* se usan generalmente para la clonación del vector y la expresión de ADNc.

Además, las variantes hipoalergénicas de acuerdo con la invención pueden producirse como proteínas de fusión.

Gracias a su reactividad de IgE reducida, las variantes de Bet v 1 de acuerdo con la presente invención pueden usarse de convenientemente para la preparación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, comprimidos y cápsulas) para el tratamiento preventivo o terapéutico de individuos alérgicos al polen de *Betula verrucosa*.

En un aspecto adicional, la invención se refiere por tanto a una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de variante de Bet v 1 hipoalergénica tal como se proporciona en la presente invención, opcionalmente en combinación con otros alérgenos de *Betula verrucosa* y/o con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida de la invención, la composición farmacéutica está en forma de una vacuna para usar en la profilaxis o la terapia de enfermedades alérgicas, que incluyen asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis alérgica y conjuntivitis alérgica. La teoría y práctica de la vacunación son conocidas por cualquier experto en la técnica (15, 16).

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención. A menos que se indique lo contrario, los métodos usados en los ejemplos se describen en Sambrook, Fritsch ET Maniatis "Molecular cloning. A laboratory manual" II ed. Vol. 1-2-3 CSH Lab Press 1989.

EJEMPLO 1 - Mutagénesis específica de sitio del ADNc que codifica para el alérgeno Bet v 1

La mutagénesis específica de sitio del ADNc que codifica para el alérgeno Bet v 1 (SEQ ID NO: 6) se llevó a cabo por clonación de ADNc en un vector procariota (pBluescript, núm. de acceso de GenBank X52327) seguido por amplificación por PCR. Los oligonucleótidos usados como cebadores en la reacción de PCR (Tabla) realizaron las sustituciones de bases adecuadas. Para cada mutagénesis, se usó un oligonucleótido complementario que se unía a una región correspondiente de la hebra de ADN (17). Después de la amplificación, el molde original inalterado se degradó selectivamente con digestión enzimática catalizada por la enzima de restricción DpnI. Las células de *Escherichia coli* se transformaron después con las moléculas mutagenizadas. Los clones obtenidos de colonias bacterianas individuales se secuenciaron de acuerdo con Sanger para determinar la modificación de bases correcta y la ausencia de mutaciones no específicas en el ADNc.

Tabla. Secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores en la mutagénesis específica de sitio. Las bases mutadas están en negrita.

Oligonucleótido	Secuencia
Bet v 1 54	cct gga acc att g cg aag atc agc ttt ccc

EJEMPLO 2 - Producción de proteína Bet v 1 y variantes de la misma

El ADNc de Bet v 1 silvestre (SEQ ID NO. 6) y mutagenizados (SEQ ID N. 7-10), flanqueados por una secuencia que codifica para seis histidinas, se clonaron y expresaron en *Escherichia coli* de acuerdo con los protocolos convencionales (18, 19). Las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en tampón NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8, y se lisaron por sonicación. Las proteínas recombinantes se separaron por centrifugación. El sedimento que contenía un agregado de proteína insoluble se suspendió nuevamente en NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, urea 8 M (pH 8) (tampón de desnaturalización) y se agitó durante 60 min. Las proteínas recombinantes solubilizadas se separaron de los desechos insolubles por centrifugación y se purificaron mediante cromatografía de afinidad bajo condiciones de desnaturalización usando columnas de agarosa unidas a ácido nitriloacético, el cual quela los iones níquel que interaccionan con la porción de seis histidinas fusionada al alérgeno. Las proteínas purificadas se plegaron nuevamente por diálisis durante 16 horas a 4°C en solución de NaCl al 0,68%, NaHCO₃ al 0,275%.

EJEMPLO 3 - Características del suero de sujetos alérgicos

El suero de individuos con anamnesis clínica de alergia estacional a polen de *Betula verrucosa* y una reactividad específica RAST 4+ frente a alérgenos de *B. verrucosa* se recogió y entonces se agrupó. Se usó como control negativo un conjunto de sueros de pacientes no alérgicos.

