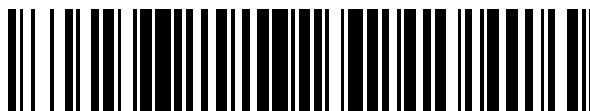


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 573**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/415** (2006.01)

**C12N 15/29** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**A61K 39/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2008 E 08802256 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2201031**

54 Título: **Variantes hipoalérgicas del alérgeno principal del polen de abedul**

30 Prioridad:

**19.09.2007 IT MI20071819**

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

**13.05.2014**

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 2 460 573 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 abedul.

5 La presente invención proporciona variantes de secuencias hipoalergénicas de la proteína Bet v 2, moléculas de ácido nucleico que las codifican, composiciones farmacéuticas que contienen las mismas y su uso en la profilaxis y terapia de enfermedades alérgicas causadas por el polen de plantas de la especie *Betula verrucosa*.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 Las alergias son causadas por una disfunción en el sistema inmune, que reacciona a las proteínas inocuas contenidas en el polen, los ácaros, epitelios y ciertos alimentos mediante la producción de anticuerpos de clase IgE.

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

20 La inmunoterapia hiposensibilizante específica (SIT), a diferencia de la terapia farmacológica, es el único tratamiento etiológico de enfermedades alérgicas capaz de cambiar favorablemente los parámetros inmunológicos característicos de este tipo de enfermedades.

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

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

En los últimos años, la atención se ha centrado en el desarrollo de vacunas más seguras, eficaces, en particular las vacunas que consisten de proteínas recombinantes mutagenizadas, es decir, variantes hipoalergénicas capaces de influir favorablemente en la progresión natural de la enfermedad sin causar efectos secundarios no deseados (3).

35 Uno de los factores beneficiosos de la SIT es la inducción si los anticuerpos IgG específicos para el alérgeno sensibilizante. Estos anticuerpos (protectores) pueden inhibir la unión antígeno-IgE, específicamente la unión de IgE al antígeno Bet v 2, alterando la configuración tridimensional de las moléculas (4,5). El desarrollo de vacunas que contienen proteínas recombinantes hipoalergénicas con propiedades inmunogénicas inalteradas puede mejorar el enfoque terapéutico de las enfermedades alérgicas.

40 El polen de las plantas taxonómicamente conocidas 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 de polen de abedul, Bet v 1 (ADNc depositada en el GenBank con núm. de acceso X15877) y Bet v 2 (núm. M65179) son proteínas con peso molecular de 17 y 14 kD, respectivamente (6, 7). El Bet v 2 pertenece a la familia profilina, que son proteínas citoplasmáticas ubicuas implicadas en la regulación del citoesqueleto de la célula eucariota. Estas interactúan específicamente con al menos dos (macro)moléculas celulares, o sea, la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, impidiendo de este modo la hidrólisis de este ácido graso por la fosfolipasa C- $\gamma$  (8), y la actina, modulando su polimerización (9). La alta expresión de profilinas en el polen maduro y germinativo sugiere su implicación en la regulación de los precursores de microfilamentos que intervienen en el proceso de germinación (10). Las profilinas se identificaron como alérgenos en el polen de muchas plantas arbóreas y herbáceas y en muchas frutas y verduras y por lo tanto se definieron 'pan-alérgenos', a pesar del hecho de que se encuentran en sólo 20% de los pacientes alérgicos al polen (11, 12).

55 La alta homología de secuencia, superior al 60% en la mayoría de profilinas de plantas de diverso origen, causa la sensibilización cruzada no sólo con el polen de plantas botánicamente correlacionadas (13) y no correlacionadas (14) sino también entre el polen y alimentos de plantas (15) o entre el polen y el látex (16). La homología entre las profilinas de la planta y de los mamíferos es bastante baja, sin embargo, estas mostraron ser capaces de unirse a la actina de diferentes especies y mostraron capacidad de intercambio (17,18,19). Una explicación es que todas las profilinas comparten una estructura tridimensional similar, como se muestra usando cristalografía de rayos X (20, 21, 22).

60 Muchos estudios confirman la equivalencia inmunológica de las profilinas. De hecho, se demostró que las IgE de pacientes sensibilizados para un profilina determinada son capaces de unirse a profilinas de origen diferente y que la unión de IgE a las profilinas puede ser mutuamente inhibida (16).

65

La alta reactividad cruzada entre diferentes profilinas permite el uso de una sola profilina para el diagnóstico de alergia y el Bet v 2 recombinante se usa a menudo como el alérgeno de elección para la determinación de profilina-IgE específica (23, 24).

5 Hay muchos estudios sobre la determinación de epítomos IgE profilina.

Vrtala (1996) (25) mutagenizó el Bet v 2 en las posiciones Phe44 y Gln47, que cambiaron en Tyr44, Glu47 y Asn47, de acuerdo con estudios contemporáneos llevados a cabo por el mismo grupo (26), donde se identificó un epítomo lineal reconocido por el anticuerpo monoclonal 4A6. El epítomo reconocido por este anticuerpo se mapeó mediante el uso de dodecapéptidos sintéticos que abarcaron la secuencia de aminoácidos completa de Bet v2. Los péptidos que se unían de manera más eficiente al anticuerpo contenían las regiones entre los aminoácidos 38-49 y 40-51. La importancia del residuo Gln47 en la unión de IgG-péptido se apoyó en la evidencia que 4A6 no era capaz de reconocer las profilinas de *Nicotiana tabacum* y *Phleum pratense*, cuyas secuencias presentan un glutamato en lugar de Gln47 en Bet v 2. A diferencia de la mutación Gln47→Glu47, el cambio de Phe44 a Tyr44 o de Gln47 a Asn47 no afectó la unión del anticuerpo. Las mismas mutaciones (Gln47 a Glu o Asn y Phe44 a Tyr44) aplicadas al Bet v 2 recombinante fueron incapaces de disminuir la unión entre la profilina e IgE, como se muestra por los experimentos de inmunotransferencia y ELISA (25).

