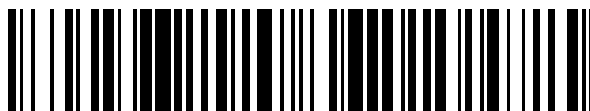


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 669**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2008 E 08773765 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2190865**

54 Título: **Moléculas hipoalergénicas**

30 Prioridad:

21.08.2007 EP 07450145

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

28.08.2014

73 Titular/es:

**BIOMAY AG (100.0%)
LAZARETTGASSE 19 TOP 1
1090 WIEN, AT**

72 Inventor/es:

**WALLNER, MICHAEL;
BOHLE, BARBARA;
HAUSER, MICHAEL;
HIMLY, MARTIN;
WOPFNER, NICOLE;
GADERMAIER, GABRIELE;
EGGER, MATTHIAS;
LACKNER, PETER y
FERREIRA, FATIMA**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 488 669 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

Moléculas hipoalergénicas

5 La presente invención se refiere a moléculas hipoalergénicas.

10 En todo el mundo, 10-20 millones de personas padecen alergias al polen y de entre estos pacientes aproximadamente un tercio muestran reacciones alérgicas frente al polen de los árboles. En la zona de clima templado Bet v 1, el principal alérgeno del polen de abedul, representa la mayoría de los casos de polinosis a árboles. Adicionalmente, entre el 50 y el 93% de los individuos alérgicos al polen de abedul desarrollan reacciones de hipersensibilidad frente a alimentos relacionados con polen mediados por anticuerpos IgE con reactividad cruzada dirigidos principalmente contra Bet v 1. Este tipo de hipersensibilidad se describe como síndrome de polen-alimentos (PFS). De ese modo, el contacto de alérgenos con la mucosa oral provoca reacciones adversas inmediatas habitualmente limitadas a la cavidad oral y la faringe. En el caso de alergia al polen de abedul, uno de los alérgenos más frecuentemente implicados con PFS es Mal d 1, el principal alérgeno de la manzana. Mal d 1 comparte el 64% de identidad de secuencia de aminoácidos con Bet v 1 y experimentos de inhibición cruzada demostraron la presencia de epítomos de IgE comunes en ambas moléculas.

20 En Ferreira F *et al.* (FASEB (1998) 12:231-242) se describe la modulación de la reactividad frente a IgE de Bet v 1a mediante introducción de mutaciones puntuales en Bet v 1a de tipo natural. Los autores introdujeron mutaciones en las posiciones 10, 30, 57, 112, 113 y/o 125 de Bet v 1a. Las moléculas de Bet v 1a que tienen mutaciones en estas posiciones no conducen a una pérdida completa de la estructura tridimensional y por tanto a una eliminación de la reactividad frente a IgE. Las mutaciones en estas posiciones condujeron a una disminución de la reactividad frente a IgE para algunos pacientes, pero no para todos, reflejando la naturaleza policlonal de las respuestas de IgE en individuos predispuestos. Por tanto, tales mutaciones no pudieron usarse como enfoque para generar moléculas terapéuticas para la población en general.

30 En Wallner *et al.* (Allergy Clin. Immunol., 120(2) (2007):379-380) se dan a conocer proteínas quiméricas que presentan una baja reactividad frente a IgE y una alta reactividad frente a células T que se han seleccionado de una biblioteca que comprende alérgenos sometidos a intercambio de Bet v 1 y alérgenos homólogos a Bet v 1.

En Larsen *et al.* (Allergy Clin. Immunol., 109(1) (2002):164) se comenta la reactividad cruzada entre Bet v 1 y Mal d 1.

35 Wallner *et al.* (Allergy Clin. Immunol., 109(1) (2002):169) se refiere a la evolución *in vitro* de la familia de Bet v 1 usando métodos de intercambio génico.

En Bolhaar STHP *et al.* (Clin. Exp. Allergy. 35(12) (2005):1638-1644) se da a conocer una variante hipoalérgica de Mal d 1 que comprende 5 mutaciones puntuales.

40 En el documento WO 2007/073907 se dan a conocer variantes hipoalérgicas de Bet v 1. Estas variantes se obtienen mediante mutación de aminoácidos individuales dentro de la molécula de Bet v 1 de tipo natural.

45 Son DY *et al.* (Eur J Nutrition 38(1999): 201-215) describen mutantes de Mal d 1 y Bet v 1. Los autores de dicho estudio encontraron que una mutación específica de residuos de aminoácido conduce a una reducción de la alergenicidad de los alérgenos respectivos.

50 Un objeto de la presente invención es proporcionar una molécula hipoalérgica que no muestre ninguna reactividad frente a IgE, o muestre una reactividad frente a IgE significativamente reducida, en comparación con el alérgeno de tipo natural que puede usarse para tratar el síndrome de polen-alimentos provocado por alérgenos con reactividad cruzada con Bet v 1a.

55 Por tanto, la presente invención se refiere a una molécula hipoalérgica que consiste en Bet v 1a o un alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a que comprende mutaciones de al menos un residuo de aminoácido en la región de los aminoácidos 100 a 125 de Bet v 1a de su región correspondiente del alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a, en la que la mutación de al menos un residuo de aminoácido comprende la mutación del residuo de aminoácido en la posición 114 de Bet v 1a o el alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a.

60 Se encontró sorprendentemente que la mutación de al menos el residuo de aminoácido 114 ya puede conducir a una molécula hipoalérgica que tiene una estructura tridimensional que es diferente del alérgeno de tipo natural correspondiente. La mutación del aminoácido 114 de Bet v 1a o un alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a conducirá a una molécula hipoalérgica. Según una realización preferida de la presente invención esta molécula hipoalérgica comprenderá al menos una (preferiblemente al menos dos, tres, cuatro, cinco) mutación adicional dentro de los aminoácidos 100 a 125 de Bet v 1a o su región correspondiente del alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a. Se prefiere particularmente la molécula hipoalérgica que

comprende una mutación en el residuo de aminoácido 102 y/o 120 de Bet v 1a.

En una realización particular preferida de la presente invención el residuo de aminoácido 114 de Bet v 1a o un alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a se sustituye por lisina (K), ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E). La mutación de al menos cuatro residuos amino en la región de los aminoácidos 100 a 125 de Bet v 1a o un alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a (preferiblemente que tiene una identidad de al menos el 65%, 70%, 75% o el 80%) da como resultado una molécula hipoalérgica que muestra una reactividad frente a IgE sustancialmente reducida o incluso completamente eliminada debido a la pérdida de su estructura tridimensional. La reactividad frente a IgE en el alérgeno mutado es reducida, en comparación con el alérgeno de tipo natural correspondiente. En ensayos biológicos basados en anticuerpos (IgE) (por ejemplo ELISA de inhibición o RAST, liberación de mediador inflamatorio de basófilos), se requieren concentraciones al menos 50, preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 500, incluso más preferiblemente al menos 1000 veces superiores del alérgeno mutado para alcanzar la mitad de los valores máximos obtenidos con el alérgeno de tipo natural. Esto es sorprendente, a la luz de Ferreira F *et al.* (FASEB (1998) 12:231-242), porque en el mismo se mostró que la mutación de tres residuos de aminoácido en esta región no daba como resultado una molécula hipoalérgica con las propiedades de la molécula de la presente invención.

Las propiedades hipoalérgicas de las moléculas hipoalérgicas de la presente invención son una consecuencia de la destrucción de la estructura tridimensional en comparación con el alérgeno de tipo natural. Akdis *et al.* (Akdis CA *et al.* Eur J Immunol. 28(3) (1998):914-25) han demostrado que un alérgeno plegado nativo, en este caso alérgeno de veneno de abeja fosfolipasa A (PLA), induce una respuesta inmunitaria diferente que la versión plegada no nativa de la misma proteína. La PLA plegada induce anticuerpos IgE en células B y estimulaba células T cooperadoras (TH) 2, ambos marcadores de una respuesta inmunitaria alérgica, mientras que la PLA no replegada o reducida y alquilada induce un perfil de citocinas dominado por TH1 conduciendo a una respuesta de IgG4 en células B. Se favorece claramente una respuesta inmunitaria impulsada por TH1 para moléculas que deben usarse como agentes terapéuticos para enfermedades alérgicas. Por tanto, la naturaleza no plegada de las moléculas de la presente invención es crucial.

En particular se prefiere mutar, junto a otros tres residuos de aminoácido, al menos el residuo de aminoácido 113 ó 114 de Bet v 1a o un alérgeno que tiene al menos el 40% de identidad con Bet v 1a.

Según una realización preferida de la presente invención el alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a tiene reactividad cruzada inmunológica con Bet v 1a. En este caso, la reactividad cruzada inmunológica se define por un anticuerpo que se une a una determinada molécula y puede determinarse mediante ELISA usando anticuerpos policlonales de conejo anti-Bet v 1a purificados por afinidad. Se considerará que las moléculas que tienen al menos el 60% de identidad con Bet v 1a y que se reconocen por esos anticuerpos tienen reactividad cruzada inmunológica con Bet v 1a.

Resulta ventajoso que el alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a tenga reactividad cruzada inmunológica con Bet v 1a porque en este caso la molécula hipoalérgica de la presente invención puede usarse para prevenir o tratar el síndrome de polen-alimentos (PFS), porque el sistema inmunitario puede producir anticuerpos que pueden unirse a Bet v 1a así como a alérgenos de alimentos, que en muchos casos muestran al menos el 40% de identidad con Bet v 1a.

Resulta incluso más ventajoso cuando el alérgeno tiene al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% de identidad con Bet v 1a.

El término "identidad", tal como se usa en el presente documento, indica si dos (o más) secuencias de péptido, polipéptido o proteína cualesquiera tienen secuencias de aminoácidos que son "idénticas" en un determinado grado ("% de identidad") entre sí. Este grado puede determinarse usando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa "FASTA", usando, por ejemplo, los parámetros por defecto tal como en Pearson *et al.* (1988) PNAS USA 85: 2444 (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research (1984) Nucleic Acids Res., 12, 387-395), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., *et al.*, J Molec Biol 215: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carillo *et al.* (1988)SIAM J Applied Math 48 : 1073). Por ejemplo, la herramienta BLAST de la base de datos de NCBI puede usarse para determinar la identidad. Otros programas disponibles comercialmente o para el público incluyen el programa "Meg-Align" de DNASTar (Madison,WI) y el programa "Gap" de University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG) (Madison, WI). El porcentaje de identidad de moléculas de proteínas puede determinarse adicionalmente, por ejemplo, comparando información de secuencia usando un programa informático GAP (por ejemplo Needleman *et al.*, (1970) J. Mol. Biol. 48:443, revisado por by Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482). En resumen, el programa GAP define la identidad como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son idénticos, dividido entre el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y para ausencias de identidad) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov *et al.* 14:6745, tal como se describe por Schwartz and Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0

para cada hueco y una penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) ninguna penalización para huecos en el extremo.

5 El alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a (Z80098) está compuesto preferiblemente por Bet v 1 y un alérgeno seleccionado del grupo que consiste en Cas s 1 (AJ417550), Mal d 1, en particular Mal d 1.0302 (AY026908), Mal d 1.0304 (AY186248), Mal d 1.0301 (Z72425), Mal d 1.0402 (Z72427), Mal d 1.0403 (Z72428) o Mal d 1.0401 (Z72426), Pru ar 1, en particular Pru ar 1.0101 (U93165), Cor a 1, en particular Cor a 1.0401 (AF136945), Cor a 1.0404 (AF323975), Cor a 1.0402 (AF323973), Cor a 1.0403 (AF323974), Cor a 1.0301 (Z72440), Cor a 1.0201 (Z72439), Cor a 1/5 (X70999), Cor a 1/11 (X70997), Cor a 1/6 (X71000) o Cor a 1/16 (X70998), Bet v 1d (X77266), Bet v 11 (X77273), Bet v 1a1-6 (Ferreira F *et al.* FASEB (1998) 12:231-242), Bet v 1g (X77269), Bet v 1f (X77268), Bet v 1j (X77271), Bet v 1e (X77267), Bet v 1b (X77200), Bet v 1c (X77265), Bet v 1.0101 (X15877), Bet v 1.0901 (X77272), Bet v 1.1101 (X77599), Bet v 1.1201 (X77600), Bet v 1.1301 (X77601), Bet v 1.1401 (X81972), Bet v 1.1501 (Z72429), Bet v 1.1601 (Z72437), Bet v 1.1701 (Z72430), Bet v 1.1801 (Z72431), Bet v 1.1901 (Z72433), Bet v 1.2001 (Z72434), Bet v 1.2101 (Z72435), Bet v 1.2201 (Z72438), Bet v 1.2301 (Z72436), Bet v 15 1.2401 (Z80100), Bet v 1.2501 (Z80101), Bet v 1.2601 (Z80102), Bet v 1.2701 (Z80103), Bet v 1.2901 (Z80105), Bet v 1.3001 (Z80106), Aln g 1 (S50892), Car b 1, en particular Car b 1.0301 (Z80169), Car b 1.0302 (Z80170), Car b 1.0103 (Z80159), Car b 1.0105 (Z80161), Car b 1.0104 (Z80160), Car b 1/1a, Car b 1.0101 (X66932), Car b 1.0102 (X66918), Car b 1/1b, Car b 1/2, Car b 1.0106a (Z80162), Car b 1.0106b (Z80163), Car b 1.0106c (Z80164), Car b 1.0106d (Z80165), Car b 1.0107a (Z80166), Car b 1.0107b (Z80167), Car b 1.0201 (X66933) o Car b 1.0108 (Z80168), Bet p 1a (AB046540), Bet p 1b (AB046541), Bet p 1c (AB046542), Fag s 1 (AJ130889).

Mal d 1 (SEQ ID No. 2) es particularmente adecuado.

25 Según una realización preferida de la presente invención la al menos una mutación de al menos un residuo de aminoácido es una sustitución, delección o adición de aminoácido.

Se prefiere sustituir residuos de aminoácido individuales o tramos de residuos de aminoácido dentro de la molécula, porque en tal caso la longitud de la molécula hipoalérgica no se ve afectada en absoluto en comparación con Bet v 1a.

30 Según una realización preferida de la presente invención la región mutada de Bet v 1a o su región correspondiente del alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a comprende los aminoácidos 105 a 120, preferiblemente los aminoácidos 108 a 118, más preferiblemente los aminoácidos 109 a 116, de Bet v 1a o su región correspondiente del alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a.

35 Según una realización preferida de la presente invención la al menos una mutación comprende la sustitución de dicha región por la región correspondiente de otro alérgeno seleccionado del grupo que consiste en Bet v 1a y un alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a.

40 Debido a las sustituciones de dichas regiones es posible no sólo crear una molécula hipoalérgica que comprende epítopos de células T de Bet v 1a o un alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a, sino también moléculas que comprenden epítopos de Bet v 1a posiblemente específicos o epítopos del alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a. Esto permite administrar a un individuo que padece o que corre el riesgo de padecer una alergia de polen-alimentos una vacuna que comprende dicha molécula hipoalérgica, que puede 45 provocar la formación de una respuesta inmunitaria no sólo contra un primer alérgeno sino también contra un segundo alérgeno.

Según otra realización preferida de la presente invención la molécula consiste en Bet v 1 y la región de los aminoácidos 109 a 116 de Bet v 1 se sustituye por la región correspondiente de Mal d 1 (dando como resultado SEQ ID No. 3).

50 Según una realización particular preferida de la presente invención la molécula consiste en Mal d 1 y la región de los aminoácidos 109 a 116 de Mal d 1 se sustituye por la región correspondiente de Bet v 1.

55 Bet v 1a o un alérgeno que comparte al menos el 60% de identidad con Bet v 1a puede modificarse sustituyendo al menos una parte de dicha región definida por un fragmento de aminoácidos que puede derivarse de otro alérgeno, mediante lo cual dicho fragmento es de la misma región que la región que va a sustituirse.

60 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica para una molécula hipoalérgica según la presente invención.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la presente invención.

65 El vector de la presente invención comprende un fragmento de ácido nucleico que codifica para la molécula hipoalérgica de la presente invención y elementos de vector que permiten su reproducción en organismos

procariotas (por ejemplo bacterias). Estos vectores comprenden secuencias de polinucleótido funcionales tales como promotores, sitios de unión transcripcionales, etc. El vector también puede ser un plásmido o vector viral.

5 Con el fin de facilitar la purificación de la molécula hipoalérgica, dicha molécula puede fusionarse a una etiqueta, en particular a una histidina o glutatión-S-transferasa. Por tanto, pueden usarse vectores de expresión adecuados conocidos en la técnica.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una preparación de vacuna que comprende una molécula hipoalérgica según la presente invención.

Según una realización preferida de la presente invención dicha preparación comprende además al menos un excipiente, diluyente, adyuvante y/o portador farmacéuticamente aceptable.