EJEMPLO 4 - Análisis ELISA de la reactividad de variantes de Bet v 1 contra IgE de un conjunto de suero

La misma cantidad de alérgeno silvestre y de variantes mutagenizadas (0,5 µg) en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, se adsorbió en pocillos de placas de poliestireno para el ensayo ELISA por incubación a 4°C durante 16 horas. Los pocillos se lavaron con solución de lavado (tampón fosfato 60 mM, pH 6,5, que contenía 0,05% de Tween-20) y se bloquearon con solución de dilución (25% de suero de caballo, EDTA 1 mM, 0,05% de Tween-20, 0,01% de tiomersal en tampón fosfato 150 mM, pH 7,4). Alícuotas de 100 µl de diluciones en serie (en tampón de dilución) de un conjunto de sueros humanos RAST 4+ se añadieron a cada muestra y se incubaron a 25°C durante 2 horas. Después de tres lavados, se añadió suero anti-IgE humana conjugado con peroxidasa (1:1500 en tampón de dilución), seguido por incubación a 25°C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, la reacción colorimétrica se desarrolló al añadir 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e incubando durante 15 minutos.

a 25°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de HCl 1 N y se leyó a 450 nm usando un espectrofotómetro lector de microplacas.

EJEMPLO 5 - Ensayo ELISA de inhibición. Inhibición por variantes de Bet v 1 de la unión de Bet v 1 silvestre a IgE de conjuntos de suero

Alícuotas de 1 µg de alérgeno silvestre en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, se adsorbieron en pocillos de placas de poliestireno para el ensayo ELISA por incubación a 4°C durante 16 horas. Los pocillos se lavaron con solución de lavado (tampón fosfato 60 mM, pH 6,5, que contenía 0,05% de Tween-20) y se bloquearon con tampón de dilución (25% de suero de caballo, EDTA 1 mM, 0,05% de Tween 20, 0,01% de tiomersal en tampón fosfato 150 mM, pH 7,4). Alícuotas de 100 µl de un conjunto de sueros humanos RAST 4+ diluidos 1:3 en tampón de dilución se incubaron previamente a 25°C durante 2 horas con diluciones en serie de alérgeno silvestre y de variante mutagenizada. La solución obtenida en los pocillos se colocó e incubó a 4°C durante 16 horas. Después de tres lavados con tampón fosfato 0,06 M pH 6,5, 0,05% de Tween-20, se añadió suero anti-IgE humana conjugado con peroxidasa a una dilución 1:1500 (en tampón de dilución), seguido por incubación a 25°C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, la reacción colorimétrica se desarrolló al añadir 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e incubando a 25°C durante 15 minutos. La reacción se detuvo al añadir 100 µl de HCl 1 N seguido por la lectura espectrofotométrica a 450 nm.

El porcentaje de inhibición se calculó como sigue: $100 \times [(A-B)/A]$, en donde A es la absorbancia a 450 nm en ausencia de inhibidor mientras que B es la absorbancia en presencia de inhibidor.

EJEMPLO 6 - Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la reactividad de variantes de Bet v 1 contra a IgE de un conjunto de sueros

Cantidades iguales de alérgeno silvestre y formas mutagenizadas (1,5 µg) se analizaron electroforéticamente en gel de poliacrilamida seguido por electrotransferencia sobre membrana de nitrocelulosa, tal como se describe por Towbin (20).

La membrana se incubó primero por una hora en TBST (TBS, 0,05% de Tween-20) que contenía 5% de leche en polvo desnatada (tampón de saturación) y se incubó después durante la noche con un conjunto de sueros de sujetos alérgicos a *Betula verrucosa* que mostraban una reactividad 4+, diluidos 1:3 en TBST con 2% de leche en polvo desnatada. Después de 1 h de incubación, la membrana se lavó tres veces con TBST. Los anticuerpos unidos a la membrana se pusieron en contacto con suero anti-IgE humana conjugado con peroxidasa y, después de varios lavados, se detectaron con el sistema de detección de quimioluminiscencia usando luminol como sustrato de la peroxidasa (ECL, Amersham).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Análisis ELISA de la reactividad de IgE contra el alérgeno Bet v 1 y frente a variantes hipoalergénicas de Bet v 1;