20 En un estudio posterior publicado en 1997 (22), los principales epítomos de IgE se identificaron mediante la clonación de fragmentos aleatorios de ADNc de profilina de abedul de una biblioteca de expresión probada con sueros de pacientes alérgicos a las profilinas. Tres regiones, correspondientes a las hélices alfa localizadas en los terminales amino (aa 1-30) y carboxi (aa 106-132) y a un fragmento comprendido entre los residuos 30 y 50, probaron ser más reactivas.

25 En un estudio posterior (23), la búsqueda de epítomos IgE se basó en la comparación entre los modelos estructurales teóricos para profilinas de diferentes plantas y cristales de profilina de abedul o látex. Se predijeron once posibles epítomos conformacionales, que consisten en las regiones de aminoácidos contiguos, al menos el 20% de los cuales están expuestos en la superficie. Dos tipos de epítomos resultaron de una comparación de las secuencias de aminoácido con los modelos conformacionales: las especies-específicas, que se caracterizan por una gran variabilidad, y las muy conservadas, que probablemente están más implicadas en la reactividad cruzada entre profilinas de diferentes plantas. Las alineaciones de secuencias de aminoácidos reflejan los resultados del estudio de Fedorov (22), que evidencia dos posibles epítomos lineales en el N-terminal, tres en la región entre los residuos 30 y 80 y dos adicionales en el C-terminal de la profilina. Todas estas regiones están muy conservadas en las profilinas de las plantas evaluadas en este estudio. La predicción de potenciales epítomos conformacionales se basó en el análisis de un modelo 3D para la profilina de látex Hev b 8. El análisis evidenció 12 residuos salientes, seleccionados como centros de los epítomos. Aunque todos los posibles epítomos fueron conformacionales, estos contenían secuencias lineales y también residuos conservados o variables. No se reportó ninguna prueba en este estudio para confirmar la capacidad de unión al IgE específico de los epítomos propuestos.

40 Una publicación más reciente se refiere a la identificación de epítomos de IgE de profilina de *Cucumis melo's* (27). Mediante la determinación de la reactividad de IgE de péptidos que abarcan la secuencia entera de aminoácidos de esta proteína, se identificaron dos epítomos lineales, que son fuertemente reconocidos por el suero de pacientes alérgicos a melón: E1, que comprende los residuos 66-75 y 81-93, y E2 que consiste en los aminoácidos 95-99 y 122-131. Dos epítomos adicionales se caracterizaron por una respuesta más débil de IgE, a saber, E3 (residuos 2-10) y E4 (35-45). La superposición de péptidos correspondientes a los epítomos de E1 y E2 con el modelo 3D de profilina de melón, indica dos regiones con propiedades electrostáticas bien definidas: E1 y E2, que se asocian con los dominios de proteínas electropositivos y electronegativos, respectivamente.

50 Los datos disponibles de la literatura sugieren las porciones moleculares donde se localizan los epítomos de profilina IgE pero no indican los aminoácidos implicados en la unión de la IgE.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

55 Ahora se encontró que mediante la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos dentro de la secuencia del alérgeno Bet v 2, este se hace menos reactivo a los anticuerpos IgE.

En un primer aspecto, la invención proporciona una proteína hipoalérgica que es una variante de secuencia del alérgeno Bet v 2 y que se caracteriza por:

60 1) reactividad reducida ante las IgE en comparación con el alérgeno Bet v 2 silvestre (sec. con núm. de ident.:1);  
y  
2) una secuencia de aminoácidos que:

65 a) es al menos 90%, preferentemente al menos 93%, con mayor preferencia al menos 97% idéntica a la sec. con núm. de ident.:1;

b) en una alineación de secuencia con la sec. con núm. de ident.:1, presenta al menos una sustitución o deleción en los residuos Ser o Lys que coinciden con Ser<sub>39</sub>, Lys<sub>45</sub>, Lys<sub>88</sub> o Lys<sub>89</sub> en la sec. con núm. de ident.:1.

5 En una modalidad preferida, las variantes del alérgeno Bet v 2 de acuerdo con la invención presentan una serie de sustituciones que varían de 1 a 3 en las posiciones indicadas, de manera que se generan variantes de una-, doble- o triple sustitución. Se prefieren las variantes obtenidas por la sustitución de uno o más residuos en las posiciones indicadas con un aminoácido neutro, polar o ácido. Los residuos de sustitución son preferentemente seleccionados de Ala, Thr, Gly, Pro, Leu, Ile, Ser, Phe, Glu, Asp, con mayor preferencia de Ala, Thr, Ser, Gly, Glu, Asp.

10 Los ejemplos de variantes de acuerdo con la invención se identifican en la sec. con núm. de ident.:2 (1 sustitución de residuo), sec. con núm. de ident.:3 (1 sustitución de residuo.), sec. con núm. de ident.:4 (2 sustituciones de residuo), sec. con núm. de ident.:5 (3 sustituciones de residuo) y sec. con núm. de ident.:6 (3 sustituciones de residuo).

15 En comparación con la contraparte silvestre, las variantes de sustitución del alérgeno Bet v 2 de acuerdo con la invención muestran una reactividad de IgE al suero de pacientes alérgicos al polen de *Betula verrucosa* que se reduce en al menos 10%, preferentemente al menos 50%, con mayor preferencia al menos 90%, en donde la reactividad de IgE se mide por ejemplo por medio de un ensayo ELISA.

20 La reactividad de IgE de las proteínas sec. con núms. de ident.:2-6 de un concentrado de suero de pacientes alérgicos se probó en un ensayo ELISA (Fig. 1). En comparación con el alérgeno Bet v 2 silvestre (sec. con núm. de ident.:1), se observó una reducción media de un 92% (sec. con núm. de ident.:2), 13% (sec. con núm. de ident.:3), 97% (sec. con núm. de ident.:4) y 93% (sec. con núms. de ident.:5 y 6) de la reactividad de IgE cuando dichas proteínas se incubaron con un concentrado de suero de pacientes alérgicos al polen de abedul.