15 Con el fin de proporcionar una formulación de vacuna que puede administrarse por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, mucosa, etc. a un individuo, la formulación tiene que comprender excipientes, diluyentes, adyuvantes y/o portadores adicionales. Los adyuvantes preferidos usados comprenden KLH (hemocianina de lapa californiana) y alumbre. El experto en la técnica conoce protocolos adecuados para la producción de formulaciones de vacuna y pueden encontrarse, por ejemplo, en "Vaccine Protocols" (A. Robinson, M.P. Cranage, M. Hudson; Humana Press Inc., EE.UU.; 2ª edición 2003).

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la molécula hipoalérgica según la presente invención para la fabricación de una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de alergias.

25 La molécula hipoalérgica de la presente invención puede usarse para tratar y prevenir alergias, en particular alergias asociadas con síndrome de polen-alimentos, en las que los pacientes que padecen polinosis también experimentan alergias alimentarias (estas pueden provocar por ejemplo desde picor y prurito alrededor de la cavidad oral hasta urticaria generalizada e incluso anafilaxia). En el síndrome de polen-alimentos, un individuo se sensibiliza en primer lugar mediante inhalación de alérgenos presentes en el polen. Después de eso, comienzan a provocarse síntomas de tipo inmediato cuando el individuo entra en contacto con cualquier alimento derivado de plantas que contiene proteínas con reactividad cruzada con el alérgeno de sensibilización. Tras completarse la sensibilización por vía oral, se provocan síntomas alérgicos siempre que el paciente entra en contacto con la misma proteína. Bet v 1a es un alérgeno con alta reactividad cruzada que puede reaccionar de manera cruzada con un gran número de alérgenos derivados de alimentos, en particular derivados de verduras y frutas. Por tanto, un individuo que padece una alergia al polen provocada por Bet v 1a también puede ser alérgico a alergias derivadas de alimentos.

35 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin limitarse sin embargo a los mismos.

40 La figura 1 muestra (A) una representación esquemática del alérgeno mutante de 160 aminoácidos de longitud (incluyendo la metionina de inicio) BM1,2,3,5. La proteína se construyó injertando epítomos de Mal d 1.0108 que consisten en 7 aminoácidos consecutivos en el alérgeno de molde Bet v 1a. Los tramos de aminoácidos coincidentes de Bet v 1a se muestran en blanco, los epítomos insertados a partir de Mal d 1.0108 en gris. Los aminoácidos que componen los epítomos cambiados se indican en código de una letra. Los residuos idénticos en ambas proteínas se presentan en negro, los aminoácidos diferentes en gris. (B) Se calculó un modelo de BM1,2,3,5 y se comparó la estructura con el plegamiento en 3 dimensiones de Bet v 1. Los residuos idénticos en BM1,2,3,5 y Bet v 1a se muestran en gris, los epítomos derivados de Mal d 1.0108 se presentan en negro. El panel inferior muestra las proteínas giradas 180°C. (C) Se comparó la estructura secundaria de BM1,2,3,5 con Bet v 1 mediante difracción circular (CD). Los datos se presentan como elipticidad molar por residuo media $[\theta]_{MRW}$ a una longitud de onda dada y corregida con respecto a la línea base.

50 La figura 2 muestra (A) un análisis de SDS-PAGE e inmunotransferencia de BM1,2,3,5 purificado por afinidad (cada uno 5 µg por carril). Tras la SDS-PAGE, se visualizaron las proteínas mediante tinción con azul brillante de Coomassie (panel izquierdo). Para el análisis de inmunotransferencia, se detectaron las proteínas usando un anticuerpo de ratón monoclonal anti-Bet v 1. (B) En ELISA se evaluó la actividad de unión a IgE de Bet v 1a, Mal d 1.0108 y BM1,2,3,5 usando sueros de pacientes alérgicos a Bet v 1 sin síntomas clínicos de PFS (n= 12) o pacientes alérgicos a Bet v 1 que padecían PFS a la manzana y otros alimentos relacionados con Bet v 1 (n= 11). Se titularon los alérgenos para el recubrimiento y se determinó que la concentración de recubrimiento con antígeno óptima era de 0,5 mg/ml. No se observó ninguna diferencia significativa para ambos grupos de pacientes con respecto a la unión de IgE hacia Bet v 1 ($P > 0,99$). Tal como se esperaba, la unión de IgE hacia Mal d 1 fue más fuerte en el grupo con PFS. Con respecto a BM1,2,3,5 mutante, los pacientes con PFS mostraron una unión a IgE significativamente aumentada ($P < 0,01$). Los símbolos representan los pacientes individuales, las barras las medias. Los valores de P se calcularon mediante la prueba de la t (** $P < 0,01$).

65 La figura 3 muestra esquemáticamente el alérgeno mutante BM4 según el ejemplo 2.

La figura 4 muestra una alineación mediante Clustal W de Bet v 1a y BM4. El epítomo intercambiado de BM4 está

subrayado, el epítipo de células T inmunodominante de Bet v 1a se indica en cursiva y negrita. Los aminoácidos en negrita representan el “núcleo” del intercambio de epítipo, que son los aminoácidos que se encuentra que son críticos para la unión a IgE de los pacientes de Bet v 1.

5 La figura 5 muestra una alineación mediante Clustal W de Mal d 1.0108 y BM4. El epítipo intercambiado de BM4 está subrayado. Los aminoácidos en negrita representan el “núcleo” del intercambio de epítipo, que son los aminoácidos que se encuentra que son críticos para la unión a IgE de los pacientes de Bet v 1.

La figura 6 muestra una SDS-Page de BM4.

10 La figura 7 muestra espectros de CD de Bet v 1a en comparación con BM4 a 20°C y a 95°C. Todas las curvas están corregidas con respecto a la línea base; los datos se presentan como elipticidad molar por residuo media. Se determinaron las concentraciones de proteína mediante análisis de aminoácidos. BM4 muestra el espectro de CD típico de proteínas enrolladas al azar a 20°C así como a 95°C.

15 La figura 8 muestra un ELISA de Bet v 1a (Biomay), BM4 y ovalbúmina. Se adquirió ovalbúmina de Sigma-Aldrich como antígeno de control irrelevante. Se inmovilizaron alérgenos (200 ng/pocillo) a la fase sólida. Todas las mediciones se realizaron como duplicados; los resultados se presentan como valores de DO media tras restar el fondo. Se sometieron a prueba sueros de 13 individuos alérgicos al polen de abedul. Como control se usó NHS lo que no dio ninguna señal frente a ninguna de las proteínas. BM4 no muestra prácticamente ninguna unión a IgE de los pacientes en el ELISA.

20 La figura 9 muestra la actividad alérgica de BM4 evaluada sensibilizando células RBL-2H3 transfectadas con huFcεRI con IgE sérica de pacientes alérgicos al polen de abedul. BM4 muestra una actividad anafiláctica reducida 100-1000 veces en comparación con Bet v 1a.

25 La figura 10 muestra la determinación de respuestas proliferativas de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes alérgicos al polen de abedul estimuladas con 25, 12,5, 6,25 ó 3 µg/ml de BM4 o Bet v 1a con etiqueta de 6x his. Se encontró que los índices de estimulación (SI) promedio de BM4 eran superiores a los de Bet v 1a. Los símbolos representan pacientes individuales, las barras las medianas.

30 La figura 11 muestra la secuencia de Bet v 1 (1bv1) obtenida del banco de datos de proteínas PDB. La zona de la secuencia que se ha sustituido en la proteína mutante BM4 se indica mediante un recuadro.

35 La figura 12 muestra la zona de la secuencia que se ha sustituido en la proteína mutante BM4. Un epítipo de células T relevante de Bet v 1 (SILKISNKYHTK; SEQ ID No. 4) reconocido por el 41% de los pacientes se indica en cursiva y negrita. Un péptido anterior (DGGSSILKISNK; SEQ ID No. 5) se reconoce por el 6%, el péptido posterior (KISNKYHTKGDH; SEQ ID No. 6) por ninguno de los pacientes. Los datos de CMSP hasta ahora no mostraron una estimulación de células T reducida sino más bien una mejor. Por tanto no puede esperarse ningún problema con respecto a las propiedades de estimulación de células T de BM4.

40 La figura 13 muestra una alineación de múltiples secuencias mediante Clustal W de Bet v 1 y sus alérgenos homólogos encontrados en otras fuentes de polen, frutas, frutos secos o verduras, incluyendo isoformas. El epítipo sustituido en Bet v 1a se substituyó por uno de Mal d 1.0108 en BM4.

45 La figura 14 muestra un cálculo de puntuaciones Z de diferentes mutantes de Bet v 1a con injerto de epítopos de Mal d 1.0108. Por tanto se substituyeron tramos con secuencias no idénticas, solapantes (10aa; n=103) de Mal d 1.0108 en la estructura de Bet v 1a y se calcularon puntuaciones Z usando la herramienta de software ProSa II. Este software usa potenciales basados en conocimiento derivados de estructuras de proteínas conocidas y captura las propiedades promedio de proteínas globulares nativas en cuanto a interacciones de pares de átomos y disolvente para generar puntuaciones que reflejan la calidad de las estructuras de proteínas (Sippl M.J, Proteins 17:355-362, 1993). Los cálculos revelaron que la sustitución de epítopos de los aminoácidos 109-116 (SGSTIKSI; SEQ ID No. 7) de Mal d 1.0108 en Bet v 1a es una de las sustituciones más desestabilizantes que dan una alta puntuación Z. Con respecto a la estructura de proteína, esto explica la naturaleza no plegada del alérgeno mutante BM4.

50 La figura 15 muestra una representación esquemática de los alérgenos mutantes BM1, BM2, BM3, BM4, BM5, BM1,2,3,4,5 y BM1,2,3,5. Los alérgenos se produjeron mediante injerto de epítipo a partir de Mal d 1.0108 en el andamiaje de Bet v 1a. Las secuencias de epítipo injertadas se indican en la figura, los aminoácidos idénticos a Bet v 1a se muestran en negrita, los aminoácidos insertados de Mal d 1.0108 están subrayados. Los alérgenos mutantes se expresaron en *E. coli*. El plegamiento similar a Bet v 1 de los diferentes alérgenos mutantes o bien se evaluó mediante unión a anticuerpo en una transferencia puntual o bien mediante espectroscopía de dicroísmo circular de los alérgenos purificados. Los alérgenos mutantes que portan el epítipo 109-116 (SGSTIKSI; SEQ ID No. 7) de Mal d 1.0108 no muestran plegamiento similar a Bet v 1, sin embargo el alérgeno mutante que porta otros epítopos de Mal d 1.0108 pudo plegarse de una manera similar a Bet v 1.

65 La figura 16 demuestra la capacidad reducida de BM4 para unirse a IgE de pacientes específica para Bet v 1, en

comparación con Bet v 1a de tipo natural, según se analizó mediante inhibición por ELISA. Se inmovilizaron 200 ng/pocillo de Bet v 1a en una placa de ELISA, se incubaron sueros de pacientes con diluciones en serie del inhibidor respectivo (por ejemplo Bet v 1a, BM4 u OVA como antígeno de control irrelevante). Todas las mediciones se realizaron como duplicados; los resultados se presentan como valores de DO media tras restar el fondo. Se sometieron a prueba sueros de 5 individuos alérgicos al polen de abedul. Como control se usó NHS que no dio ninguna señal frente a ninguna de las proteínas. En comparación con Bet v 1a, BM4 mostró una capacidad de unión a IgE de pacientes reducida aproximadamente 100-1000 veces.

La figura 17 muestra una inmunotransferencia de BM4, Bet v 1a y OVA usado como antígeno de control irrelevante. Se detectó IgE sérica unida usando anticuerpo de conejo marcado con 125 I anti-IgE humana (MedPro). BM4 no muestra prácticamente ninguna unión a IgE. Como controles se usaron suero humano normal o sólo el anticuerpo de detección.

Figura 18: se evaluó la homogeneidad de BM4 mediante dispersión de la luz en línea-SEC usando UV y red de detección triple (SECTDA). BM4 apareció como un único pico con un volumen de retención de 9,3 ml que tenía un P.M. aproximado de 20 kDa y un R_H de $>3,2$ nm (a). La asimetría de pico observada puede haberse debido a efectos de adsorción y alto R_H debido a una conformación extendida de proteína no plegada. Se calibraron los detectores con albúmina sérica bovina (BSA) que tenía un P.M. de 66 kDa y un R_H de 3,1 nm. Se comprobó la idoneidad del sistema mediante rBet v 1a que tenía un P.M. de 17 kDa y un R_H de 1,9 nm. Se observó más del 99% de homogeneidad de BM4 no agregado ya que no se detectó ningún pico adicional entre el vacío (5,7 ml) y el volumen de retención total (12 ml) de SEC (b). Se realizaron series de HPSEC usando una columna TSKgel G2000_{SWXL} de 7,8 x 300 mm (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania) en un sistema de cromatografía analítica HP1100 (Hewlett-Packard, San Jose, CA, EE.UU.) a 0,5 ml/min en PBS. Usando una combinación del detector de UV incorporado que mide a 280 nm y un sistema de detección (TDA 302, Viscotek Corp., Houston, TX, EE.UU.) de índice de refracción secuencial (RI, línea discontinua de trazo corto), viscosidad intrínseca (IV, línea discontinua de trazo y punto) y dispersión de la luz (RALS, línea discontinua de trazo largo) se determinaron el peso molecular aproximado (P.M., línea continua) y el radio hidrodinámico (R_H , línea discontinua de trazo y dos puntos).

La figura 19 muestra el comportamiento de agregación de BM4 en disolución mediante dispersión de luz dinámica (DLS). Más del 97% de BM4 apareció como molécula monomérica con un radio hidrodinámico (R_H) de 3,5 nm y una polidispersidad del 18,4% (a). Como referencia, rBet v 1a presentó un R_H de 2,1 nm con una polidispersidad del 16,7% (b). Por tanto, BM4 adoptó un R_H superior, lo que se debía probablemente a su estado no plegado. Además, $<3\%$ de BM4 apareció como multímero con un peso molecular >1 MDa. Se realizó dispersión de luz dinámica en un instrumento DLS 802 (Viscotek Corp., Houston, TX, EE.UU.) tras centrifugación durante 10 min a 14,000 x g en fosfato de sodio 10 mM. Se usó la configuración de disolvente para agua. Se acumularon datos durante 10 - 20 x 10 s y se ajustó la función de correlación a la curva de datos combinados, a partir de lo cual se calculó la distribución de masa mediante el paquete de software OmniSize™ (Viscotek).

Figura 20: Se sometieron Bet v 1 recombinante purificado, BM4, Mal d 1, Dau c 1, Api g 1, Cor a 1, proteína PR-10 de *Arabidopsis thaliana*, proteína PR-10 de *Thermus thermophilus* y proteína PR-10 de *Methanosarcina mazei* (3 μ g por carril) a SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie (a). ELISA usando anticuerpos de conejo policlonales anti-Bet v 1 (1:5000) para la demostración de la reactividad cruzada de BM4 y proteínas homólogas (b). Bet v 1 recombinante, BM4 y Cor a 1 se reconocieron ampliamente por el anticuerpo de conejo, y también pudo demostrarse reactividad cruzada estructural para Dau c 1, Mal d 1 y Api g 1. No se obtuvieron señales positivas con proteínas PR-10 purificadas de *Arabidopsis thaliana*, *Thermus thermophilus* y *Methanosarcina mazei*. Identidad de secuencia de las proteínas PR-10 mencionadas anteriormente en comparación con BM4 (c). Se realizó un gráfico de identidad y alineación de aminoácidos con AlignX (Vector NTI, Invitrogen).

La figura 21 muestra una representación esquemática de los alérgenos mutantes MB1, MB2, MB3, MB4, MB5 y MB1,2,3,4,5. Los alérgenos se produjeron mediante injerto de epítipo a partir de Bet v 1a en el andamiaje de Mal d 1.0108. Las secuencias de epítipo injertadas se indican en la figura, los aminoácidos idénticos a Mal d 1.0108 se muestran en negrita, los aminoácidos insertados de Bet v 1a en gris. Los alérgenos mutantes se expresaron en *E. coli*. Se encontró que el plegamiento de Bet v 1 y sus homólogos encontrados en otras fuentes de polen así como de alimentos era muy similar tal como se demuestra mediante análisis cristalográfico de rayos X (Gajhede M, Nat Struct Biol. diciembre de 1996; 3(12):1090-5.; Neudecker P, J Biol Chem. 22 de junio de 2001; 276(25):22756-63. Epub 3 de abril de 2001; Schirmer T, J Mol Biol. 2 de septiembre de 2005; 351(5):1101-9.). Este plegamiento común da como resultado una buena reactividad cruzada de anticuerpos.

Por tanto se evaluó el plegamiento similar a Bet v 1 de los diferentes alérgenos mutantes de Mal d 1.0108 mediante unión a anticuerpo en una transferencia puntual usando o bien suero de pacientes alérgicos al polen de abedul o bien anticuerpos policlonales de conejo anti-Bet v 1 purificados por afinidad, que se mostró que tenían reactividad cruzada con Mal d 1. Basándose en estos resultados de inmunotransferencia, los alérgenos mutantes que portan el epítipo 109-116 (DGGSILKI) de Bet v 1a no muestran plegamiento similar a Bet v 1; sin embargo los alérgenos mutantes que portan otros epítopos de Bet v 1a pudieron plegarse de una manera similar a Bet v 1.