Figura 2: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la reactividad de IgE contra al alérgeno Bet v 1 y variantes del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Malling H.J., (1998) "Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment". *Allergy*, 53: 461.
- 2) Toubi E., Kessel A., Blant A., Golan T.D., (1999) "Follow-up after systemic adverse reactions of immunotherapy". *Allergy*, 54(6): 617-620.
- 5 3) Akdis C.A., Blaser K., (2000) "Regulation of specific immune response by chemical and structural modifications of allergens". *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 121(4): 261-269.
- 4) Breiteneder H., Pettenburger K., Bito A *et al.* (1989). "The gene coding for the major birch pollen allergen Bet v 1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene". *EMBO J*, 8: 1935-1938.
- 10 5) Valenta R., Duchene M., Pettenburger K., Sillaber C., Valent P., Bettelheim P., Breitenbach M., Rumpold H., Kraft D., Scheiner O. (1991). "Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals". *Science* 253:557-560.
- 6) Batard T., Didierlaurent A., Chabre H., *et al.*, (2005). "Characterization of wild-type recombinant Bet v 1a as a candidate vaccine against birch pollen allergy". *Int Arch Allergy Immunol.* 136: 239-249.
- 15 7) Swoboda I., Jilek A., Ferreira F., Engel E., Hoffmann-Sommergruber K., Scheiner O., Kraft D., Breiteneder H., Pittenauer E., Schmid E., Vicente O., Heberle-Bors E., Ahorn H., Breitenbach M. (1995). "Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning". *JBC.* 270 (6): 2607-2613.
- 8) Swoboda I., Scheiner O., Heberle-Bors E., Vicente O., (1992). "cDNA cloning and characterisation of three genes in the Bet v 1 gene family that encode pathogenesis-related proteins". *Plant Cell Environ.* 18: 865-874.
- 20 9) Markovic-Housley Z., Degano M., Lamba D., von Roepenack-Lahaye E., Clemens S., Susani M., Ferreira F., Scheiner O., Breiteneder H. (2003). "Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier". *J Mol Biol*, 325: 123-133.
- 10) Niederberger V., Pauli G., Gronlund H. *et al.* (1998). "Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBetv 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel, and oak pollen: a quantitative IgE inhibition study with sera from different populations". *J Allergy Clin Immunol.* 102: 579-591.
- 25 11) Neudecker P., Lehmann K., Nerkamp J., Haase T., Wangorsch A., Fotisch K., Hoffmann S., Rosch P., Vieths S., Scheurer S. (2003). "Mutational epitope analysis of Pru av 1 and Api g 1, the major allergens of cherry (*Prunus avium*) and celery (*Apium graveolens*): correlating IgE reactivity with three-dimensional structure". *Biochem J.* 376 (Pt 1):97-107.
- 30 12) Asero R. (1998). "Effects of birch pollen-specific immunotherapy on apple allergy in birch pollen hypersensitive patients". *Clin Exp Allergy.* 28: 1368-1373.
- 13) Visco V., Dolecek C., Denépoux S., Le Mao J., Guret C., Rousset F., Guinnepain MT, Kraft D, Valenta R, Weyer A, Banchereau J, Lebecque S. (1996). "Human IgG monoclonal antibodies that modulate the binding of specific IgE to birch pollen Bet v 1". *J. Immunol.* 157: 956-962.
- 35 14) Vrtala S, Ball T, Spitzauer s, Pandjaitan B, Suphioglu C, Knox B, Sperr WR, Valent P, Kraft D, Valenta R. (1998). "Immunization with purified natural and recombinant allergens induces mouse IgG1 antibodies that recognize similar epitopes as human IgE and inhibit the human IgE-allergen interaction and allergen-induced basophil degranulation". *J Immunol* 160: 6137.
- 15) Paul, (1989), "Fundamental Immunology", Raven press, Nueva York.
- 40 16) Cryz, S. J. (1991), "Immunotherapy and Vaccines", VCH Verlagsgesellschaft.
- 17) Wang W., Malcolm BA. (2002). "Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis". *Methods Mol Biol.*; 182: 37-43.
- 18) Younghee Kim. (2004). "Cloning and Expression of a Lipase Gene from Rice (*Oryza sativa* cv. Dongjin)". *Mol. Cells*, 18 (1): 40-45.
- 45 19) Asturias JA, Ibarrola I, Eseverri JL, Arilla MC, Gonzales-Rioja R, Martinez A. (2004). "PCR-based cloning and immunological characterization of *Parietaria judaica* pollen profilin". *J Investig Allergol Clin Immunol*, 14: 43-48.
- 20) Towbin J., Staehelin T., Gordon J., (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> LOFARMA S.P.A.
5	<120> Variantes hipoalergénicas del alérgeno principal del polen de <i>Betula verrucosa</i>
	<130> 7683MEUR
	<160> 10
10	<170> PatentIn versión 3.3
	<210> 1
	<211> 159
	<212> PRT
15	<213> Desconocido
	<220>
	<223> Bet v 1 silvestre de <i>Betula verrucosa</i>
20	<400> 1