25 Estos resultados fueron confirmados por experimentos de inhibición REAST, que permiten evaluar la reactividad de epítomos homólogos de diferentes proteínas. En presencia de 1.45 ng de inhibidor, la unión de Bet v 2 silvestre (sec. con núm. de ident.:1) a las IgE de un concentrado de suero de pacientes alérgicos se inhiben en 82.6% cuando el suero se trata previamente con la misma proteína, en 40.4% y 71% cuando el suero se incubó previamente con las variantes de la sec. con núm. de ident.:2 y sec. con núm. de ident.:3, respectivamente, mientras que la inhibición observada es solamente 13.4%, 4% y 8.8% cuando el suero se incubó previamente con cantidades idénticas de la variante de doble-sustitución (sec. con núm. de ident.:4) y variantes de triple-sustitución (sec. con núm. de ident.:5 y sec. con núm. de ident.:6) respectivamente (Fig. 2).

35 Estos resultados indican claramente que los aminoácidos en las posiciones 39, 45, 88, 89 de sec. con núm. de ident.:1 están implicados en el reconocimiento del alérgeno Bet v 2 por las IgE.

40 Adicionalmente, en experimentos de inmunización de ratones Balb/c, el alérgeno Bet v 2 silvestre y la sec. con núm. de ident.:5 de la proteína hipoalérgica (escogida como un alérgeno mutado ilustrativo) probó ser capaz de inducir una respuesta inmuno específica-IgG (Fig. 3). Los anticuerpos contra la sec. con núm. de ident.:5 fueron capaces de reconocer la contraparte silvestre sec. con núm. de ident.:1 (Fig. 4), lo que demuestra que la sustitución de los residuos de Lys en las posiciones 45, 88, 89 no determina una alteración significativa de la inmunogenicidad de la molécula y de sus epítomos IgG. En contraste, los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados con un antígeno no correlacionado no fueron capaces de reconocer el Bet v 2 silvestre ni la sec. con núm. de ident.:5.

45 En un aspecto adicional, la invención proporciona un péptido inmunológicamente activo que corresponde a un fragmento de Bet v 2 que contiene al menos una de las sustituciones descritas anteriormente. Dicho péptido contiene preferentemente de 15 a 35, con mayor preferencia de 15 a 20 residuos de aminoácido. Como se usa en la presente, la expresión "péptido inmunológicamente activo" indica un péptido que es capaz de provocar una respuesta inmune independiente de IgE.

50 Las variantes de sustitución de acuerdo con la invención se pueden preparar fácilmente mediante mutagénesis de la secuencia de ADNc de Bet v 2 silvestre (sec. con núm. de ident.:7) usando métodos y técnicas conocidas para los expertos en la técnica.

55 Las secuencias de ADNc que codifican para las variantes de sustitución sencilla, doble y triple identificadas en las sec. con núms. de ident.: 2-6 se reportan en las sec. con núms. de ident.: 8-12.

60 En aspectos adicionales, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una variante de Bet v 2 hipoalérgica descrita en la presente descripción, o un péptido derivado de ahí, y un vector de expresión que contiene dicha molécula funcionalmente ligada a los elementos genéticos que controlan su expresión en células eucariotas o procariotas, tales como los promotores de transcripción, potenciadores, señales y secuencias líder u otras secuencias implicadas en la regulación de la transcripción. Los ejemplos de vectores incluyen plásmidos, virus y fagos, pero cualquier otro vector que se usa comúnmente en la ingeniería genética se puede emplear también.

65

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

5 Adicionalmente, las variantes hipoadérgicas de acuerdo con la invención pueden producirse como proteínas de fusión.

10 Gracias a su reducida reactividad frente a IgE, las variantes Bet v 2 de acuerdo con la presente invención pueden usarse convenientemente para la preparación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo tabletas) para el tratamiento preventivo o terapéutico de individuos alérgicos al polen de *Betula verrucosa*.

15 En un aspecto adicional, la invención se dirige, por tanto, a una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de la variante de Bet v 2 hipoadérgica como se describe en la presente descripción, opcionalmente en combinación con otros alérgenos de *Betula verrucosa* y/o con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables. En una modalidad preferida, la composición farmacéutica está en forma de una vacuna para usar en la profilaxis o terapia de enfermedades alérgicas, que incluyen asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis alérgica y conjuntivitis alérgica. La teoría y prácticas de vacunación son conocidas por aquellos con experiencia en la técnica (28, 29).

20 Los siguientes ejemplos ilustran más aun la invención. A menos que se indique de cualquier otra forma, los métodos utilizados 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.

#### 25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1:** análisis ELISA de la reactividad de IgE frente al alérgeno Bet v 2 y las variantes hipoadérgicas del Bet v 2;

**Fig. 2:** Inhibición de la unión de IgE binding al alérgeno Bet v 2;

**Fig. 3:** respuesta de la IgG murina a las proteínas inmunogénicas respectivas;

**Fig. 4:** respuesta de la IgG en ratones inmunizados con la sec. con núm. de ident.:5.

#### 30 EJEMPLO 1 - Mutagénesis específica de sitio del ADNc que codifica para el alérgeno Bet v 2

35 La mutagénesis específica de sitio del ADNc que codifica para el alérgeno Bet v 2 (sec. con núm. de ident.: 7) se llevó a cabo por clonación del ADNc en un vector procarionta (pBluescript, GenBank Núm. de acceso X52327) seguido por amplificación PCR. Los oligonucleótidos usados como iniciadores en la reacción PCR (Tabla) portaron las sustituciones base adecuadas. Para cada mutagénesis, se usó una unión al oligonucleótido complementario a una región correspondiente de la cadena de ADN (30). Después de la amplificación, la plantilla original no alterada 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 las colonias bacterianas sencillas se secuenciaron de acuerdo con Sanger para determinar la modificación base correcta y la ausencia de mutaciones no específicas en el ADNc.