Ejemplos:

Ejemplo 1:

5 El síndrome de polen-alimentos (PFS) es una asociación de alergias alimentarias a frutas, frutos secos y verduras en pacientes con alergia al polen. Mal d 1, el principal alérgeno de la manzana, es uno de los alérgenos alimentarios más comúnmente asociado para pacientes alérgicos al polen de abedul que padecen PFS. Inmunológicamente, esto está provocado por anticuerpos IgE con reactividad cruzada que surgen originalmente contra el alérgeno principal del polen de abedul, Bet v 1.

10 Aunque los anticuerpos IgE específicos para Bet v 1 tienen reactividad cruzada con Mal d 1, no todos los pacientes alérgicos a Bet v 1 desarrollan reacciones clínicas frente a la manzana. Esto muestra que epítomos de IgE diferenciados presentes en ambos alérgenos homólogos son responsables de la manifestación clínica de PFS. Para someter esto a prueba se injertaron cuatro tramos de Mal d 1 en Bet v 1. Las regiones injertadas tenían 7 aminoácidos de longitud abarcando residuos de aminoácido que se muestra que son cruciales para el reconocimiento por parte de IgE de Bet v 1.

20 Se expresó la proteína quimérica de Bet v 1-Mal d 1 denominada BM1,2,3,5 en *E. coli* y se purificó hasta la homogeneidad. Se sometió BM1,2,3,5 a prueba con sueros de pacientes de i) pacientes alérgicos a Bet v 1 que no mostraban ningún síntoma clínico tras la ingestión de manzanas y ii) pacientes alérgicos a Bet v 1 que mostraban síntomas clínicos tras la ingestión de manzanas y otros alimentos relacionados con Bet v 1. Se evaluó la unión de la IgE de los pacientes mediante ELISA.

25 Los pacientes que padecían PFS reaccionaron de manera más fuerte con BM1,2,3,5 en comparación con los individuos alérgicos únicamente al abedul. Por tanto, se identificaron satisfactoriamente epítomos de células B de Bet v 1 implicados en la alergia a la manzana.

*Métodos**Sueros de pacientes:*

30 Se seleccionaron pacientes alérgicos al polen de abedul con y sin PFS basándose en la historia clínica típica, prueba de punción positiva y prueba radioalergosorbente (RAST) de clase ≥ 3 . Se confirmó la correlación entre los síntomas clínicos y la unión de IgE relativa a Bet v 1 y Mal d 1 para ambos grupos de pacientes mediante ELISA usando los antígenos respectivos.

Clonación de BM1,2,3,5

40 Se generó BM1,2,3,5 mediante amplificación por PCR de fragmentos mutados de Bet v 1a (X15877). Los cebadores de apareamiento erróneo internos para la clonación fueron

Mut10F 5'CGCCATTGTTTTCAATTACGAAAaTGAGttCACCTCTGagATC3' (SEQ ID No. 8),

Mut30F 5'GATGGCGATAATCTCaTTCCAAAGaTTGCACCCCAA3' (SEQ ID No. 9),

45 Mut30R 5'ATGGCTTGGGGTGCAAtCTTTGAAAtGAGATTATCG3' (SEQ ID No. 10),

Mut57F 5'ATTAAGAAGATCAcTTTgCGAAGGCTTC3' (SEQ ID No. 11),

50 Mut57R 5'GAAGCCTTCGccAAAGgTGATCTTCTTAAT3' (SEQ ID No. 12),

Mut125F 5'CACACCAAAGGTaACatTGAGaTcAAGGCAGAGCAG3' (SEQ ID No. 13),

Mut125R 5'CTGCTCTGCCTTgAtCTCAatGTtACCTTTGGTGTG3' (SEQ ID No. 14).

55 Las bases intercambiadas se indican en minúsculas. Se purificaron en gel los fragmentos mutados, se combinaron y se ensamblaron en una PCR sin cebadores. Se amplificaron genes de longitud completa con los cebadores BetF 5'GGCCCATATGGGTGTTTTCAATTACGAA3' (SEQ ID No. 15) y BetR 5'TCGGCTCGAGTTGTAGGCATCGGAGTG3' (SEQ ID No. 16). Los sitios de restricción están subrayados. Se clonó BM1,2,3,5 en un vector pHis-Parallel2 usando sitios de restricción de Nde I y Xho I (Wallner M *et al.*, Methods 2004, 32(3):219-26).

Expresión y purificación de BM4

65 Se transformaron plásmidos de expresión en células *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Stratagene) y se hicieron crecer a 37°C hasta una DO600 de 0,8 en medio LB complementado con ampicilina 100 mg/l. Se enfriaron los cultivos hasta 16°C y se indujo la expresión de proteínas mediante adición de isopropil-5-D-tiogalactopiranosido 0,3 mM (IPTG).

Tras la incubación durante 18 h, se recogieron las células mediante centrifugación a baja velocidad y se suspendieron en tampón de lisis apropiado. Se expresó BM1,2,3,5 como una proteína de fusión con etiqueta de 6xHis y se purificó a partir de lisados bacterianos solubles mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (Wallner M *et al.*, Methods 2004, 32(3):219-26). Se dializaron proteínas recombinantes frente a tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4 y se almacenaron a -20°C.

SDS-PAGE e inmunotransferencias

Se analizaron lisados de *E. coli* y proteínas purificadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio desnaturante (SDS-PAGE) usando geles al 15%. Se visualizaron las proteínas mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250 (Biorad).

Para el análisis de inmunotransferencia, se sometieron proteínas separadas mediante SDS-PAGE a electrotransferencia sobre membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell). Se detectaron las proteínas usando el anticuerpo monoclonal anti-Bet v 1, BIP-1 (1:10.000) (Ferreira F *et al.*, FASEB 1998, 12:231-242). Se detectó BIP-1 unido con un anticuerpo de conejo conjugado con AP anti-IgG + IgM de ratón (Immunoresearch Laboratories Inc.).

Dicroísmo circular

Se registraron espectros de dicroísmo circular (CD) de proteínas en fosfato de sodio 5 mM, pH 7,4, con un espectropolarímetro JASCO J- 810 (Jasco) equipado con un sistema de control de la temperatura Neslab RTE-111M (Thermo Neslab Inc.). Se corrigieron las curvas obtenidas con respecto a la línea base; los resultados se presentan como elipticidad molar por residuo media $[\theta]_{MRW}$ a una longitud de onda dada. Se determinaron las concentraciones de proteína para señales de CD de normalización a 00280.

Modelización molecular

Se realizó la modelización usando la herramienta de modelización comparativa MODELLER y se evaluó mediante ProSa2003. Todos los modelos se basan en el archivo de estructura de PDB 1bv1 (Bet v 1) y se presentan usando PyMOL 0.98.

Experimentos ELISA

Para experimentos ELISA para IgE, se recubrieron placas Maxisorp (NUNC) con titulaciones de alérgeno en 50 μ l de PBS/pocillo durante la noche a 4°C. Se bloquearon las placas con TBS, pH 7,4, Tween al 0,05% (v/v), BSA al 1% (p/v) y se incubaron con sueros de pacientes diluidos 1:5 durante la noche a 4°C. Se detectó la IgE unida con anticuerpos monoclonales conjugados con fosfatasa alcalina anti-IgE humana (BD Biosciences Pharmingen), tras la incubación durante 1 h a 37°C y 1 h a 4°C. Alternativamente, se recubrieron Bet v 1 y proteínas homólogas a 4 μ g/ml en 50 μ l de PBS/pocillo durante la noche a 4°C. Se realizó el bloqueo tal como se describió anteriormente y se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-rBet v 1 usando diferentes diluciones (1:5.000-1:20.000). Se realizó la detección con anticuerpo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina anti-conejo. Se usó fosfato de 4-nitrofenilo 10 mM (Sigma-Aldrich) como sustrato y se midió la DO a 405/492 nm. Se realizaron mediciones como triplicados (ELISA de IgE) o duplicados (anticuerpo de conejo anti-Bet v 1); los resultados se presentan como valores de DO media.

Resultados

El objetivo del presente ejemplo fue la identificación de epítomos de células B con reactividad cruzada responsables de la manifestación clínica de PFS relacionada con Bet v 1 frente a la manzana. Por tanto el alérgeno mutante BM1,2,3,5 se diseñó para implicar a epítomos diferenciados de Mal d 1.0108 en posiciones correspondientes de la secuencia de Bet v 1a (figura 1A). Las regiones injertadas se definieron como tramos de 7 aminoácidos consecutivos que abarcaban residuos que ya se describió que eran cruciales para el reconocimiento por parte de IgE de Bet v 1 y homólogos. Estos residuos particulares (Thr10, Phe30, Ser57 y Asp125 en Bet v 1a) no sólo podían alterar la unión de IgE a Bet v 1, sino que además el reconocimiento por parte de IgE de Mal d 1 es altamente dependiente de aminoácidos en las posiciones correspondientes. La introducción de mutaciones diferenciadas en los sitios descritos no cambia la estructura global de los alérgenos tal como se demuestra mediante dicroísmo circular (CD), aunque esto puede influir drásticamente sobre la alergenicidad de las moléculas. Investigando la unión de IgE de pacientes a BM1,2,3,5, los epítomos injertados sirven como indicador para reactividad cruzada de Bet v 1 y Mal d 1. Dado que los epítomos de IgE de Bet v 1 son conformacionales, una estructura intacta del híbrido era esencial. En primer lugar se evaluó el plegamiento tridimensional de BM1,2,3,5 calculando un modelo molecular que entonces se comparó con la estructura en 3-D de Bet v 1. El modelo mostró la misma forma conservada que el alérgeno molde. Los 4 epítomos mutados se expusieron en la superficie de la proteína y por tanto podían influir en la unión de anticuerpo a BM1,2,3,5 (figura 1B). Se clonó el alérgeno mutante calculado, se expresó en *E. coli* como proteína de fusión con etiqueta de 6xHis y se purificó hasta la homogeneidad. Para verificar datos *in silico* sobre la estructura de la proteína, se registraron espectros de CD en UV lejano de BM1,2,3,5 y Bet v 1a y se compararon tras la normalización de las

señales a unidades de [θ]MRW. El solapamiento de ambos espectros indicó estructuras secundarias casi idénticas (figura 1C). Se proporcionaron evidencias adicionales de plegamiento similar mediante unión a anticuerpo de un anticuerpo monoclonal anti-Bet v 1 que era equivalente para ambas proteínas, una indicación adicional de un plegamiento similar a Bet v 1 de BM1,2,3,5 (figura 2A). Para investigar la unión a anticuerpo IgE de BM1,2,3,5, se realizaron experimentos ELISA con 2 grupos de pacientes: i) pacientes alérgicos a Bet v 1 sin PFS y ii) pacientes alérgicos a Bet v 1 que mostraban síntomas de PFS tras la ingestión de manzana. Como referencia se usaron los alérgenos Bet v 1a y Mal d 1.0108. No se observó ninguna diferencia significativa en la unión de IgE de pacientes frente a Bet v 1 ($P > 0,99$) en ninguno de los dos grupos. La unión de IgE a Mal d 1.0108 fue más fuerte para el grupo de PFS en comparación con los pacientes sin PFS, aunque estos últimos también reconocieron el alérgeno principal de la manzana en ELISA. Sin embargo la unión de IgE a BM1,2,3,5 fue significativamente reducida en el grupo sin PFS en comparación con los pacientes con PFS ($P < 0,01$) (figura 2B). Los datos de ELISA demuestran que los epítomos injertados están implicados en el PFS de polen de abedul. Los anticuerpos IgE de individuos alérgicos a Bet v 1 sin PFS no pudieron unirse eficazmente a BM1,2,3,5, sin embargo los anticuerpos con reactividad cruzada de individuos con PFS todavía podían reconocer el alérgeno mutado.

Ejemplo 2:

El alérgeno mutante BM4 se basa en la estructura principal de proteína de Bet v 1a en la que se ha sustituido un epítomo de 8 aminoácidos por un epítomo de Mal d 1.0108. La incorporación del epítomo de Mal d 1 da como resultado una proteína que no puede plegarse de una manera similar a Bet v 1 y permanece sin plegar; sin embargo la proteína sin plegar permanece en disolución y es estable.

Se clonó BM4 con 5' Nco I, 3' Eco R I en el vector pHis-Parallel2 y se produjo como una proteína de fusión con etiqueta de 6x his con una etiqueta de his N-terminal en *E. coli* BL21 (DE3). Se purificó la proteína a partir de la fracción insoluble de *E. coli* usando un tampón de urea 6 M que contenía Ni^{2+} , se cargó en una columna de Ni^{2+} , se replegó en la columna y se eluyó con imidazol. Posteriormente se escindió la proteína con etiqueta de his purificada con proteasa de rTEV, se purificó de nuevo BM4 sin etiqueta mediante IMAC y se dializó frente a tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 8. El rendimiento de un cultivo de LB Amp de 1 l fue de aproximadamente 200 mg de BM4 tras la purificación.

Se monitorizó la pureza de la proteína mediante SDS-PAGE que indicó una pureza de más del 99%, se verificó la masa correcta de la proteína intacta mediante espectrometría de masas ESI-Q TOF (masa mediada de 17690; masa de proteína promedio calculada de 17689 Da). Se determinó el estado de agregación de BM4 mediante cromatografía de exclusión molecular. El contenido de agregados de peso molecular superior fue inferior al 0,5%, se encontró que el 99,5% de la proteína era monomérica. Se determinó la estructura secundaria de la proteína mediante espectroscopía de dicroísmo circular. Se encontró que la proteína no estaba plegada.

No se detectó ninguna unión de IgE a BM4 en inmunotransferencias usando una combinación de suero de pacientes alérgicos a Bet v 1 y anticuerpo de conejo marcado con I^{125} anti-IgE humana (MedPro) como anticuerpo de detección. En ensayos de liberación de mediador usando células de leucemia basofílica de rata transfectadas con receptor FCεRI humano y sueros de pacientes alérgicos a Bet v 1, se observó una reducción de 100-1000 veces del potencial anafiláctico para BM4 en comparación con Bet v 1a.

Se determinó la proliferación de células T de BM4. Se encontró que las respuestas proliferativas de células mononucleares de sangre periférica humanas (CMSP) establecidas a partir de pacientes alérgicos al polen de abedul eran mayores para BM4 que para Bet v 1a o Mal d 1.0108.

Se requieren modelos preclínicos para caracterizar adicionalmente BM4. Se inmunizaron ratones con BM4 y se han evaluado los parámetros inmunológicos: se determinaron los títulos de IgG así como de IgE frente a Bet v 1a y BM4 mediante ELISA. Además, se evaluó la unión de IgE mediante ensayos de liberación de mediador usando células de leucemia basofílica de rata. Se determinó la inducción de anticuerpos de bloqueo (IgG) frente a Bet v 1a mediante ELISA indirecta con titulaciones de punto final de sueros a partir de ratones inmunizados. Se analizaron las respuestas de células T de ratones mediante ensayos ELISpot, se compararon las células T cooperadoras inducidas mediante inmunización de BM4 con las inducidas mediante inmunización de ratones con Bet v 1a.

Se clonó un constructo de BM4 sin etiqueta de la siguiente manera:

Se insertó BM4 con 5' Nco I y 3' Eco R I en un vector pET 28b (Kan R) y se transformó en células *E. coli* BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen). Se secuenció el constructo y se realizaron pruebas de expresión y purificación de proteína.

Se produjeron los productos de la siguiente manera. Se hicieron crecer células transformadas en un frasco de agitador en 1 l de medio LB amp, se indujo la expresión de proteína con IPTG 0,5 mM a OD600 de 0,8. Se recogieron las células mediante centrifugación a baja velocidad, se rompieron y se recuperó el BM4 de los cuerpos de inclusión insolubles con urea 6 M, imidazol 20 mM, pH 7,4. Se replegó la proteína mediante diálisis frente a tampón de fosfato de sodio 20 mM. Se analizaron elementos de estructura secundaria de BM4 mediante

espectroscopía de dicroísmo circular. Se encontró que BM4 producido como proteína recombinante sin etiqueta en *E. coli* no estaba plegado.

Ejemplo 3:

5 Con el fin de mostrar que la mutación de los residuos de aminoácido 102, 114 y 120 de Bet v 1a da como resultado una molécula hipoalergénica, se han construido varias variantes de Bet v 1a. Todas estas moléculas muestran una reactividad reducida frente a IgE en comparación con Bet v 1a de tipo natural.