ES 2 441 217 T3

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys
20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe
50 55 60

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Lys Ile Asn Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Ile Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn

145

150

155

<210> 2
<211> 159
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Bet v 1 mutante
<400> 2

ES 2 441 217 T3

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys
20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Ala Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe
50 55 60

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Lys Ile Asn Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Ile Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
145 150 155

<210> 3

<211> 159

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Bet v 1 mutante

10 <400> 3

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys
20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe
50 55 60

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Ala Ile Asn Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Ile Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
145 150 155

<210> 4

<211> 159

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Bet v 1 mutante

10

<400> 4

ES 2 441 217 T3

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys
20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe
50 55 60

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Lys Ile Asn Asn Lys Tyr His Thr Ala Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Ile Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
145 150 155

<210> 5

<211> 159

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Bet v 1 mutante

10

<400> 5

ES 2 441 217 T3

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
1 5 10 15

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys
20 25 30

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
35 40 45

Gly Pro Gly Thr Ile Ala Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe
50 55 60

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
65 70 75 80

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Ala Ile Asn Asn Lys Tyr His Thr Ala Gly Asp His Glu Val
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Ile Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
145 150 155

<210> 6

<211> 480

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> Secuencia que codifica para Bet v 1 silvestre

<400> 6

```

gggtgttttca attacgaaac tgagaccacc tctgttatcc cagcagctcg actgttcaag      60
gcctttatcc ttgatggcga taatctcttt ccaaagggtg caccccaagc cattagcagt      120
gttgaaaaca ttgaaggaaa tggagggcct ggaaccatta agaagatcag ctttcccgaa      180
ggcttccctt tcaagtacgt gaaggacaga gttgatgagg tggaccacac aaacttcaaa      240
tacaattaca gcgtgatcga gggcggtccc ataggcgaca cattggagaa gatctccaac      300
gagataaaga tagtggcaac ccctgatgga ggttccatct tgaagatcaa caacaagtac      360
cataccaaag gagaccatga ggtgaaggca gagcagatta aggcaagtaa agaaatggga      420
gagacacttt tgagggccgt tgagagctac ctcttggcac actccgatgc ctacaactaa      480

```

<210> 7
 <211> 480
 <212> ADN
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Secuencia que codifica para Bet v 1 mutante

```

<400> 7
  gggtgttttca attacgaaac tgagaccacc tctgttatcc cagcagctcg actgttcaag      60
  gcctttatcc ttgatggcga taatctcttt ccaaagggtg caccccaagc cattagcagt      120
  gttgaaaaca ttgaaggaaa tggagggcct ggaaccattg cgaagatcag ctttcccgaa      180
  ggcttccctt tcaagtacgt gaaggacaga gttgatgagg tggaccacac aaacttcaaa      240
  tacaattaca gcgtgatcga gggcggtccc ataggcgaca cattggagaa gatctccaac      300

  gagataaaga tagtggcaac ccctgatgga ggttccatct tgaagatcaa caacaagtac      360
  cataccaaag gagaccatga ggtgaaggca gagcagatta aggcaagtaa agaaatggga      420
  gagacacttt tgagggccgt tgagagctac ctcttggcac actccgatgc ctacaactaa      480