40 **Tabla.** Secuencias de los oligonucleótidos usadas como iniciadores en la mutagénesis específica de sitio. Las bases mutadas están en negrita.

45

Oligonucleótido	Secuencia
Bet v2 S39	ggg ccc aga gcg ctt cct tcc cac ag
Bet v2 K45	cct tcc cac agt tta cgc ctc agg aaa tc
Bet v2 K88-89	gtc atc cgt gga ggg gag gga tct gga g

#### 50 EJEMPLO 2 - Producción de la proteína Bet v 2 y variantes de esta

50 Los ADNc de Bet v 2 silvestre (sec. con núm. de ident.:7) y mutagenizado (sec. con núms. de ident.: 8-12), se clonaron y expresaron en *Escherichia coli* de acuerdo con los protocolos estándar (31, 32). Las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en PBS 1X (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.46 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.47 mM, NaCl 136.89 mM) y se lisaron por sonicación. Las proteínas recombinantes se separaron por centrifugación. Las bolillas que contenían un agregado de proteína insoluble se resuspendieron en tampón desnaturalizado PBS 1X, urea 6 M y se agitaron por 60 min a 4°C. Las proteínas recombinantes solubilizadas se separaron de los restos insolubles por centrifugación, se dializaron contra PBS 1X, se filtraron a través de un filtro de 1 µM y se purificaron por cromatografía de afinidad usando columnas de agarosa derivatizadas con poli-prolina (Sigma, Milán, Italia). Después de lavar con PBS 1X, urea 2 M, las proteínas recombinantes se eluyeron con PBS 1X, urea 8 M y replegaron por diálisis por 16 horas a 4°C en una solución de PBS 1X.

55

**EJEMPLO 3 - Características del suero de sujetos alérgicos**

Los sueros se recogieron de individuos con anamnesis clínica de alergia estacional al polen de *Betula verrucosa* y una reactividad RAST 3+ y 4+ específica al alérgeno Bet v 2 y después se concentraron y se usaron en esta forma.  
 5 Un concentrado de suero de pacientes no alérgicos se usó como control negativo.

**EJEMPLO 4 - Análisis ELISA de la reactividad de las variantes Bet v 2 a las IgE a partir de un concentrado de suero**

10 La misma cantidad de alérgeno silvestre y de variantes mutagenizadas (1 µg) en 50 mM tampón carbonato/bicarbonato, pH 9.6, se adsorbieron en pocillos de placas de poliestireno para el ensayo ELISA por incubación a 4°C por 16 horas. Los pocillos se lavaron con solución de lavado (60 mM tampón de fosfato, pH 6.5, que contiene 0.05% Tween-20), y bloqueo con solución diluyente (25% suero de cabra, 1 mM EDTA, 0.05% Tween 20, 0.01% timerosal en 150 mM de tampón de fosfato, pH 7.4). Alícuotas de 70 µl en tampón de dilución de  
 15 un concentrado de suero humano RAST 3+ y 4+ se añadieron a cada muestra y se incubaron a 25°C por 2 horas. Después de tres lavados, se añadió suero anti-IgE humano conjugado a peroxidasa (1:1500 en tampón de dilución), seguido por incubación a 25°C por 1.5 horas. Después de tres lavados, la reacción colorimétrica se desarrolló por adición de 100 µl de reactivo de TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y se incubó por 15 minutos a 25°C. La reacción se detuvo por adición de 100 µl de HCl 1 N y se leyó a 450 nm usando un espectrofotómetro lector de  
 20 microplacas .

**EJEMPLO 5 - Ensayo de inhibición REAST. Las variantes Bet v 2 inhiben la unión entre Bet v 2 biotinilado y las IgE contenidas en un concentrado de suero**

25 Alícuotas (50 µl) de un concentrado de suero humano RAST 4+ y 3+ para Bet v 2, diluido 1:3 en tampón de dilución (25% suero de cabra, 1 mM EDTA, 0.05% Tween 20, 0.01% timerosal en 150 mM tampón de fosfato, pH 7.4), se preincubaron a 25°C por 1.5 hrs con diluciones en serie de alérgeno silvestre o mutantes de este, comenzando a partir de 67 ng/ml. Las mezclas se añadieron después a los pocillos de la placa de poliestireno ELISA adsorbidas con anti-IgE humano e incubadas a 25°C por 1.5 hrs. Después de tres lavados con tampón de fosfato 0.06 M pH 6.5,  
 30 se añadió Tween-20 0.05%, 0.1 ml de antígeno Bet v 2 biotinilado (85.3 ng/ml) en tampón de dilución a 25°C por 1 hora. Después de tres lavados, se añadió peroxidasa-estreptavidina (0.1 µg/ml) por 30 min a 25°C. La reacción colorimétrica se desarrolló con 100 µl HCl 1 N y se leyó espectrofotométricamente a 450 nm.

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

**EJEMPLO 6 - Protocolo para la inmunización de ratones Balb/c**

40 Dos grupos de 5 ratones hembra Balb/c (Charles River) se inmunizaron por vía subcutánea con 200 µl de una emulsión que contiene 100 µl adyuvante completo de Freund y 20 µg de antígeno (sec. con núm. de ident.:1, sec. con núm. de ident.:5) en 100 µl de solución salina. Se llevaron a cabo tres inmunizaciones adicionales de refuerzo a intervalos de 1-semana sustituyendo el adyuvante completo con uno incompleto. Como control, se administró a cinco ratones un antígeno no correlacionado. Siete días después de la última inmunización, se tomó una muestra de sangre de la vena yugular y se usó en el ELISA para controlar la respuesta del anticuerpo contra cada agente  
 45 inmunogénico. En ratones inmunizados con la sec. con núm. de ident.:5, la capacidad de reconocer la proteína silvestre se analizó además.