10 Tabla 1: Puntuación Z de Bet v 1a y variantes del mismo. La puntuación Z puede usarse para determinar la estructura en 3D de la proteína

	Descripción de la proteína mutante	Número de residuos	Z combinada	Z apareada	Z de superficie
Bet v 1a de tipo natural	1bv1_I102I_L114L_Y120Y	159	-9,18	-6,45	-7,01
	1bv1_I102K_L114D_Y120Q	159	-7,60	-5,74	-5,79
	1bv1_I102K_L114K_Y120R	159	-7,60	-5,77	-5,76
	1bv1_I102D_L114K_Y120K	159	-7,59	-5,87	-5,72
	1bv1_I102E_L114D_Y120K	159	-7,59	-5,74	-5,80
	1bv1_I102E_L114K_Y120D	159	-7,59	-5,92	-5,68
	1bv1_I102K_L114E_Y120Q	159	-7,59	-5,81	-5,76
	1bv1_I102K_L114N_Y120E	159	-7,59	-5,76	-5,77
	1bv1_I102D_L114D_Y120E	159	-7,58	-5,66	-5,83
	1bv1_I102E_L114E_Y120K	159	-7,58	-5,81	-5,77
	1bv1_I102K_L119D_Y120D	159	-7,58	-5,82	-5,72
	1bv1_I102D_L114E_Y120E	159	-7,57	-5,73	-5,79
	1bv1_I102K_L114E_Y120D	159	-7,57	-5,90	-5,68
	1bv1_I102K_L114K_Y120S	159	-7,57	-5,90	-5,65
	1bv1_I102K_L114Q_Y120E	159	-7,57	-5,73	-5,78
	1bv1_I102Q_L114K_Y120E	159	-7,57	-5,71	-5,78
	1bv1_I102K_L114K_Y120N	159	-7,56	-5,87	-5,66
	1bv1_I102K_L114K_Y120P	159	-7,55	-5,82	-5,64
	1bv1_I102D_L114K_Y120E	159	-7,59	-5,79	-5,70
	1bv1_I102E_L114D_Y120E	159	-7,54	-5,65	-5,79
	1bv1_I102E_L114K_Y120K	159	-7,54	-5,86	-5,68
	1bv1_I102K_L114K_Y120G	159	-7,54	-5,86	-5,65
	1bv1_I102EI_L114E_I120E	159	-7,53	-5,72	-5,75
	1bv1_I102K_L114D_Y120K	159	-7,53	-5,76	-5,72
	1bv1_I102K_L114E_Y120K	159	-7,52	-5,83	-5,68
	1bv1_I102K_L114K_Y120Q	159	-7,51	-5,77	-5,67
	1bv1_I102E_L114K_Y120E	159	-7,49	-5,77	-5,67
	1bv1_I102K_L114D_Y120E	159	-7,48	-5,67	-5,70
	1bv1_I102K_L114K_Y120D	159	-7,48	-5,85	-5,60
	1bv1-I102K-L114E-Y120E	159	-7,47	-5,74	-5,66
	1bv1_I102K_L114K_Y120K	159	-7,44	-5,79	-5,59
	1bv1_I102K_L114K_Y120E	159	-7,38	-5,70	-5,58

Sipli, M. J. *et al.* Stat. mechanics, protein struct & protein sustrate interactions; 0:, págs. 297-315, (1994).

- 5 La descripción de las proteínas mutantes indica el archivo de pdb de la proteína molde, que se ha usado como andamiaje para las mutaciones, en este contexto Bet v 1 (entrada de pdb 1bv1). Además, se indican las posiciones que se han mutado (por ejemplo, I120K significa que I en la posición 102 se ha sustituido por K).

REIVINDICACIONES

1. Molécula hipoalérgica que consiste en Bet v 1a o un alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a que comprende mutaciones de al menos un residuo de aminoácido en la región de los aminoácidos 100 a 125 de Bet v 1a o su región correspondiente del alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a, en la que la mutación de al menos un residuo de aminoácido comprende la mutación del residuo de aminoácido en la posición 114 de Bet v 1a o su residuo de aminoácido correspondiente del alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a.
2. Molécula según la reivindicación 1, caracterizada porque el alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a tiene reactividad cruzada inmunológica con Bet v 1a.
3. Molécula según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque el alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a se selecciona del grupo que consiste en Cas s 1 (AJ417550), Mal d 1, Mal d 1.0302 (AY026908), Mal d 1.0304 (AY186248), Mal d 1.0301 (Z72425), Mal d 1.0402 (Z72427), Mal d 1.0403 (Z72428), Mal d 1.0401 (Z72426), Pru ar 1, Pru ar 1.0101 (U93165), Cor a 1, Cor a 1.0401 (AF136945), Cor a 1.0404 (AF323975), Cor a 1.0402 (AF323973), Cor a 1.0403 (AF323974), Cor a 1.0301 1 (Z72440), Cor a 1.0201 (Z72439), Cor a 1/5 (X70999), Cor a 1/11 (X70997), Cor a 1/6 (X71000), Cor a 1/16 (X70998), Bet v 1d (X77266), Bet v 11 (X77273), Bet v 1a1-6 (Ferreira F *et al.* FASEB (1998) 12:231-242), Bet v 1g (X77269), Bet v 1f (X77268), Bet v 1j (X77271), Bet v 1e (X77267), Bet v 1b (X77200), Bet v 1c (X77265), Bet v 1.0101 (X15877), Bet v 1.0901 (X77272), Bet v 1.1101 (X77599), Bet v 1.1201 (X77600), Bet v 1.1301 (X77601), Bet v 1.1401 (X81972), Bet v 1.1501 (Z72429), Bet v 1.1601 (Z72437), Bet v 1.1701 (Z72430), Bet v 1.1801 (Z72431), Bet v 1.1901 (Z72433), Bet v 1.2001 (Z72434), Bet v 1.2101 (Z72435), Bet v 1.2201 (Z72438), Bet v 1.2301 (Z72436), Bet v 1.2401 (Z80100), Bet v 1.2501 (Z80101), Bet v 1.2601 (Z80102), Bet v 1.2701 (Z80103), Bet v 1.2901 (Z80105), Bet v 1.3001 (Z80106), Aln g 1 (S50892), Car b 1, Car b 1.0301 (Z80169), Car b 1.0302 (Z80170), Car b 1.0103 (Z80159), Car b 1.0105 (Z80161), Car b 1.0104 (Z80160), Car b 1/1a, Car b 1.0101 (X66932), Car b 1.0102 (X66918), Car b 1/1b, Car b 1/2, Car b 1.0106a (Z80162), Car b 1.0106b (Z80163), Car b 1.0106c (Z80164), Car b 1.0106d (Z80165), Car b 1.0107a (Z80166), Car b 1.0107b (Z80167), Car b 1.0201 (X66933), Car b 1.0108 (Z80168), Bet p 1a (AB046540), Bet p 1b (AB046541), Bet p 1c (AB046542), Fag s 1 (AJ130889).
4. Molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la al menos una mutación del al menos un residuo de aminoácido es una sustitución, delección o adición de aminoácido.
5. Molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque la región mutada de Bet v 1a o su región correspondiente del alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a comprende los aminoácidos 105 a 120 de Bet v 1a o su región correspondiente del alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a.
6. Molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque la región mutada de Bet v 1a o su región correspondiente del alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a comprende los aminoácidos 108 a 118 de Bet v 1a o su región correspondiente del alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a.
7. Molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque la región mutada de Bet v 1a o su región correspondiente del alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a comprende los aminoácidos 109 a 116 de Bet v 1a o su región correspondiente del alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a.
8. Molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque la al menos una mutación comprende la sustitución de dicha región por la región correspondiente de otro alérgeno seleccionado del grupo que consiste en Bet v 1a y un alérgeno que tiene al menos el 60% de identidad con Bet v 1a.
9. Molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque la molécula consiste en Bet v 1 y la región de los aminoácidos 109 a 116 de Bet v 1 se sustituye por la región correspondiente de Mal d 1.
10. Molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque la molécula consiste en Mal d 1 y la región de los aminoácidos 109 a 116 de Mal d 1 se sustituye por la región correspondiente de Bet v 1.
11. Molécula de ácido nucleico que codifica para una molécula hipoalérgica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 11.
13. Preparación de vacuna que comprende una molécula hipoalérgica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

14. Preparación según la reivindicación 13, caracterizada porque comprende además al menos un excipiente, diluyente, adyuvante y/o portador farmacéuticamente aceptable.

5 15. Uso de una molécula hipoalergénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la fabricación de una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de alergias.

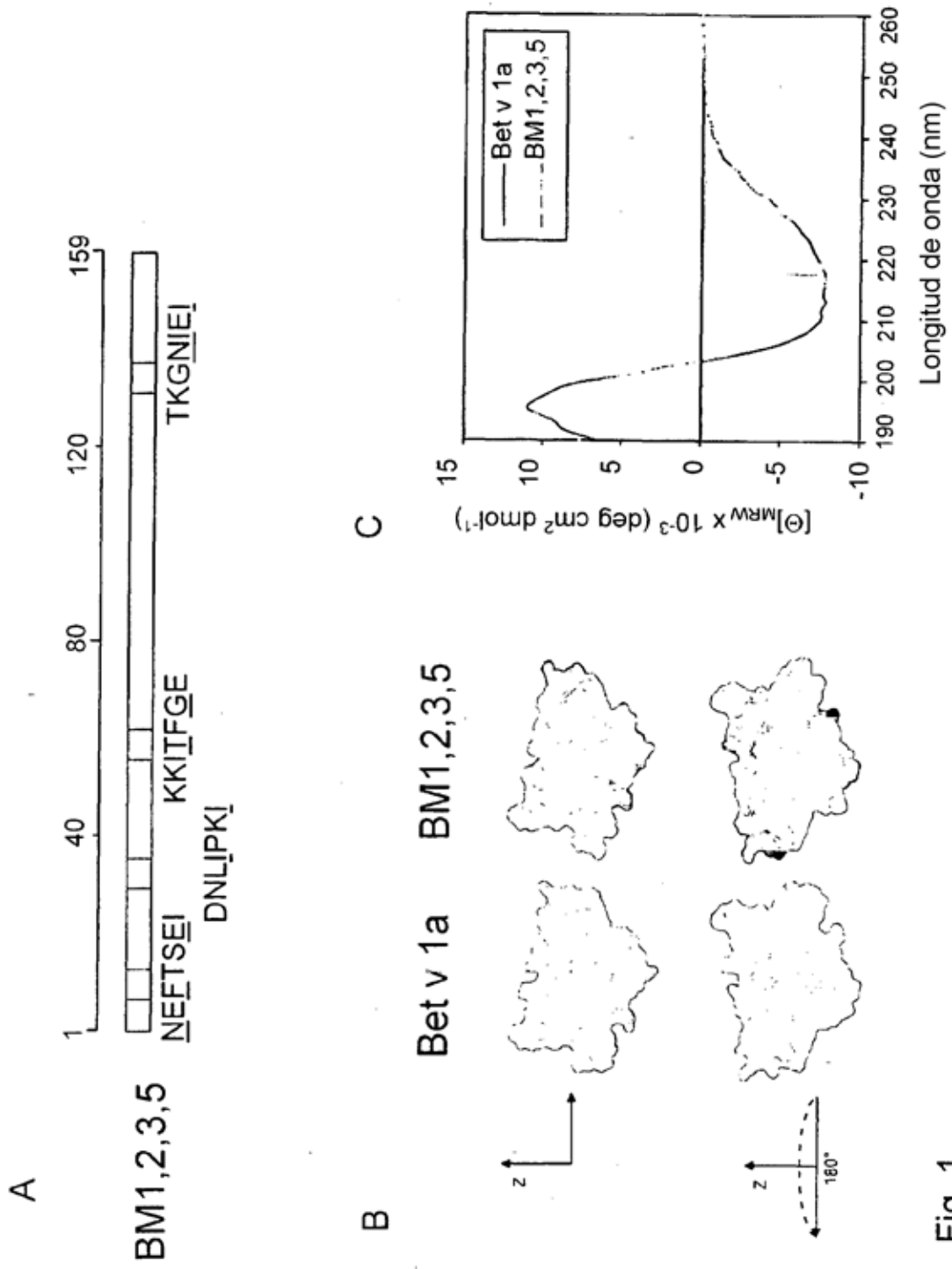


Fig. 1

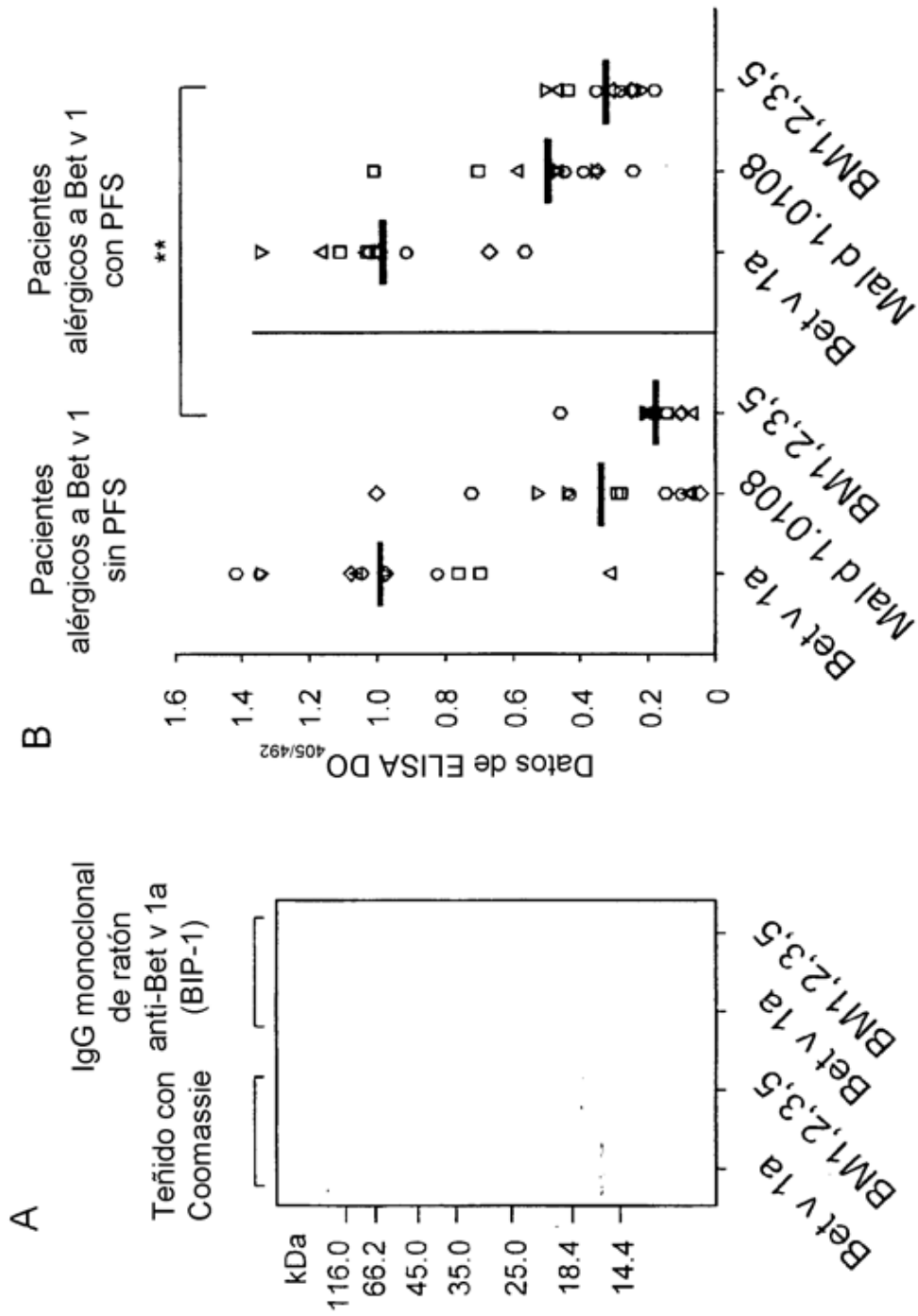


Fig. 2

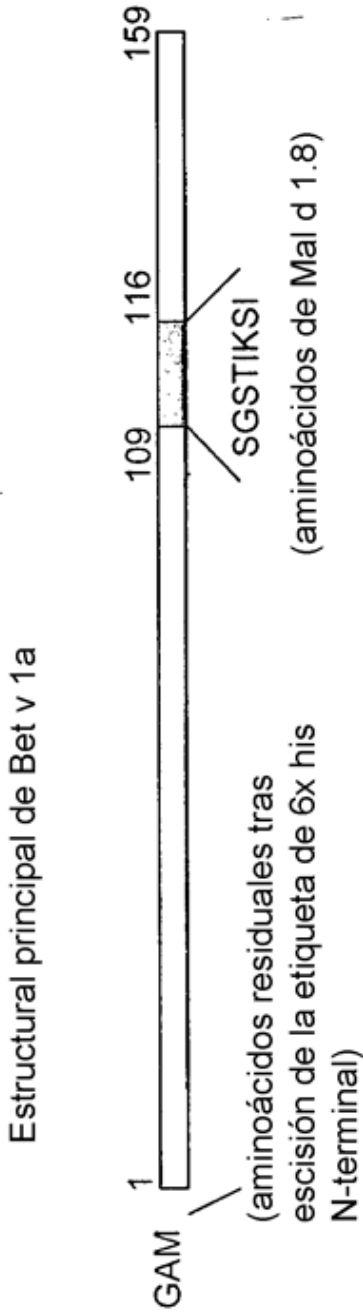


Fig. 3

BM4
Bet v 1a
GVFNYETETTSVIPAAARLFKAFILDGDNLFKVPAPQAISSVENIEGNGGPGTIKKISFPE
GVFNYETETTSVIPAAARLFKAFILDGDNLFKVPAPQAISSVENIEGNGGPGTIKKISFPE.