```

<210> 8
 <211> 480
 <212> ADN
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Secuencia que codifica para Bet v 1 mutante

<400> 8

```

gggtgttttca attacgaaac tgagaccacc tctgttatcc cagcagctcg actgttcaag    60
gcctttatcc ttgatggcga taatctcttt ccaaagggtg caccccaagc cattagcagt    120
gttgaaaaca ttgaaggaaa tggagggcct ggaaccatta agaagatcag ctttcccgaa    180
ggcttccctt tcaagtacgt gaaggacaga gttgatgagg tggaccacac aaacttcaaa    240
tacaattaca gcgtgatcga gggcgggtccc ataggcgaca cattggagaa gatctccaac    300
gagataaaga tagtggcaac ccctgatgga ggttccatct tggcgatcaa caacaagtac    360
cataccaaag gagaccatga ggtgaaggca ggcagatta aggcaagtaa agaaatggga    420
gagacacttt tgagggccgt tgagagctac ctcttggcac actccgatgc ctacaactaa    480

```

<210> 9
 <211> 480
 <212> ADN
 <213> Desconocido

5

<220>
 <223> Secuencia que codifica para Bet v 1 mutante

10

```

<400> 9
gggtgttttca attacgaaac tgagaccacc tctgttatcc cagcagctcg actgttcaag    60
gcctttatcc ttgatggcga taatctcttt ccaaagggtg caccccaagc cattagcagt    120
gttgaaaaca ttgaaggaaa tggagggcct ggaaccatta agaagatcag ctttcccgaa    180
ggcttccctt tcaagtacgt gaaggacaga gttgatgagg tggaccacac aaacttcaaa    240
tacaattaca gcgtgatcga gggcgggtccc ataggcgaca cattggagaa gatctccaac    300
gagataaaga tagtggcaac ccctgatgga ggttccatct tgaagatcaa caacaagtac    360
cataccgcag gagaccatga ggtgaaggca ggcagatta aggcaagtaa agaaatggga    420
gagacacttt tgagggccgt tgagagctac ctcttggcac actccgatgc ctacaactaa    480

```

<210> 10
 <211> 480
 <212> ADN
 <213> Desconocido

15

<220>
 <223> Secuencia que codifica para Bet v 1 mutante

20

<400> 10

ES 2 441 217 T3

gggtgttttca attacgaaac tgagaccacc tctgttatcc cagcagctcg actgttcaag	60
gcctttatcc ttgatggcga taatctcttt ccaaagggtg caccccaagc cattagcagt	120
ggtgaaaaca ttgaaggaaa tggagggcct ggaaccattg cgaagatcag ctttcccgaa	180
ggcttccctt tcaagtacgt gaaggacaga gttgatgagg tggaccacac aaacttcaaa	240
tacaattaca gcgtgatcga gggcgggtccc ataggcgaca cattggagaa gatctccaac	300
gagataaaga tagtggcaac ccctgatgga ggttccatct tggcgatcaa caacaagtac	360
cataccgcag gagaccatga ggtgaaggca gacgagatta aggcaagtaa agaaatggga	420
gagacacttt tgagggccgt tgagagctac ctcttggcac actccgatgc ctacaactaa	480

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que es una variante hipoalergénica del alérgeno principal del polen de *Betula verrucosa* (Bet v 1) y que se caracteriza por:
 - a) mostrar una reactividad reducida contra IgE en comparación con Bet v 1 silvestre (SEQ ID NO:1);
 - b) tener una secuencia de aminoácidos que:
 - i) es al menos 87%, preferentemente al menos 94%, más preferentemente al menos 97% idéntica a SEQ ID NO:1;
 - ii) en una alineación de secuencia con SEQ ID NO:1, presenta una sustitución o eliminación del residuo de Lys correspondiente al aminoácido 54 de SEQ ID NO:1.
2. Una proteína según la reivindicación 1, en donde dicho residuo de Lys se sustituye por aminoácidos neutros o polares.
3. Una proteína según la reivindicación 2, en donde dichos aminoácidos neutros o polares se seleccionan de Ala, Thr, Gly, Pro, Leu, Ile, Phe, Ser.
4. Una proteína según la reivindicación 3, en donde dichos aminoácidos son Ala, Ser o Thr.
5. Una proteína según la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.
6. Un fragmento de péptido inmunológicamente activo de una proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, que contiene de 15 a 35 aminoácidos y que porta la sustitución y/o eliminación de Lys tal como se definió anteriormente.
7. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 6, que contiene de 15 a 20 aminoácidos.
8. Una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1-5 o para un péptido según las reivindicaciones 6-7.
9. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, que tiene la secuencia SEQ ID NO:7.
10. Un vector que contiene la molécula de ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 8-9.
11. Una célula huésped que contiene el vector de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, o un péptido de acuerdo con las reivindicaciones 6-7, junto con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables.
13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12, que está en forma de una vacuna.
14. Uso de una proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, o un péptido de acuerdo con las reivindicaciones 6-7, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades alérgicas.
15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, para el tratamiento de asma bronquial, rinitis, conjuntivitis y dermatitis atópica.