**EJEMPLO 7 - Análisis ELISA de la respuesta IgG-específica en ratones inmunizados**

50 Las mismas cantidades de Bet v 2 silvestre y de la variante de sec. con núm. de ident.:5 (0.25 µg) en 50 mM tampón de carbonato/bicarbonato, pH 9.6, se adsorbieron en los pocillos de placas de poliestireno para el ensayo ELISA por incubación por 16 horas a 4°C. Los pocillos se lavaron con solución de lavado (60 mM tampón de fosfato, pH 6.5, que contiene 0.05% Tween-20) y se bloquearon con solución diluyente (25% suero de caballo, 1 mM EDTA, 0.05% Tween 20, 0.01% timerosal en 150 mM de tampón de fosfato, pH 7.4). 100 µl alícuotas de diluciones en serie (en  
 55 tampón de dilución) de suero de cada ratón se colocaron en los pocillos y se incubaron por 2 horas a 25°C.

Después de tres lavados, el suero anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa se diluyó 1:2000 en tampón de dilución y se añadió a los pocillos, seguido por la incubación por 1.5 hr a 25°C. Después de tres lavados, la reacción colorimétrica se desarrolló por adición de 100 µl de reactivo de TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y se  
 60 incubó por 15 minutos a 25°C. La reacción se detuvo con 100 µl HCl 1 N seguido por la lectura espectrofotométrica a 450 nm. Las Figuras 3 y 4 muestran la reactividad media obtenida por análisis del suero a partir de 5 ratones para cada grupo.

**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.
- 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) Visco V, Dolecek C, Denépoux S, Le Mao J, Guret C, Rousset F, Guinépain 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.
- 5) 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.
- 6) Breiteneder H., Pettenburger K., Bito A y otros (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.
- 7) 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
- 8) Goldschmidt-Clermont P.J., Kim J., Machesky L.M., Rhee S., Pollard T.D. (1991). "Regulation of phospholipase C- $\gamma$  by profilin and tyrosine phosphorylation". *Science*, 251:1231-3.
- 9) Carlsson I., Nystrom L.E., Sundkvist F., Markey F., Lindberg U. (1977). "Actin polymerization is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non muscle-cells". *J Mol Biol*, 115:465:83.
- 10) Mittermann I, Swoboda I, Pierson E, Eller N, Kraft D, Valenta R, Heberle-Bors E. (1995). "Molecular cloning and characterization of profilin from tobacco (*Nicotiana tabacum*): increased profilin expression during pollen maturation". *Plant Mol Biol.* 27(1):137-46.
- 11) Valenta R., Duchene M., Ebner C., Valent P., Sillaber C., Deviller P., Ferreira F., Tejkl M., Edelmann H., Kraft D., y otros (1992). "Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens" *J. Exp. Med*, 175: 377-85.
- 12) Radauer C., Hoffmann-Sommergruber K. (2004). "Profilin". *Plant food allergens*. IN mills ENC, sherry PR, Editors. *Plant food allergen*. Oxford: Blackwell Publishing. (2004). 105-24.
- 13) Niederberger V, Pauli G, Gronlund H, Froschl R, Rumpold H, Kraft D, Valenta R, Spitzauer S. (1998). "Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 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.* 102:579-91.
- 14) Mari A., (2001). "Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis". *Int Arch Allergy Immunol.* 125: (57-65).
- 15) van Ree R., Voitenko V., van Leeuwen W.A., Aalberse R.C. (1992). "Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods". *Int Arch Allergy Immunol* 98:97:104.
- 16) Ganglberger E., Radauer C., Wagner S y otros (2001). "Hev b 8, the *Hevea brasiliensis* latex profilin, is a cross-reactive allergen of latex, plant foods and pollen". *Int Arch Allergy Immunol.* 125:216-27.
- 17) Giehl K, Valenta R, Rothkegel M, Ronsiek M, Mannherz HG, Jockusch B.M. (1994) "Interaction of plant profilin with mammalian actin". *Eur J Biochem.* 226(2):681-9.
- 18) Staiger C.J, Yuan M, Valenta R, Shaw P.J, Warn R.M, Lloyd C.W (1994). "Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments". *Curr Biol.* Mar 1;4(3):215-9.
- 19) Rothkegel M, Mayboroda O, Rohde M, Wucherpfennig C, Valenta R, Jockusch B.M. (1996). "Plant and animal profilins are functionally equivalent and stabilize microfilaments in living animal cells". *J Cell Sci.*109 (Pt 1):83-90.
- 20) Almo SC, Pollard TD, Way M, Lattman EE (1994). "Purification, characterization and crystallization of *Acanthamoeba* profilin expressed in *Escherichia coli*". *J Mol Biol.* 236(3):950-2.
- 21) Fedorov AA, Pollard TD, Almo SC. (1994). "Purification, characterization and crystallization of human platelet profilin expressed in *Escherichia coli*". *J Mol Biol.* 241 (3):480-2.
- 22) Fedorov AA, Ball T, Mahoney NM, Valenta R, Almo SC. (1997). "The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin". *Structure.* 5: 33-45
- 23) Radauer C, Willeroider M, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder H. (2006). "Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis". *Journal Clin Exp Allergy* 2006; 36(7):920-929.
- 24) Rossi R.E., Monasterolo G., Operti D., Corsi M. (1996). "Evaluation of recombinant allergens Bet v 1 and Bet v 2 (profilin) by Pharmacia CAP system in patients with pollen-related allergy to birch and apple". *Allergy*, 51:940-5.
- 25) Vrtala S, Wiedemann P, Mittermann I, Eichler H.G, Sperr W.R, Valent P, Kraft D, Valenta F. (1996). " High-level expression in *Escherichia coli* and purification of recombinant plant profilins: comparison of IgE-binding capacity and allergenic activity". *Biochem Biophys Res Commun* 226(1):42-50.
- 26) Wiedemann P, Giehl K, Almo SC, Fedorov AA, Girvin M, Steinberger P, Rudiger M, Ortner M, Sippl M, Dolecek C, Kraft D, Jockusch B, Valenta R. (1996). "Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody". *J Biol Chem.* 271(47):29915-29921.