BM4
Bet v 1a
GPFKYVKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPSG**STIKS**ISNKY
GPFKYVKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVAT**PDGGSILK**ISNKY

BM4
Bet v 1a
HTKGDHEVKAEQVKASKEMGE**TLLRAVESYLLA**HSDAYN
HTKGDHEVKAEQVKASKEMGE**TLLRAVESYLLA**HSDAYN

Fig. 4

BM4
 Mal d 1
 GVFN~~Y~~ETETTSVIPAAARL~~F~~KAFIL~~D~~GDNL~~F~~PKVAPQAISSVENIEGNGGPGTIKKISFGE
 G~~V~~YTFENEFTSEI~~P~~PSRL~~F~~KAFVLDADNLI~~P~~KIAPQAIKQAEILEGNGGPGTIKKITFGE

BM4
 Mal d 1
 GE~~P~~FKYV~~K~~DRV~~D~~VDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPSGSG**TI**KSISNKY
 GSQYGV~~K~~KHRIDSIDEASYSY~~T~~LIEGDAL~~T~~DTIEKISYETKLVACGSGSG**TI**KSISH-Y

BM4
 Mal d 1
 HTKGDHEVKAEQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
 HTKGNIEIKEEHVKAGKEKAHGLFKLIESYLYKDHDPDAYN

Fig. 5

BM4

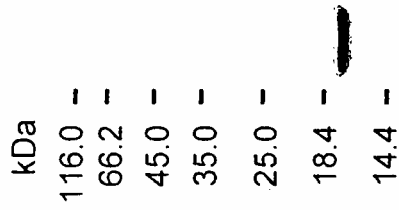


Fig. 6

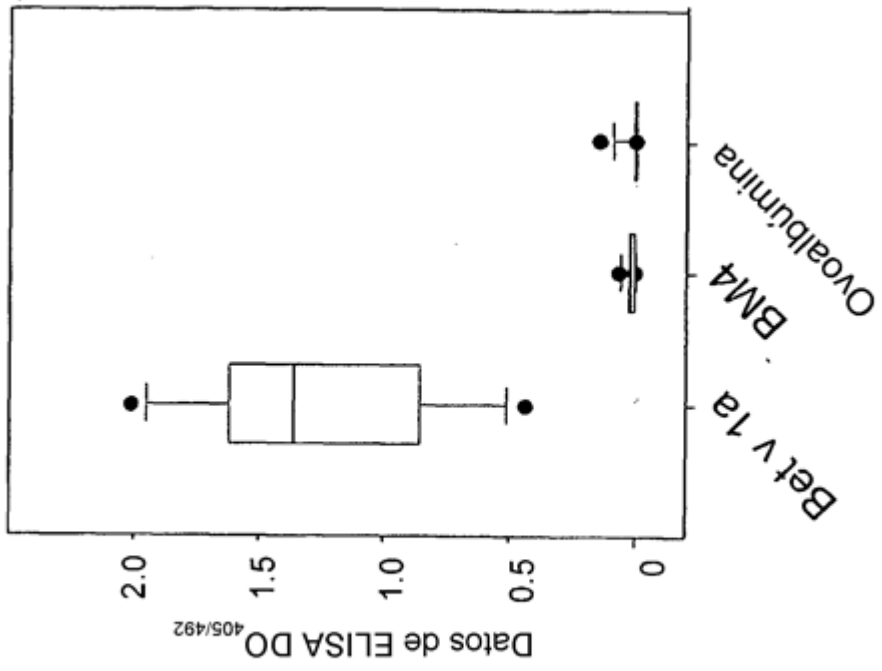


Fig. 8

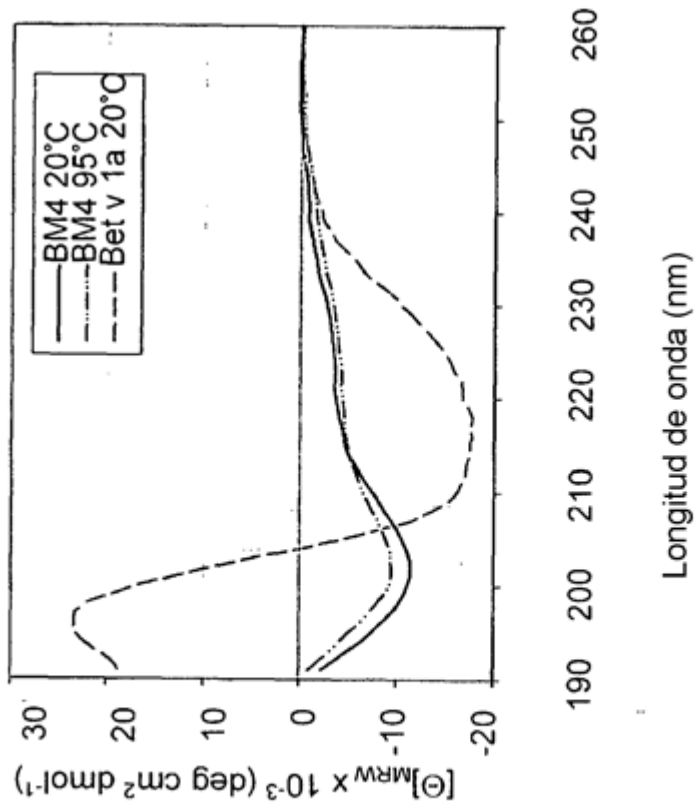
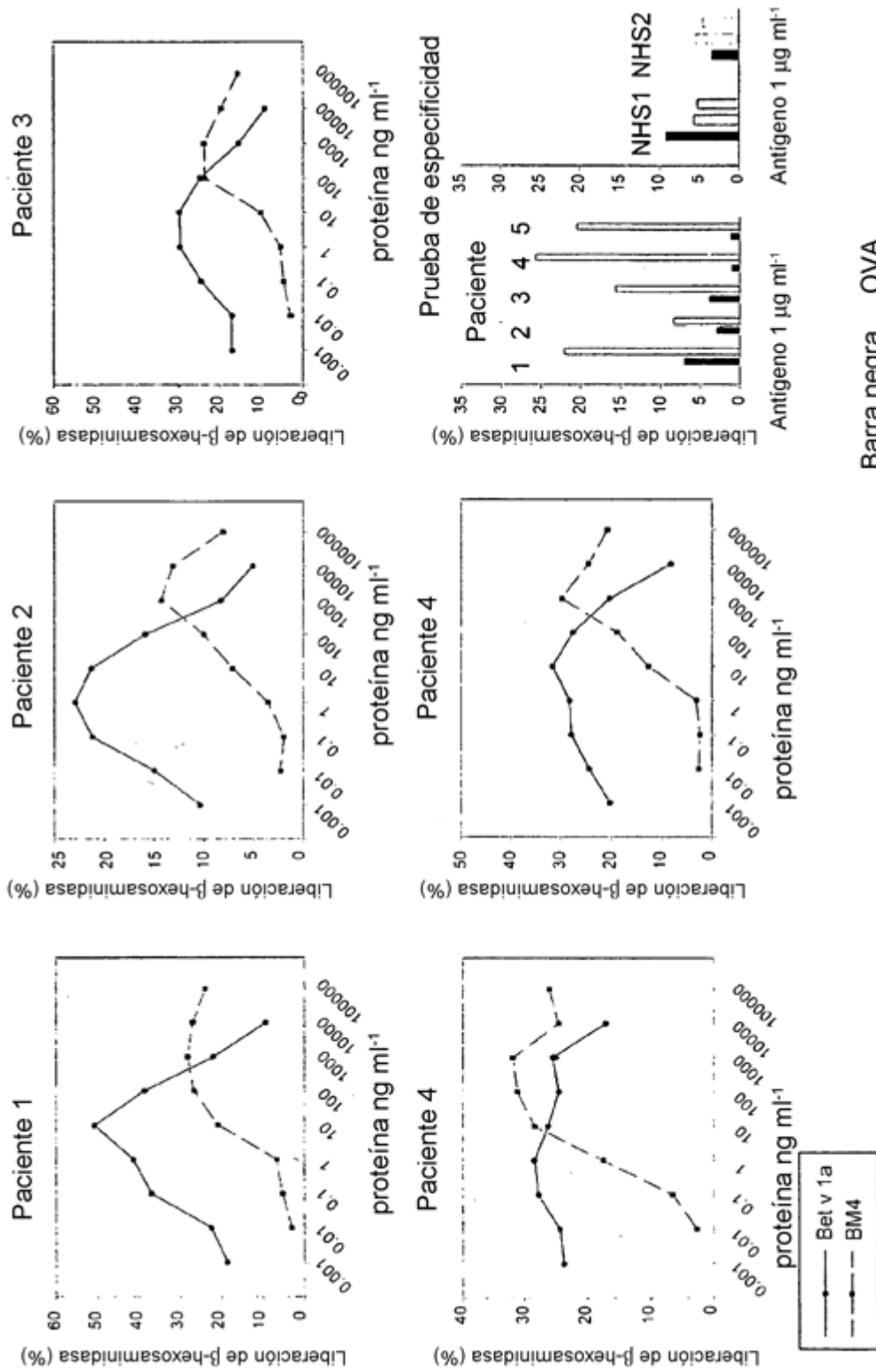


Fig. 7



Barra negra ... OVA
 Barra gris ... Bet v 1a
 Barra blanca ... BM4

Fig. 9

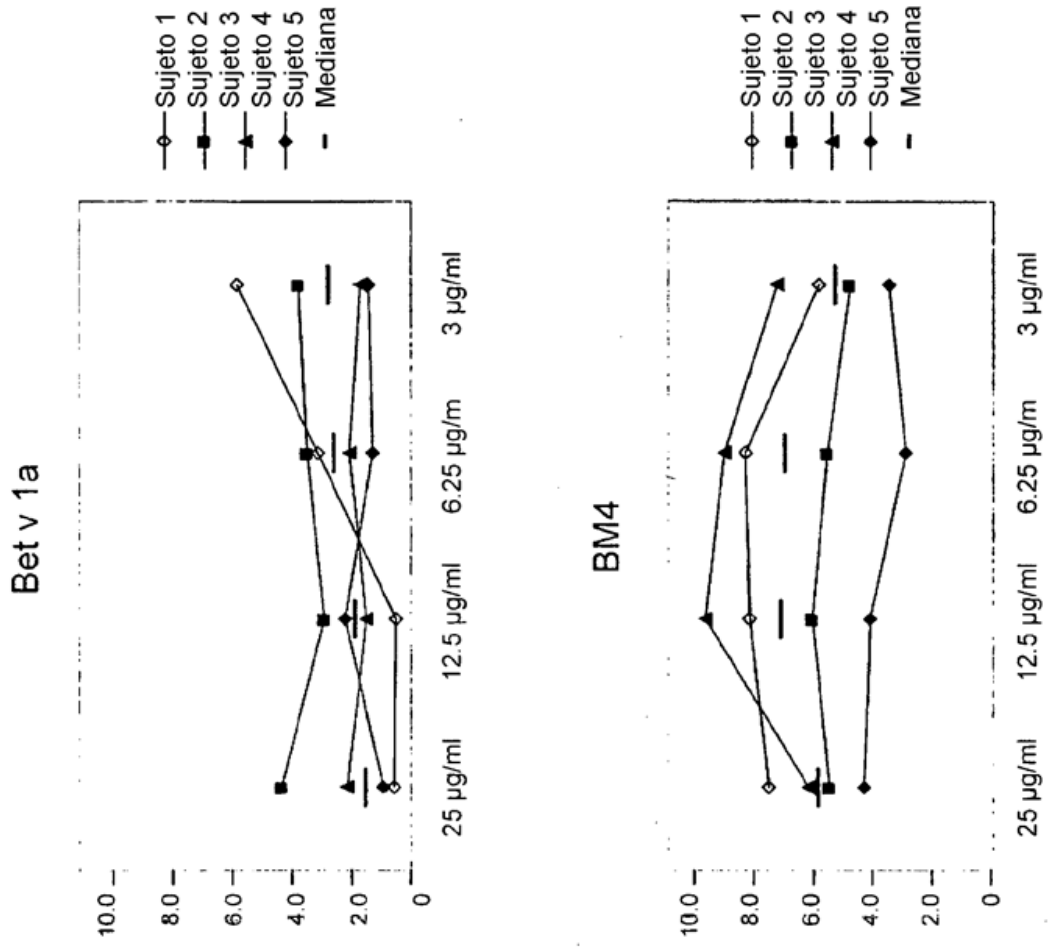
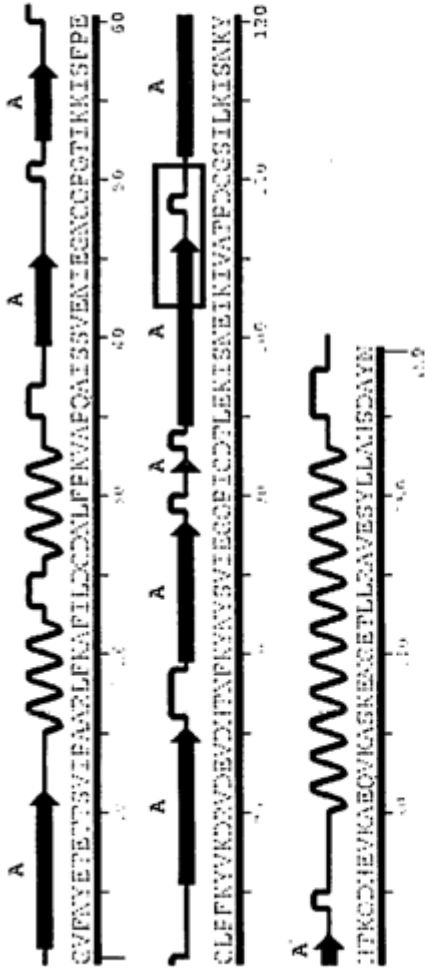
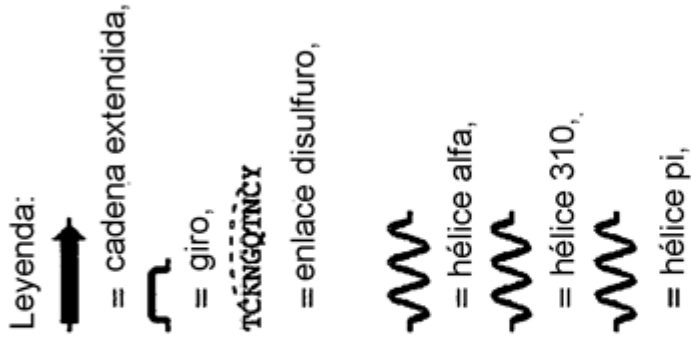


Fig. 10



Los residuos en gris no tienen información estructural

Fig. 11

BM4	
Bet v 1a	GVFN Y ETETTSVIPAARL F KAFIL D GDNL F PKVAPQAISSVENIEGNGGPGTIKKISFPE
	GVFN Y ETETTSVIPAARL F KAFIL D GDNL F PKVAPQAISSVENIEGNGGPGTIKKISFPE

BM4	GFPFKYVKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPSGSTIKSISNKY
Bet v 1a	GFPFKYVKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVAT <u>PDGGSILKISNKY</u>

BM4	HTKGDHEVKAEQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
Bet v 1a	HTKGDHEVKAEQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN

Fig. 12

Dauc1.0101 E-GSPITSMVVRTDAVNKEALTYDSTVIDGDILLGFIESIETHLVVVPTADGG-SITKTT 116
Dauc1.0102 E-GSPITSMVVRTDAVNKEALTYDSTVIDGDILLGFIESIETHLVVVPTADGG-SITKTT 116
Dauc1.0104 E-GSPITSMVVRTDAVNKEALTYDSTVIDGDILLGFIESIETHLVVVPTADGG-SITKTT 116
Dauc1.0105 E-GSPITSMVVRTDAVNKEALTYDSTVIDGDILLGFIESIETHLVVVPTADGG-SITKTT 116
Dauc1.0103 E-GSPITSMVVRTDAVNKEALTYDSTVIDGDILLEFIESIETHMVVVPTADGG-SITKTT 116
Apigl.0101 D-GGPITMTLRIDGVNKEALTFDYSVIDGDILLGFIESIENHVVLVPTADGG-SICKTT 116
Apigl.0201 E-ATEYTTMKQKVDVIDKAGLAYTYTTIGGDILVDVLESVVNEFVVVP-TDGG-CIVKNT 116
Dauc1.0201 E-ATEYTTMKQKVDVIDKAGLGYTYTTIGGDILVEGLESVVNQFVVVP-TDGG-CIVKNT 116
Petcl D-ASPFKTMKQKVDVIDKATFTYSYSIIDGDILLGFIESINNHFTAVPNADGG-CTVKST 117
Cass1/1 E-ASKYKYSKHRIDALDPENCTYSFSVIEGDVLT-D- IENVSTETKFVASPDGG-TIMKST 116
Cass1/3 E-ASKYKYSRHRIDALDPENCTYSFSVIEGDVLT-D- IENVSTETKFVASPDGG-TIMKST 116
Cass1/2 E-ASKYKYSKHRIDALDPENCTYSFSVIEGDVLT-D- IENVSTETKFVASPDGG-TIMKST 116
Queal/7 E-ASKFKYAKHRIDALDPENCTYSFSVIEGDALTVXMESVSTEIKCVASPDGG-SIMKST 117
Queal/8 E-GSHLKHAKHRIDVIDPENFTYSFSVIEGDALFDKLENVSTETKIVASPDGG-SIVKST 117
Queal/9 E-GSHLKHAKHRIDVIDPENFTYSFSVIEGDALFDKLENVSTETKIVASPDGG-SIAKST 117
Mald1.0101 E-GSQYGYVKHRIDSIDEASYSYSYTLIEGDALTDTIEKISYETKLVACGSG--STIKSI 116
Mald1.0102 E-GSQYGYVKHRIDSIDEASYSYSYTLIEGDALTDTIEKISYETKLVACGSG--STIKSI 116
Mald1.0109 E-GSQYGYVKHRIDSIDEASYSYSYTLIEGDALTDTIEKISYETKLVACGSG--STIKSI 116
Mald1.0105 E-GSQYGYVKHRIDSIDEASYSYSYTLIEGDALTDTIEKISYETKLVACGSG--STIKSI 116
Mald1.0106 E-GSQYGYVKHRIDSIDEASYSYSYTLIEGDALTDTIEKISYETKLVACGSG--STIKSI 116
Mald1.0108 E-GSQYGYVKHRIDSIDEASYSYSYTLIEGDALTDTIEKISYETKLVACGSG--STIKSI 116
Mald1.0103 E-GSQYGYVKHRIDSIDEASYSYSYTLIEGDALTDTIEKISYETKLVACGSG--STIKSI 116
Mald1.0107 E-GSQYGYVKHRIDSIDEASYSYSYTLIEGDALTDTIEKISYETKLVACGSG--STIKSI 116
Mald1.0104 E-GSQYGYVKHRIDSIDEASYSYSYTLIEGDALTDTIEKISYETKLVACGSG--STIKSI 116
Pyrcl.0101 E-GSQYGYVKHRVDSIDEASYSYAYTLIEGDALTDTIEKISYEAKLVASGSG--STIKSI 116
Mald1.0201 E-GSQYGYVKHKIDSVDENYSYAYTLIEGDALTDTIEKVSYETKLVASGSG--SIIKSI 116
Mald1.0202 E-GSQYGYVKHKIDSVDENYSYAYTLIEGDALTDTIEKVSYETKLVASGSG--SIIKSI 116
Mald1.0203 E-GSQYGYVKHKIDSVDENYSYAYTLIEGDALTDTIEKVSYETKLVASGSG--SIIKSI 116
Mald1.0207 E-GSQYGYVKHKIDSVDENYSYAYTLIEGDALTDTIEKVSYETKLVASGSG--SIIKSI 116
Mald1.0205 E-GSQYGYVKHKIDSVDENYSYAYTLIEGDALTDTIEKVSYETKLVASGSG--SIIKSI 116
Mald1.0204 E-GSQYGYVKHKIDSVDENYSYAYTLIEGDALTDTIEKVSYETKLVASGSG--SIIKSI 116
Mald1.0206 E-GSQYGYVKHKIDSVDENYSYAYTLIEGDALTDTIEKVSYETKLVASGSG--SIIKSI 116
Mald1.0208 E-GSQYGYVKHKIDSVDENYSYAYTLIEGDALTDTIEKVSYETKLVASGSG--SIIKSI 116
Pruavl.0101 E-GSQYGYVKHKIDSIDKENYSYSYTLIEGDALGDTLEKISYETKLVASPSGG-SIIKST 118
Prupl E-GSQYGYVKHKIDSIDKENHSYSYTLIEGDALGDNLEKISYETKLVASPSGG-SIIKST 117
Mald1.0302 E-GSTYSYVKHRIDGVKDNFVYKYSVIEGDAISETIEKISYETKLVAAAG-SG-SVIKST 116
Mald1.0304 E-GSTYSYVKHRIDGVKDNFVYKYSVIEGDAISETIEKISYETKLVASG-SG-SVIKST 116
Mald1.0303 E-GSTYSYVKHRIDGVKDNFVYQYSVIEGDAISETIEKISYETKLVASG-SG-SVIKSI 116
Mald1.0301 E-GSTYSYVKHRIDGVKDNFVYKYSVIEGDAISETIEKISYETKLVASG-SG-SVIKST 116
Pruavl.0202 E-GSHYSYVKHRIDGLDKDNFVYSYSLVEGDALSDKVEKISYEIKLVASADGG-SIIKST 118
Pruavl.0203 E-GSHYSYVKHRIDGLDKDNFVYSYSLVEGDALSDKVEKISYEIKLVASADGG-SIIKST 118
Pruavl.0201 E-GSHYSYVKHRIDGLDKDNFVYNYTLVEGDALSDKIEKITYEIKLVASADGG-SIIKST 118
Rubil.0101 E-GTEHSYVKHKIDGLDKDNFVYSYITEGDALGDKIEKISYEIKLVASG-RG-SIIKTT 108
Mald1.0402 E-GSQYGYVKQRVNGIDKDNFTYSYSMIEGDTLSDKLEKITYETKLIASPDGG-SIIKTN 117
Mald1.0403 E-GSQYGYVKQRVNGIDKDNFTYSYSMIEGDTLSDKLEKITYETKLIASPDGG-SIIKTT 117
Mald1.0401 E-GSQYGYVKQRVNGIDKDNFTYSYSMIEGDTLSDKLEKITYETKLIASPDGG-SIIKTT 117
Pruarl.0101 E-GSQYAYVKHRVDGIDKDNLSYSYTLIEGDALSDVIENIAYDIKLVASPDGG-SIVKTT 117
Coral.0401 E-GNEFKYMKHKVEEIDHANFKYCYSIIEGGPLGHTLEKISYEIKMAAAPHGGSILKIT 118
Coral.0404 E-GNEFKYMKHKVEEIDHANFKYCYSIIEGGPLGHTLEKIPYEIKMAAAPHGGSILKIT 118
Coral.0402 E-GSEFKYMKHKVEEIDHANFKYCYSIIEGGPLGHTLEKISYEIKMAAAPHGGSILKIT 118

Fig. 13

Coral.0403	E-GSEFKYMKHKVVEEIDHANFKYCYSIEGGPLGHTLEKISYEIKMAAAPHHGGGSILKIT	118
Coral.0301	E-GSPFNYYKQKVEEIQANFSYRYSVIEGDALSDKLEKINYEIKIVASPHGG-SILKSI	117
Betvld	E-GFPFKYVKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPDGG-CVLKIS	117
Betvll	E-GFPFKYVKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPDGG-CVLKIS	117
Betv1a1-6	E-GFPFKYVKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGG-CVLKIS	117
Betvlg	E-GFPFKYVKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPDGG-CVLKIS	117
Betvla	E-GFPFKYVKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGG-SILKIS	117
Betvlf	E-GFPFKYVKDRVDEVDHTNFKYSYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPNGG-SILKIN	117
Betvlj	E-GFPFKYVKDRVDEVDHTNFKYSYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPNGG-SILKIN	117
Betvle	E-GIPFKYVKGRVDEVDHTNFKYSYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPNGG-SILKIN	117
Betv1b	E-GSPFKYVKERVDEVDHANFKYSYSMIEGGALGDTLEKICNEIKIVATPDGG-SILKIS	117
Betv1c	E-GSPFKYVKERVDEVDHANFKYSYSMIEGGALGDTLEKICNEIKIVATPDGG-SILKIS	117
Alngl	E-GSPFKYVKERVDEVDNFKYSYSVIEGGAVGDALEKVCNEIKIVAAPDGG-SILKIS	117
Carbl.0301	E-GSPVKYVKERVEEVDHTNFKYSYTVIEGGFVGDKVEKICNEIKIVAAPDGG-SILKIT	117
Carbl.0302	E-GSPVKYVKERVEEVDHTNFKYSYTVIEGGFVGDKVEKICNEIKIVAAPDGG-SILKIT	117
Coral.0201	E-GSPFKYVKERVEEVDHTNFKYSYTVIEGGFVGDKVEKICNEIKIVAAPDGG-SILKIS	117
Carbl.0103	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl.0105	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl.0104	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDNLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl/3	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl/1a	E-GIPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl.0101	E-GIPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl.0102	E-GIPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl/1b	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl/5	E-GIPFKFVKERVDEVDNANFKYSYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl/2	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl/4	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl.0106a	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl.0106b	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl.0106c	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl.0106d	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl/1	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SILKIS	117
Carbl.0107	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKFSYTVIEGDVLGDKLEKVSLELKIVAAPGGG-SILKIS	117
Carbl.0108	E-GSPFKFVKERVDEVDNANFKFSYTVIEGDVLGDKLEKVSLELTIVAAPGGG-SILKIS	117
Coral/5	E-GSRYKYVKERVDEVDNTNFTYSYTVIEGDVLGDKLEKVCHELKIVAAPGGG-SILKIS	117
Coral/11	E-GSRYKYVKERVDEVDNTNFTYSYTVIEGDVLGDKLEKVCHELKIVAAPGGG-SILKIS	117
Coral/6	E-GSRYKYVKERVDEVDNTNFKYSYTVIEGDVLGDKLEKVCSELKIVAAPGGG-SILKIS	117
Coral/16	E-GSRYKYVKERVDEVDNTNFKYSYTVIEGDVLGDKLEKVCSELKIVAAPGGG-STLKIS	117
Carbl/2or	E-GSPVKYVKERVEEIDHTNFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Carbl.0201	E-GSPVKYVKERVEEIDHTNFKYNYTVIEGDVLGDKLEKVSHELKIVAAPGGG-SIVKIS	117
Glym4.0101	E-DGETKFLHKKIESIDEANLGYSYSVVGGAALPDTAEKITFDKSLVAGPNGG-SAGKLT	116
Vigr1.0101	E-DGETKFLHKKIESVDEANLGYSYSVVGVALPDTAEKITIDTKISDGADGG-SLIKLT	116
Arah8.0101	E-DGETKFLHKKVESIDEANYAYNYSVVGVALPPTAEKITFETKLVGPNNGG-SIGKLT	115
AspaoPR10	NPAIPFSYVKERLDFVDHDKFEVKQTLVEGGGLGKMFECATTHFKFEPSSNGG-CLVKVT	118