Figura 1

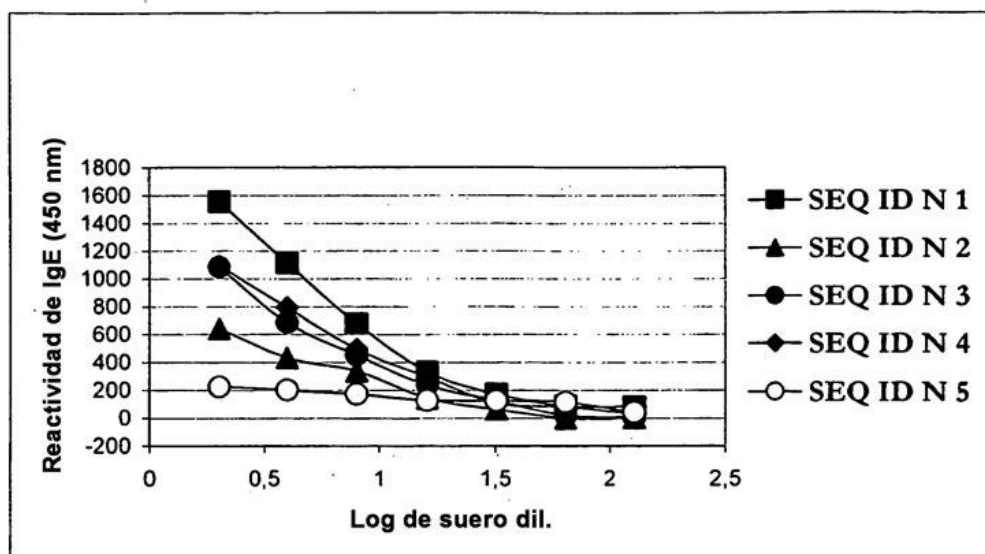


Figura 2

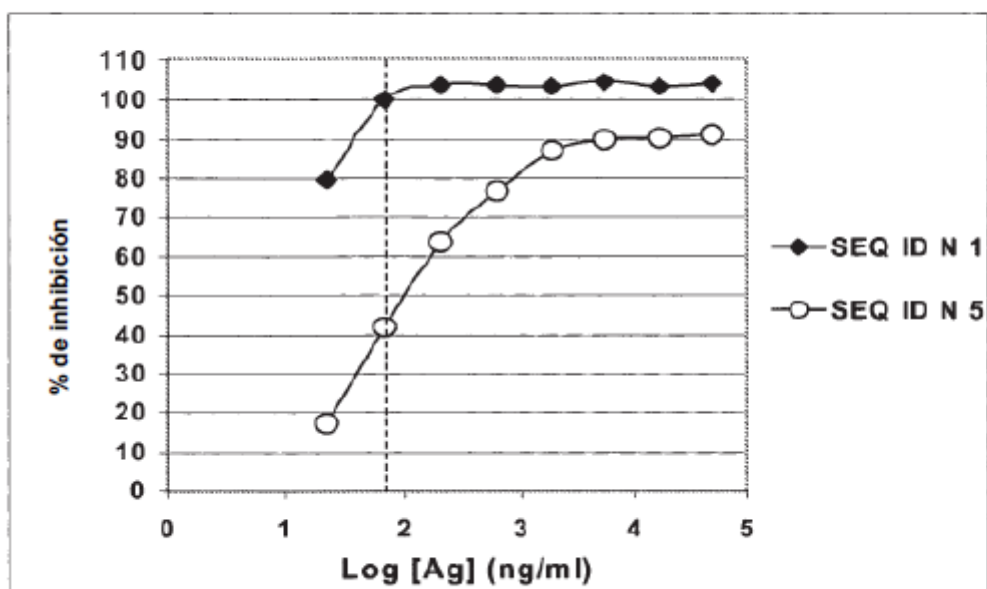