- 27) Lopez-Torreon G, Diaz-Perales A, Rodriguez J, Sanchez-Monge R, Crespo JF, Salcedo G, Pacios LF. (2007). "An experimental and modeling-based approach to locate IgE epitopes of plant profilin allergens". J Allergy Clin Immunol. 119:1481-8.
- 28) Paul, (1989), "Fundamental Immunology", Raven press, Nueva York.
- 5 29) Cryz, S. J. (1991), "Immunotherapy and Vaccines", VCH Verlagsgesellschaft.
- 30) 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.
- 31) Younghee Kim. (2004). "Cloning and Expression of a Lipase Gene from Rice (Oryza sativa cv. Dongjin)". Mol. Cells, 18 (1): 40-45.
- 10 32) 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> LOFARMA S.P.A.

<120> VARIANTES HIPOALERGÍNICAS DEL ALÉRGENO PRINCIPAL DEL POLEN DE ABEDUL

<130> 8025MEUR

20

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.3

25

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Desconocido

30

<220>

<223> Bet v 2 silvestre de Betula verrucosa

<400> 1

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile Asp  
1 5 10 15

Gly Gln Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ala Ile Val Gly His Asp Gly  
20 25 30

Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Ser Phe Pro Gln Phe Lys Pro Gln Glu  
35 40 45

Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Glu Glu Pro Gly His Leu Ala Pro  
50 55 60

Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu  
65 70 75 80

Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile  
85 90 95

Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val  
100 105 110

Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu  
115 120 125

Ile Asp Gln Gly Leu  
130

35



ES 2 460 573 T3

<210> 2  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 5 <213> Desconocido

<220>  
 <223> Bet v 2 mutante

10 <400> 2

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Gln Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ala Ile Val Gly His Asp Gly  
 20 25 30  
 Ser Val Trp Ala Gln Ser Ala Ser Phe Pro Gln Phe Lys Pro Gln Glu  
 35 40 45  
 Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Glu Glu Pro Gly His Leu Ala Pro  
 50 55 60  
 Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu  
 65 70 75 80  
 Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile  
 85 90 95  
 Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val  
 100 105 110  
 Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu  
 115 120 125  
 Ile Asp Gln Gly Leu  
 130

<210> 3  
 <211> 133  
 15 <212> PRT  
 <213> Desconocido

<220>  
 <223> Bet v 2 mutante

20 <400> 3

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Gln Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ala Ile Val Gly His Asp Gly  
 20 25 30

ES 2 460 573 T3

Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Ser Phe Pro Gln Phe Thr Pro Gln Glu  
35 40 45

Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Glu Glu Pro Gly His Leu Ala Pro  
50 55 60

Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu  
65 70 75 80

Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile  
85 90 95

Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val  
100 105 110

Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu  
115 120 125

Ile Asp Gln Gly Leu  
130

<210> 4

5 <211> 133

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

10 <223> Bet v 2 mutante

<400> 4

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile Asp  
1 5 10 15

Gly Gln Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ala Ile Val Gly His Asp Gly  
20 25 30

Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Ser Phe Pro Gln Phe Lys Pro Gln Glu  
35 40 45

Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Glu Glu Pro Gly His Leu Ala Pro  
50 55 60

Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu  
65 70 75 80

Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Gly Glu Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile  
85 90 95

ES 2 460 573 T3

Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val  
 100 105 110

Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu  
 115 120 125

Ile Asp Gln Gly Leu  
 130

<210> 5  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

5

<220>  
 <223> Bet v 2 mutante

10

<400> 5

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile Asp  
 1 5 10 15

Gly Gln Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ala Ile Val Gly His Asp Gly  
 20 25 30

Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Ser Phe Pro Gln Phe Thr Pro Gln Glu  
 35 40 45

Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Glu Glu Pro Gly His Leu Ala Pro  
 50 55 60

Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu  
 65 70 75 80

Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Gly Glu Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile  
 85 90 95

Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val  
 100 105 110

Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu  
 115 120 125

Ile Asp Gln Gly Leu  
 130

<210> 6  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

15

<220>  
 <223> Bet v 2 mutante

20

<400> 6

ES 2 460 573 T3

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile Asp  
 1 5 10 15

Gly Gln Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ala Ile Val Gly His Asp Gly  
 20 25 30

Ser Val Trp Ala Gln Ser Ala Ser Phe Pro Gln Phe Lys Pro Gln Glu  
 35 40 45

Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Glu Glu Pro Gly His Leu Ala Pro  
 50 55 60

Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu  
 65 70 75 80

Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Gly Glu Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile  
 85 90 95

Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val  
 100 105 110

Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu  
 115 120 125

Ile Asp Gln Gly Leu  
 130

5 <210> 7  
 <211> 402  
 <212> ADN.  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <223> Secuencia que codifica Bet v 2 silvestre de Betula verrucosa  
 <400> 7

atgtcgtggc aaacgtacgt ggatgaacat ttgatgtgcg atatcgacgg gcaagccagc 60  
 aactcgctgg catctgcgat cgtcggtcac gatggctctg tgtgggccca gagctcttcc 120  
 ttcccacagt ttaagcctca gaaatcact ggtatcatga aggactttga ggagccgggt 180  
 catcttgctc cgacgggctt acaccttggg ggcataaaat acatggtcac ccagggagag 240  
 gctggtgctg tcatccgtgg aaagaaggga tctggaggta ttactataaa gaagactggt 300  
 caagctctcg tttttggcat ctatgaagag cctgtgacac caggacagtg caacatggtt 360  
 gttgagaggt tgggggatta ccttattgac cagggcctgt ag 402