Fig. 13 continuación

Puntuaciones Z combinadas de fragmentos de Mal d 1 en Bet v 1a

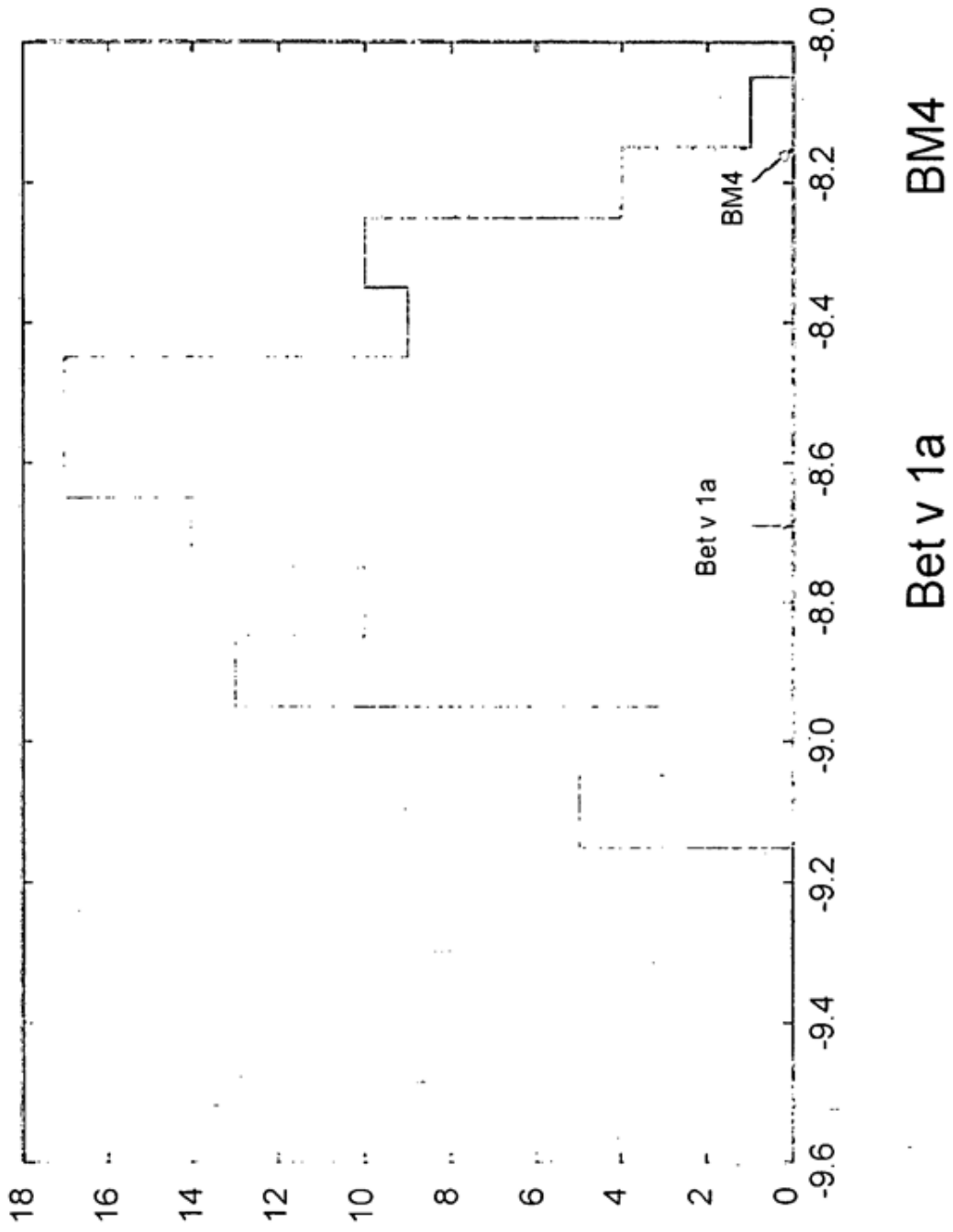


Fig. 14

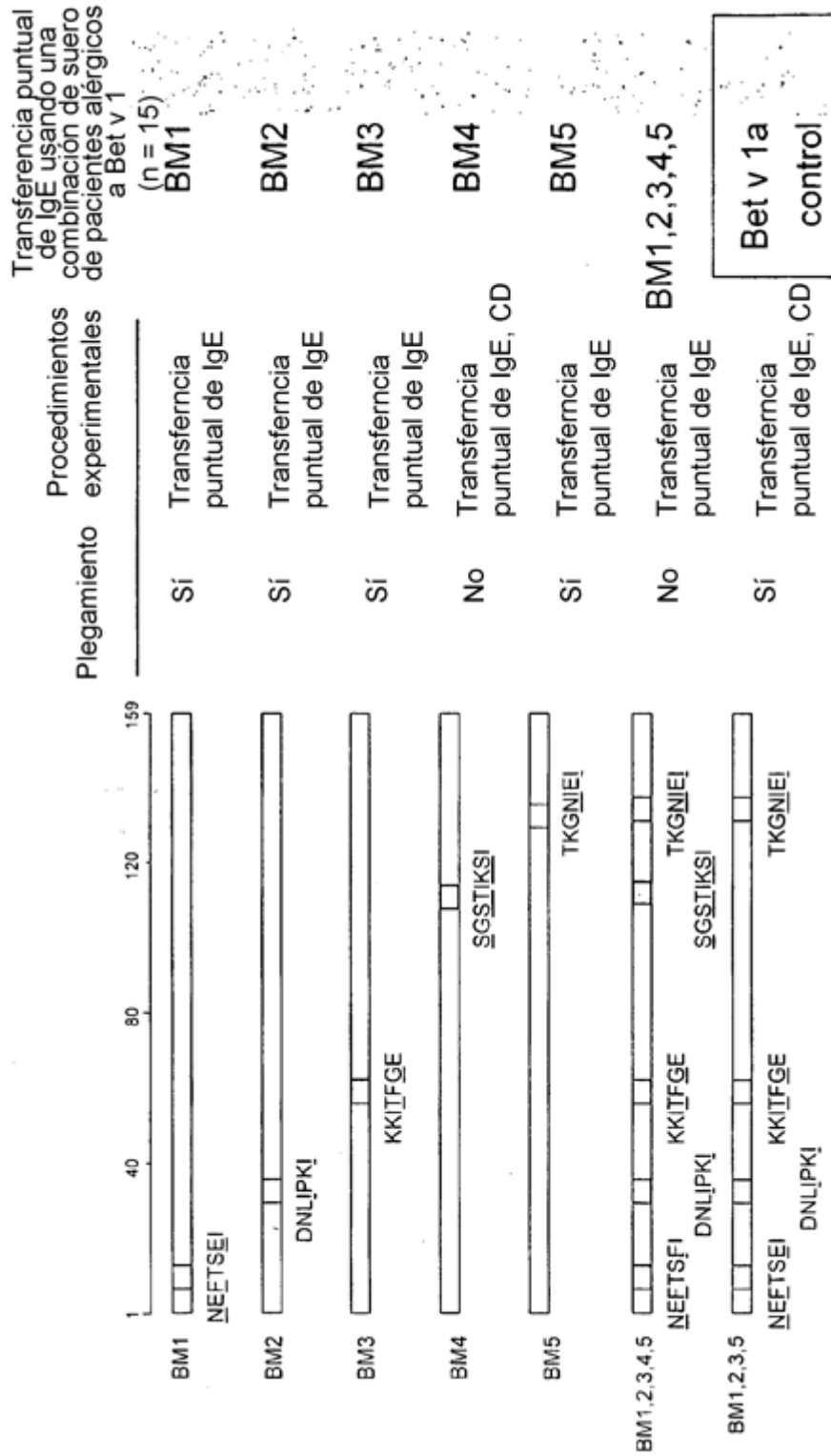
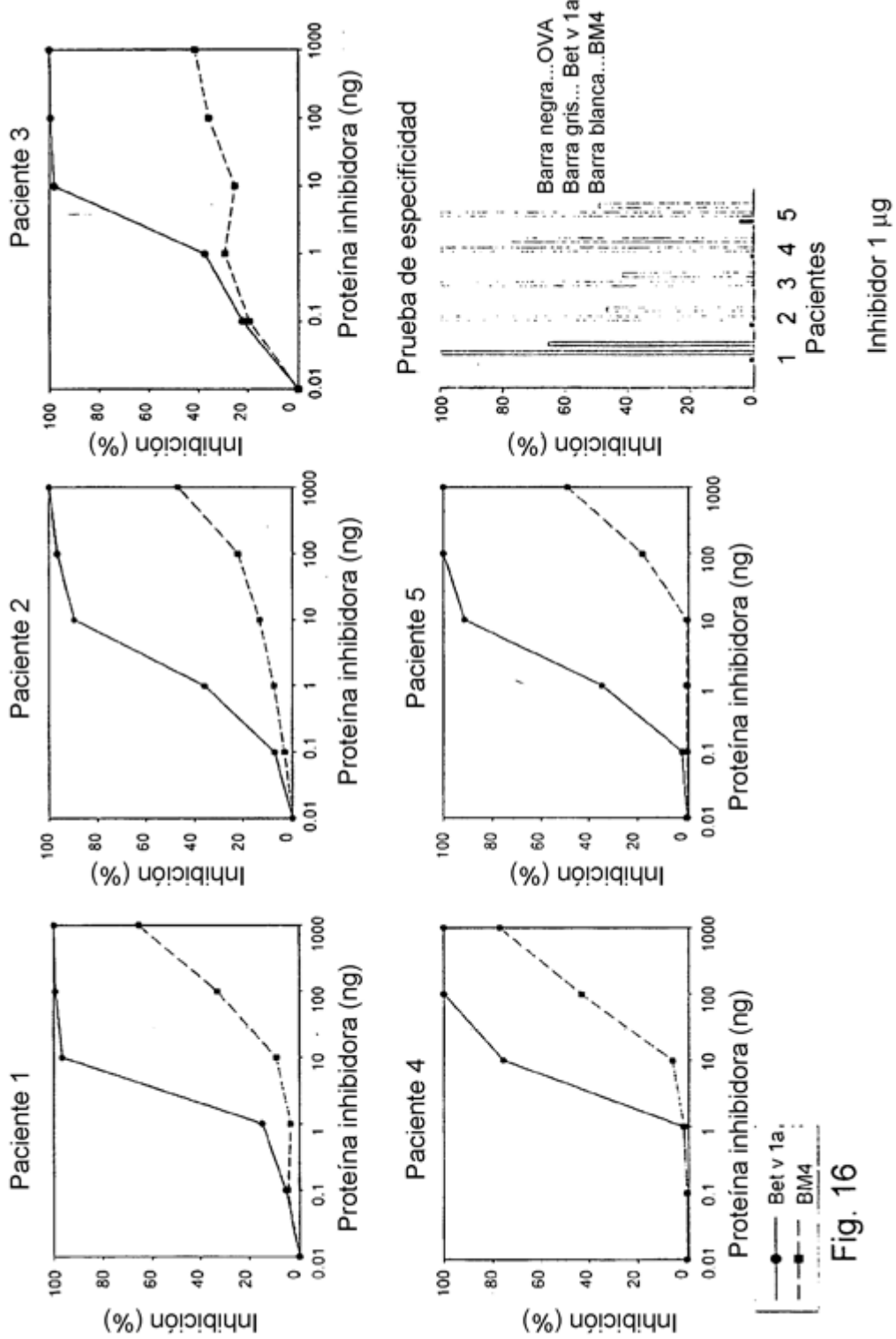


Fig. 15.