Figura 3

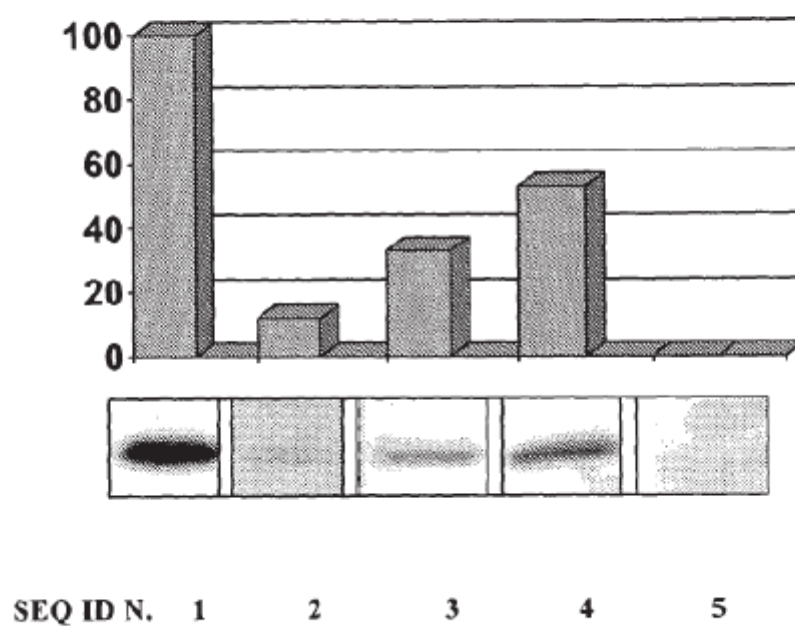


Figura 4

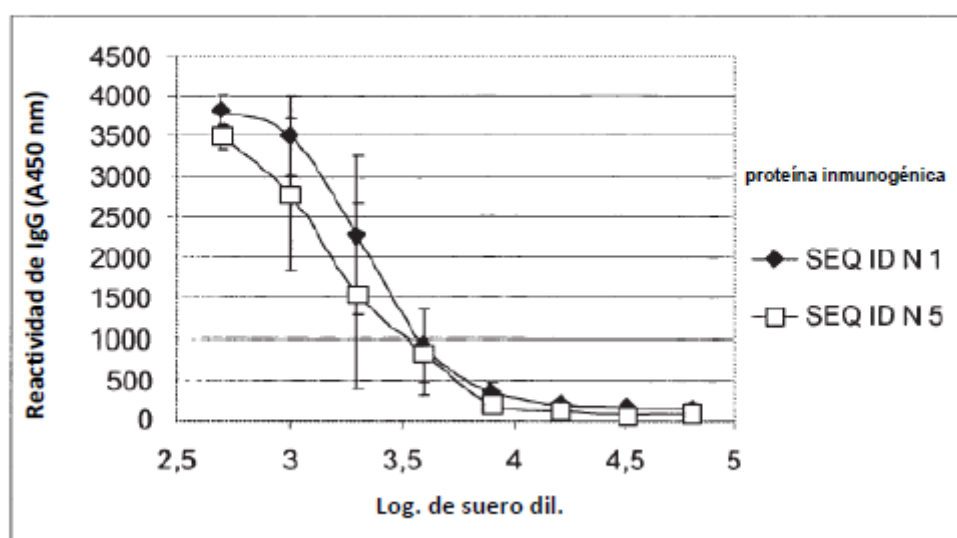


Figura 5