20 <210> 8  
 <211> 402  
 <212> ADN.  
 <213> Desconocido

25 <220>  
 <223> Secuencia que codifica un Bet v 2 mutante

ES 2 460 573 T3

<400> 8

atgtcgtggc aaacgtacgt ggatgaacat ttgatgtgcg atatcgacgg gcaagccagc 60  
 aactcgctgg catctgcgat cgtcggtcac gatggctctg tgtgggcca gagcgttcc 120  
 ttcccacagt ttaagcctca ggaatcact ggtatcatga aggactttga ggagccgggt 180  
 catcttgctc cgacgggctt acaccttggg ggcataaaat acatggtcat ccagggagag 240  
 gctggtgctg tcatccgtgg aaagaaggga tctggaggta ttactataaa gaagactggt 300  
 caagctctcg tttttggcat ctatgaagag cctgtgacac caggacagtg caacatggtt 360  
 gttgagaggt tgggggatta ccttattgac cagggcctgt ag 402

5 <210> 9  
 <211> 402  
 <212> ADN.  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <223> Secuencia que codifica un Bet v 2 mutante

<400> 9

atgtcgtggc aaacgtacgt ggatgaacat ttgatgtgcg atatcgacgg gcaagccagc 60  
 aactcgctgg catctgcgat cgtcggtcac gatggctctg tgtgggcca gagctcttcc 120  
 ttcccacagt ttaagcctca ggaatcact ggtatcatga aggactttga ggagccgggt 180  
 catcttgctc cgacgggctt acaccttggg ggcataaaat acatggtcat ccagggagag 240  
 gctggtgctg tcatccgtgg aaagaaggga tctggaggta ttactataaa gaagactggt 300  
 caagctctcg tttttggcat ctatgaagag cctgtgacac caggacagtg caacatggtt 360  
 gttgagaggt tgggggatta ccttattgac cagggcctgt ag 402

15 <210> 10  
 <211> 402  
 <212> ADN.  
 <213> Desconocido

<220>  
 <223> Secuencia que codifica un Bet v 2 mutante

<400> 10

25 atgtcgtggc aaacgtacgt ggatgaacat ttgatgtgcg atatcgacgg gcaagccagc 60  
 aactcgctgg catctgcgat cgtcggtcac gatggctctg tgtgggcca gagctcttcc 120  
 ttcccacagt ttaagcctca ggaatcact ggtatcatga aggactttga ggagccgggt 180  
 catcttgctc cgacgggctt acaccttggg ggcataaaat acatggtcat ccagggagag 240  
 gctggtgctg tcatccgtgg aggggaggga tctggaggta ttactataaa gaagactggt 300  
 caagctctcg tttttggcat ctatgaagag cctgtgacac caggacagtg caacatggtt 360  
 gttgagaggt tgggggatta ccttattgac cagggcctgt ag 402

30 <210> 11  
 <211> 402  
 <212> ADN.  
 <213> Desconocido

# ES 2 460 573 T3

<220>

<223> Secuencia que codifica un Bet v 2 mutante

5 <400> 11

```

atgtcgtggc aaacgtacgt ggatgaacat ttgatgtgcg atatcgacgg gcaagccagc    60
aactcgctgg catctgcgat cgtcggtcac gatggctctg tgtgggcca gagctcttcc    120
ttcccacagt ttacgcctca gaaatcact ggtatcatga aggactttga ggagccgggt    180
catcttgctc cgacgggctt acaccttggg ggcataaaat acatggtcac ccagggagag    240
gctggtgctg tcatccgtgg aggggagggg tctggaggta ttactataaa gaagactggt    300
caagctctcg tttttggcat ctatgaagag cctgtgacac caggacagtg caacatggtt    360
gttgagaggt tgggggatta cttattgac cagggcctgt ag                          402
    
```

<210> 12

10 <211> 402

<212> ADN.

<213> Desconocido

<220>

15 <223> Secuencia que codifica un Bet v 2 mutante

<400> 12

```

atgtcgtggc aaacgtacgt ggatgaacat ttgatgtgcg atatcgacgg gcaagccagc    60
aactcgctgg catctgcgat cgtcggtcac gatggctctg tgtgggcca gagcgttcc    120
ttcccacagt ttaagcctca gaaatcact ggtatcatga aggactttga ggagccgggt    180
catcttgctc cgacgggctt acaccttggg ggcataaaat acatggtcac ccagggagag    240
gctggtgctg tcatccgtgg aggggagggg tctggaggta ttactataaa gaagactggt    300
caagctctcg tttttggcat ctatgaagag cctgtgacac caggacagtg caacatggtt    360
gttgagaggt tgggggatta cttattgac cagggcctgt ag                          402
    
```

20

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína hipoalergénica que es una variante de secuencia del alérgeno principal de Bet v 2 y que se **caracteriza por**:
  - 5 a) reactividad reducida ante las IgE en comparación con el alérgeno Bet v 2 silvestre (sec. con núm. de ident.:1);  
y
  - b) una secuencia de aminoácidos que:
    - 10 i. es al menos 90% idéntica a la sec. con núm. de ident.:1; y
    - ii. en una alineación de secuencia con la sec. con núm. de ident.:1, presenta al menos una sustitución de los residuos de Ser o Lys que coinciden con Ser<sub>39</sub>, Lys<sub>45</sub>, Lys<sub>880</sub> Lys<sub>89</sub> en la sec. con núm. de ident.:1.
- 15 2. Una proteína hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:1 es al menos 93%.
3. Una proteína hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:1 es al menos 97%.
- 20 4. Una proteína hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos residuos de Ser o Lys se sustituyen con aminoácidos neutros, polares o ácidos .
5. Una proteína hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dichos aminoácidos neutros, polares o ácidos se seleccionan de Ala, Gly, Pro, Leu, Ile, Phe, Thr, Ser, Glu, Asp.
- 25 6. Una proteína hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dichos aminoácidos son Ala, Thr, Ser, Gly, Glu, Asp.
- 30 7. Una proteína hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste de sec. con núm. de ident.:2 - 6.
8. Un fragmento peptídico de la proteína hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho fragmento peptídico (i) es capaz de provocar una respuesta inmune independiente de IgE, (ii) consiste de entre 15 y 35 aminoácidos y (iii) porta al menos una de las sustituciones indicadas.
- 35 9. Un fragmento peptídico de acuerdo con la reivindicación 8, que consiste de entre 15 y 20 aminoácidos.
10. Una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1-7 o para un péptido de acuerdo con las reivindicaciones 8-9.
- 40 11. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10, que se selecciona del grupo que consiste de las sec. con núms. de ident.:8 - 12.
- 45 12. Un vector que contiene la molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 10-11.
13. Una célula huésped que contiene el vector de la reivindicación 12.
- 50 14. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una proteína hipoalergénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, o un fragmento peptídico de acuerdo con las reivindicaciones 8-9, junto con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables .
15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14, la cual está en forma de una vacuna.
- 55 16. Uso de una proteína hipoalergénica de acuerdo con la reivindicaciones 1-7, o un fragmento peptídico de acuerdo con las reivindicaciones 8-9, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades alérgicas.
17. El uso de de acuerdo con la reivindicación 16, para el tratamiento de asma bronquial y conjuntivitis alérgica.

Figura 1

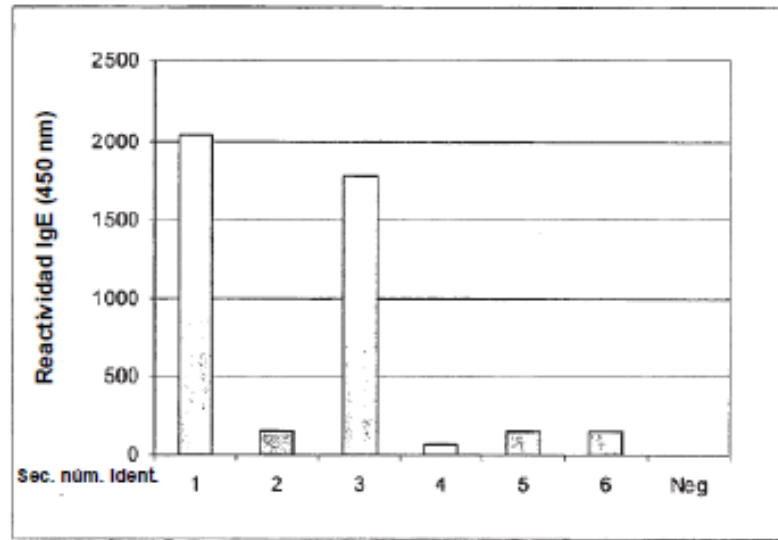




Figura 2

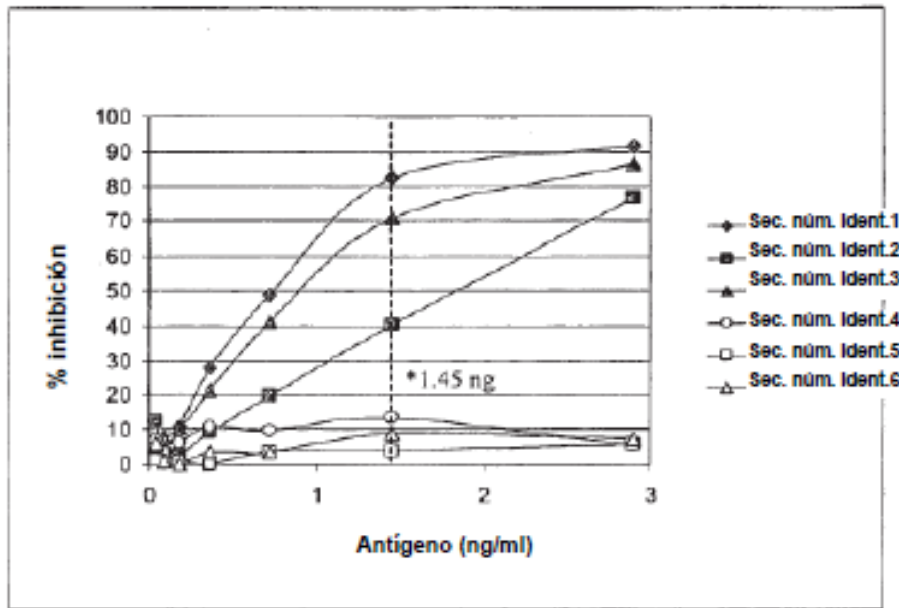


Figura 3

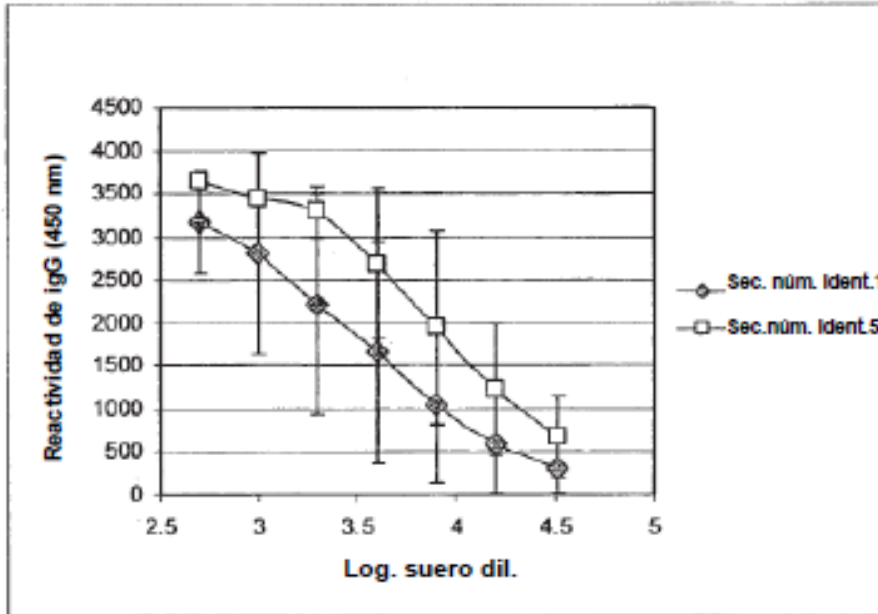


Figura 4