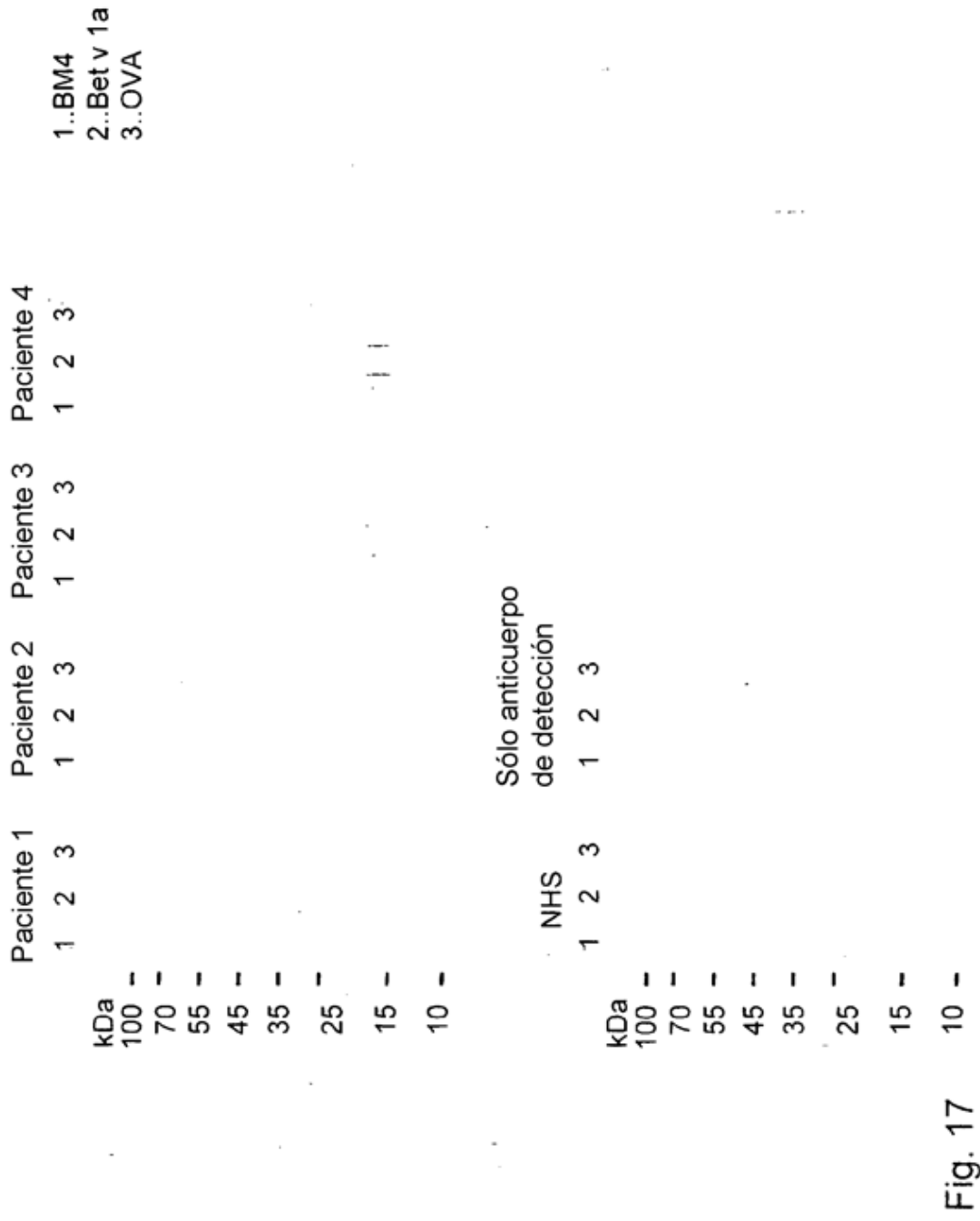


Fig. 17

Fig. 18a Homogeneidad de BM4 mediante SECTDA

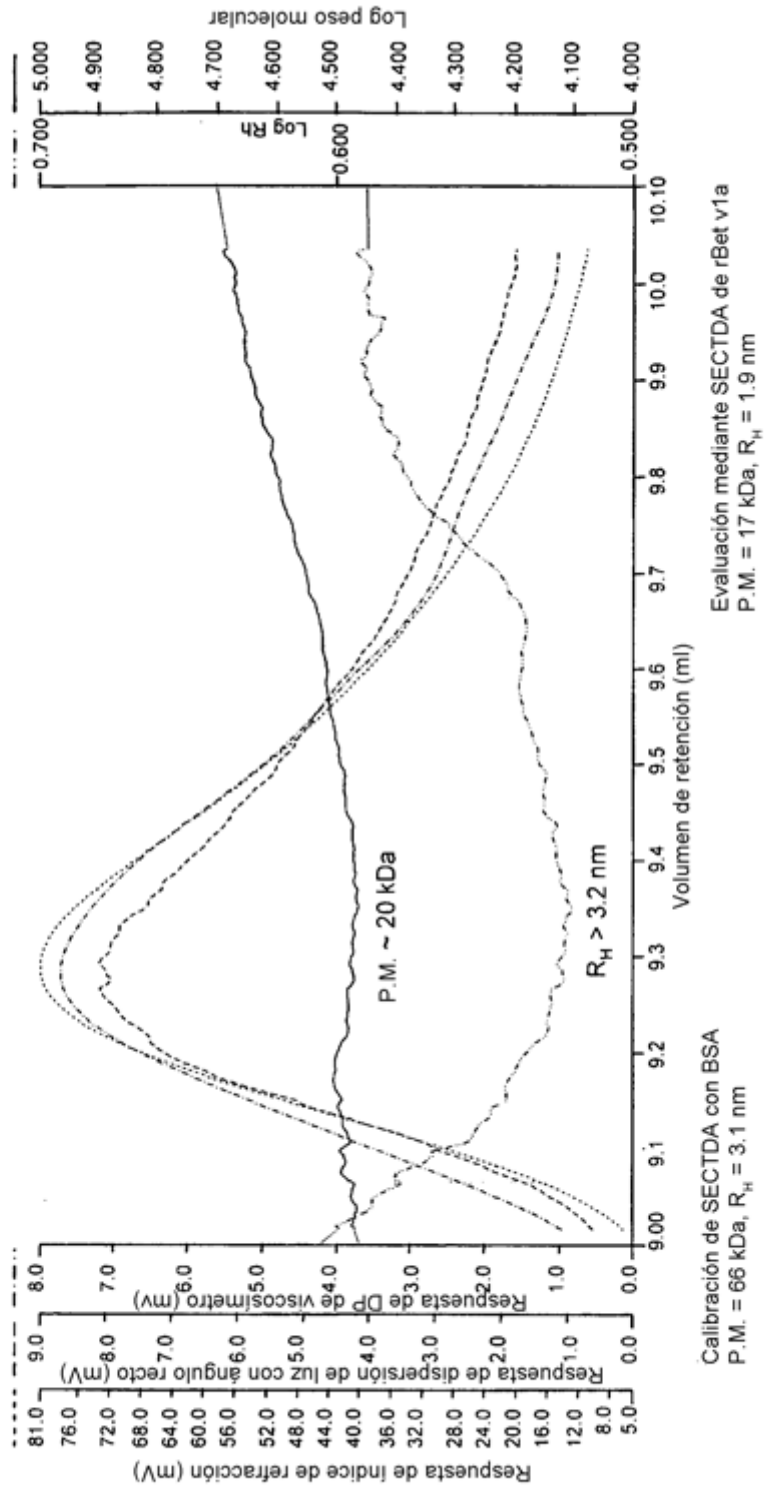


Fig. 18a continuación

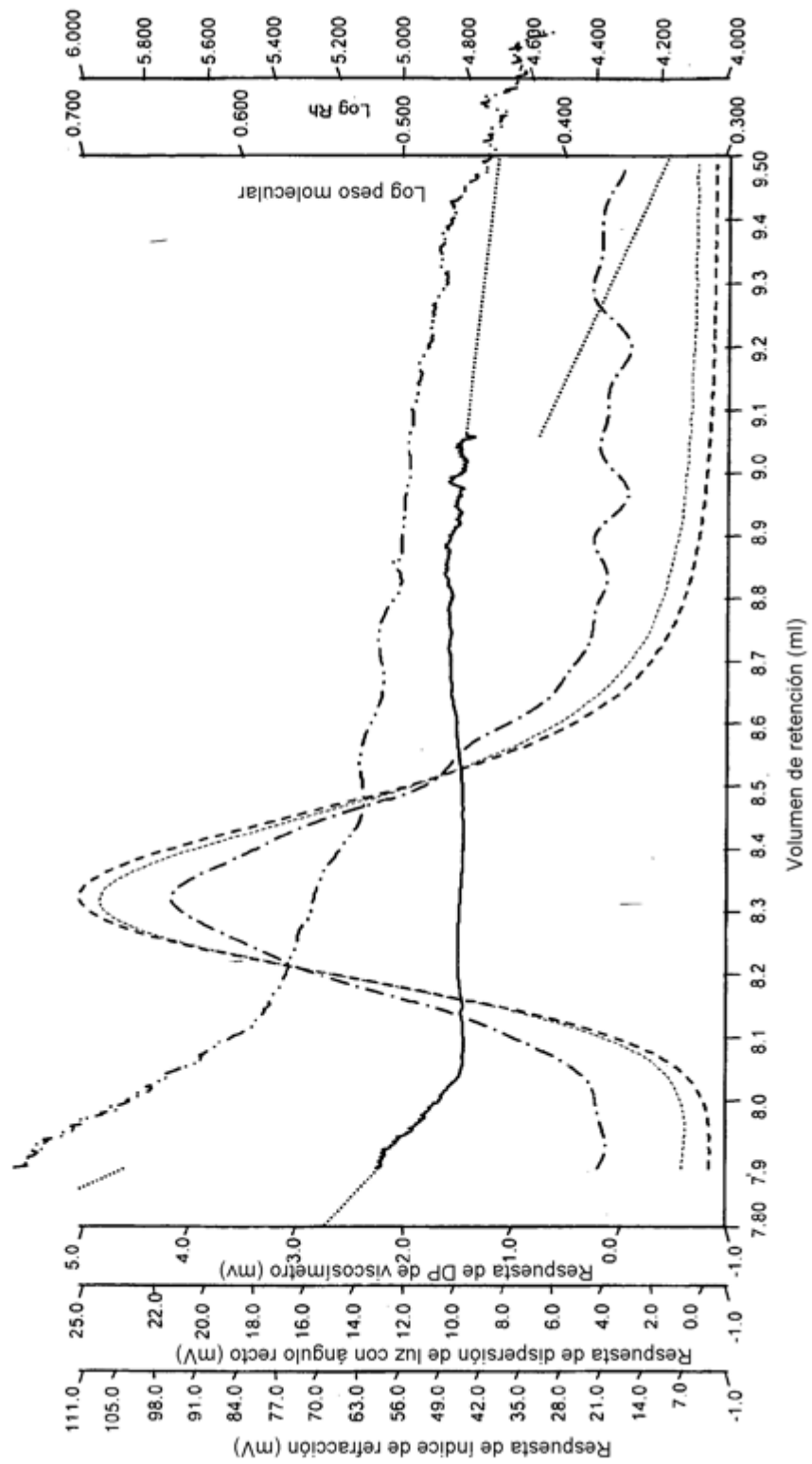


Fig. 18a continuación

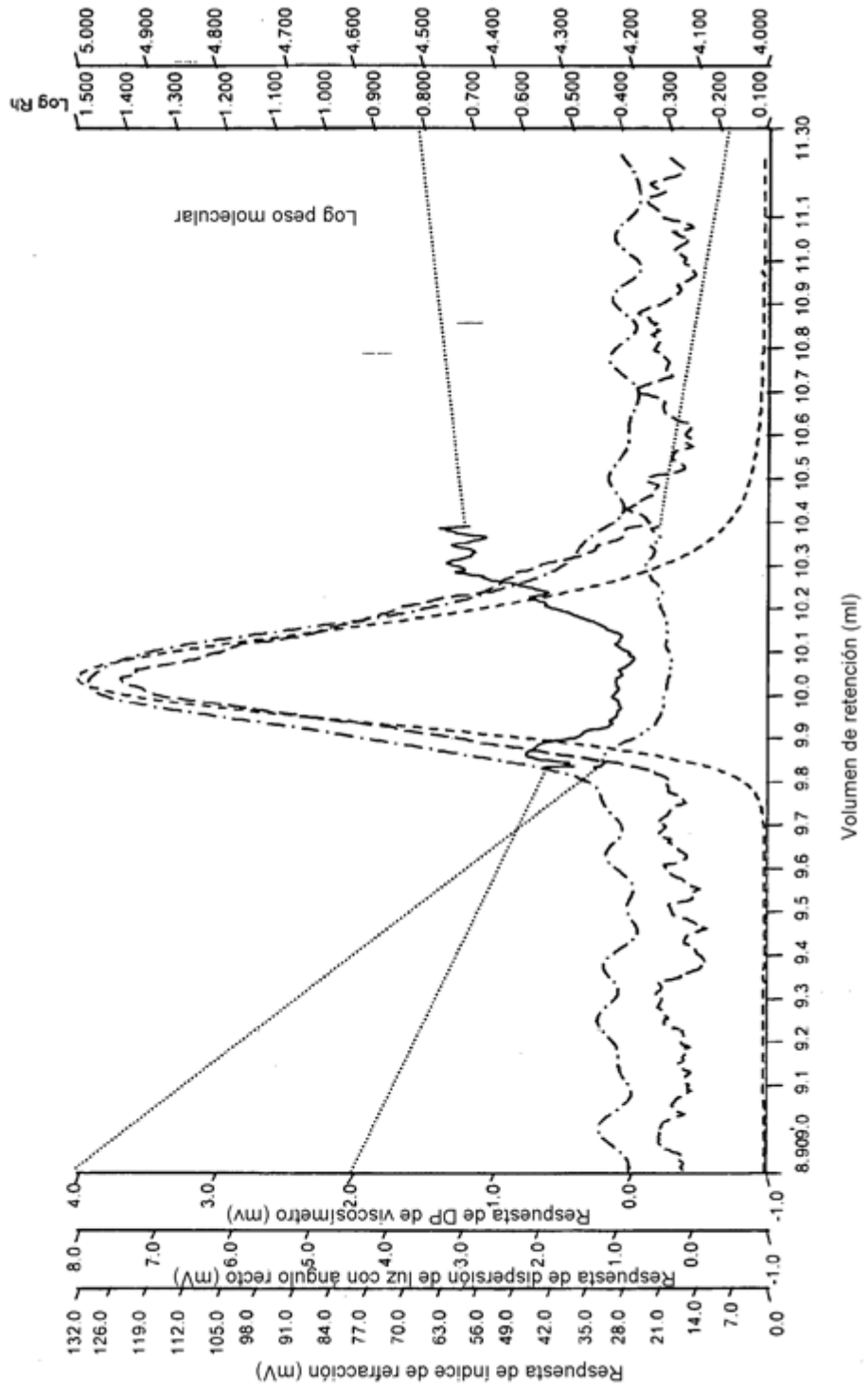
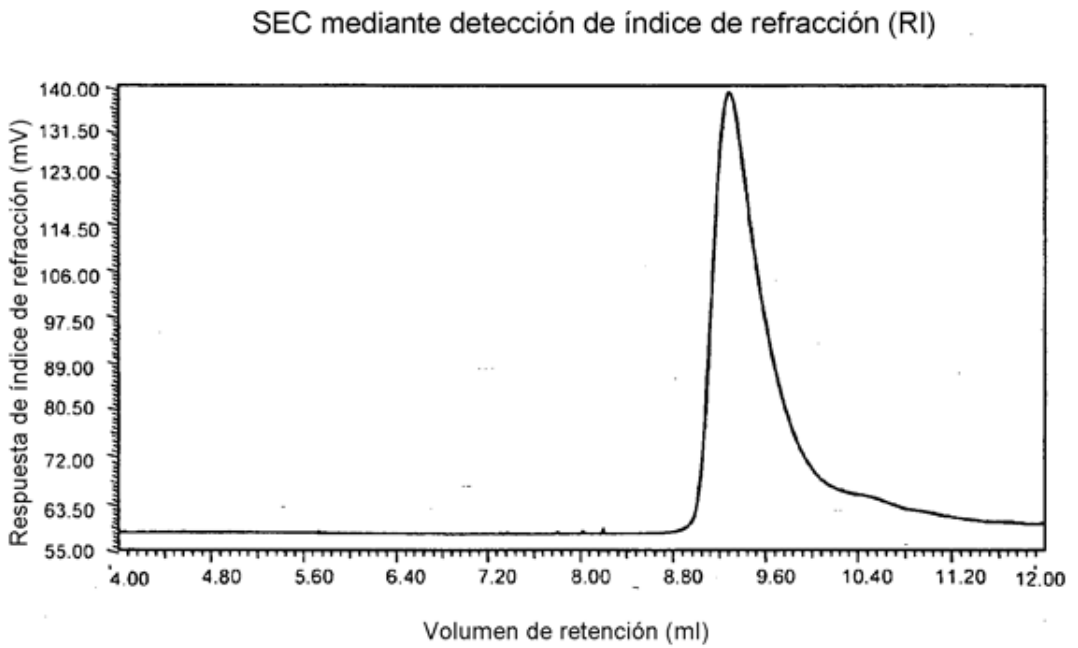
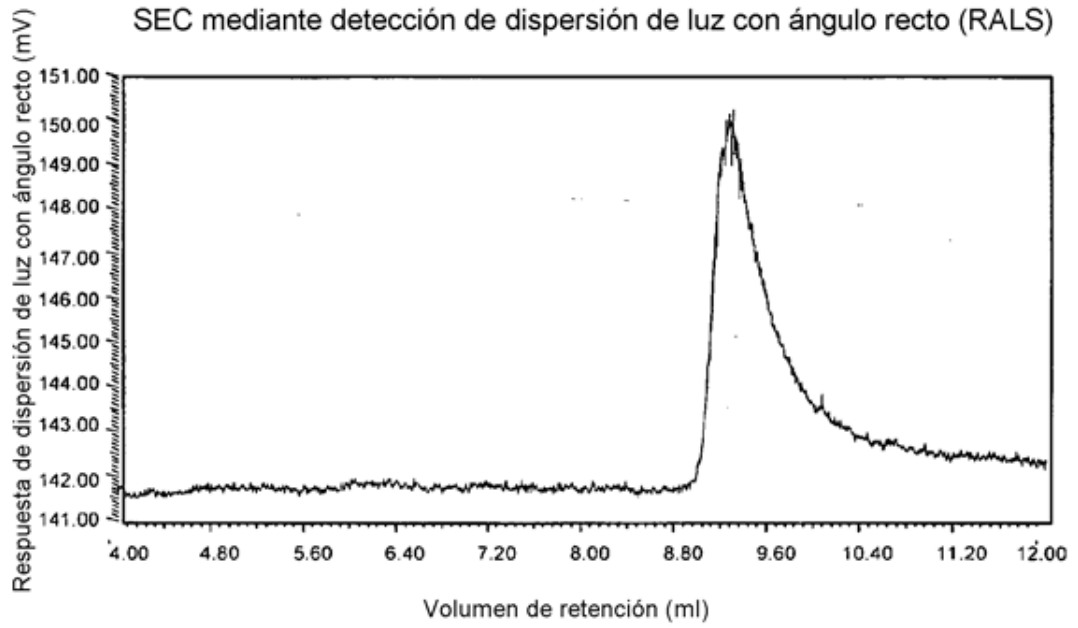
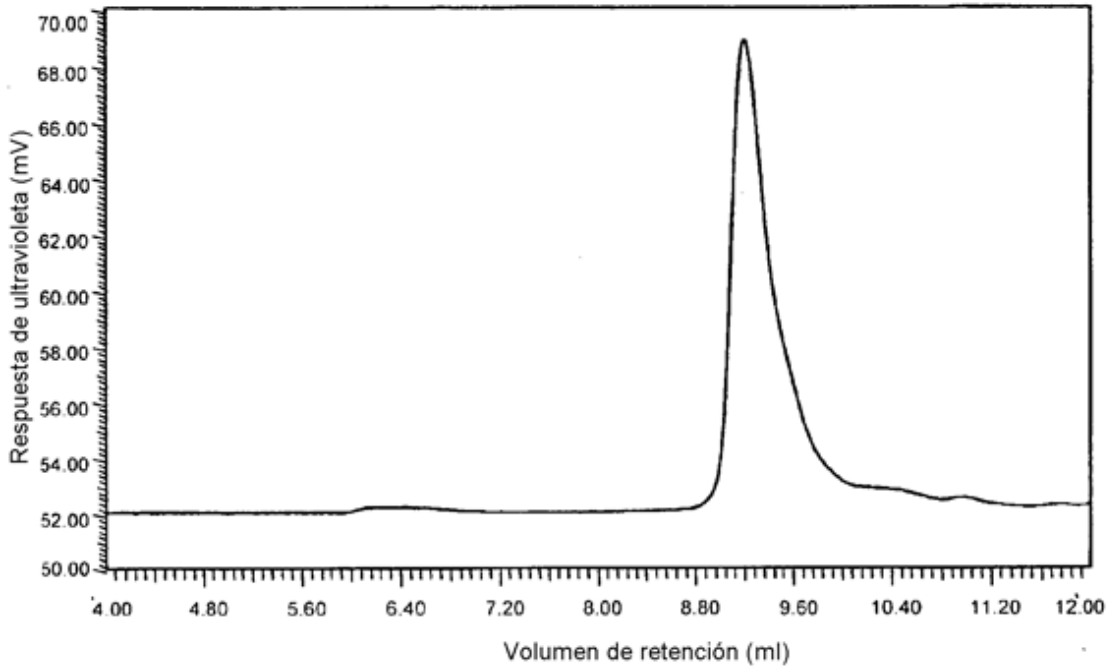


Fig. 18b Homogeneidad de BM4 mediante SECTDA >99% - ¡Sin agregación!



SEC mediante detección de UV (absorción a 280 nm)



SEC mediante detección de viscosidad intrínseca (IV)

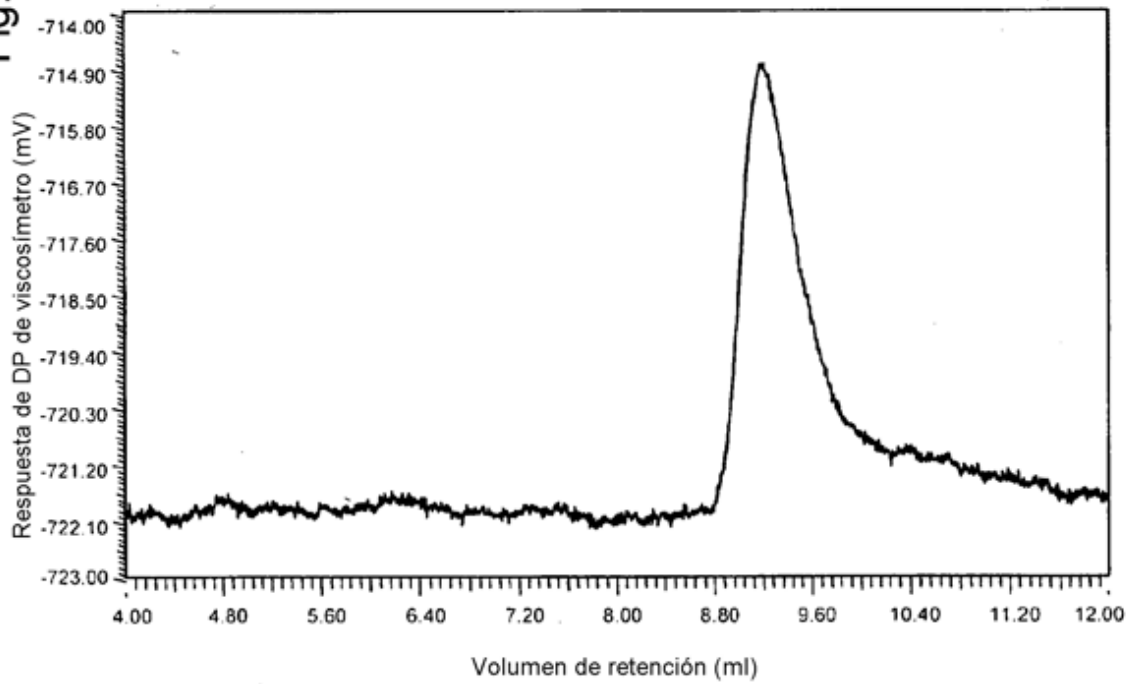


Fig. 18b continuación

Fig. 19 Comportamiento de agregación de BM4 en disolución mediante dispersión de luz dinámica

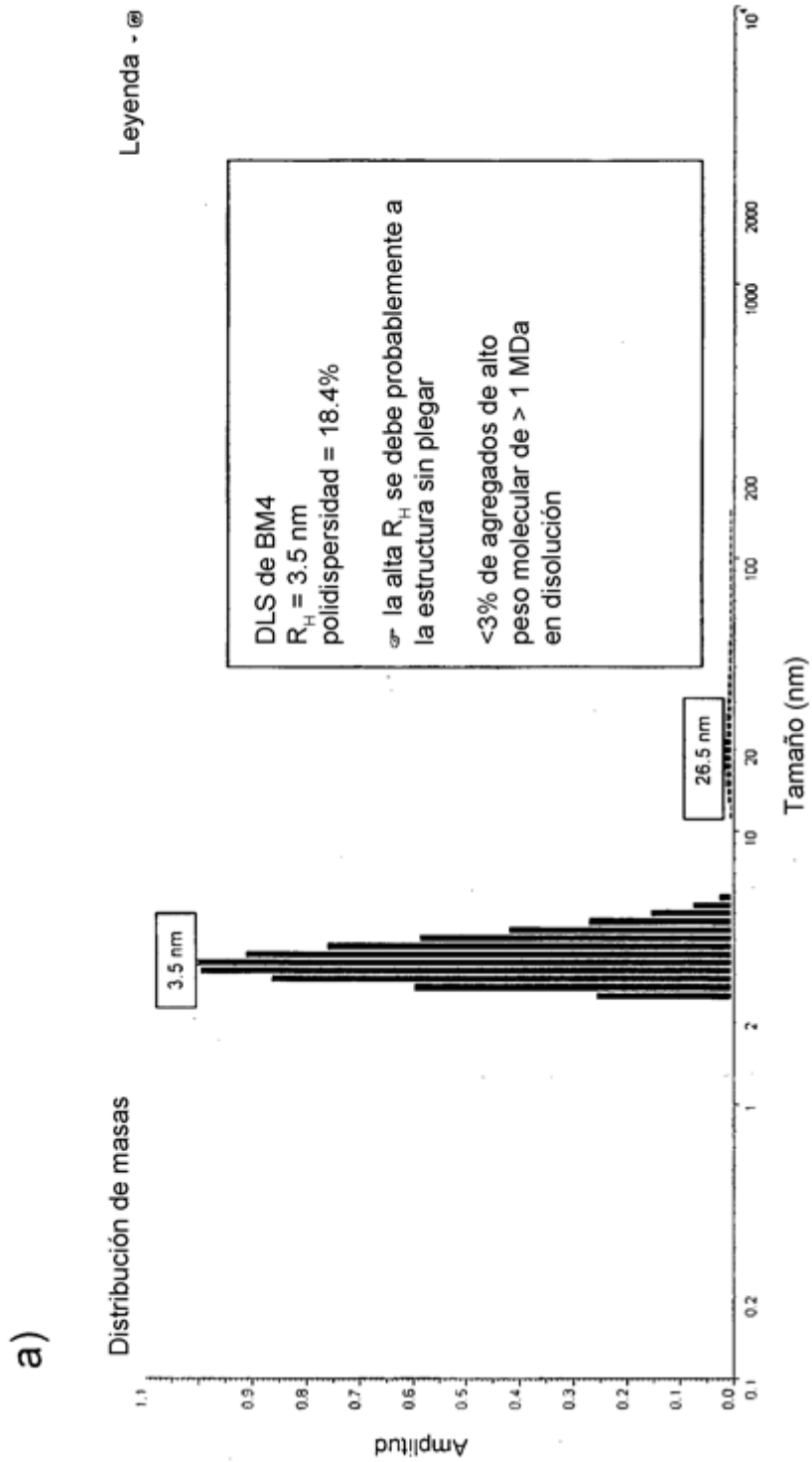
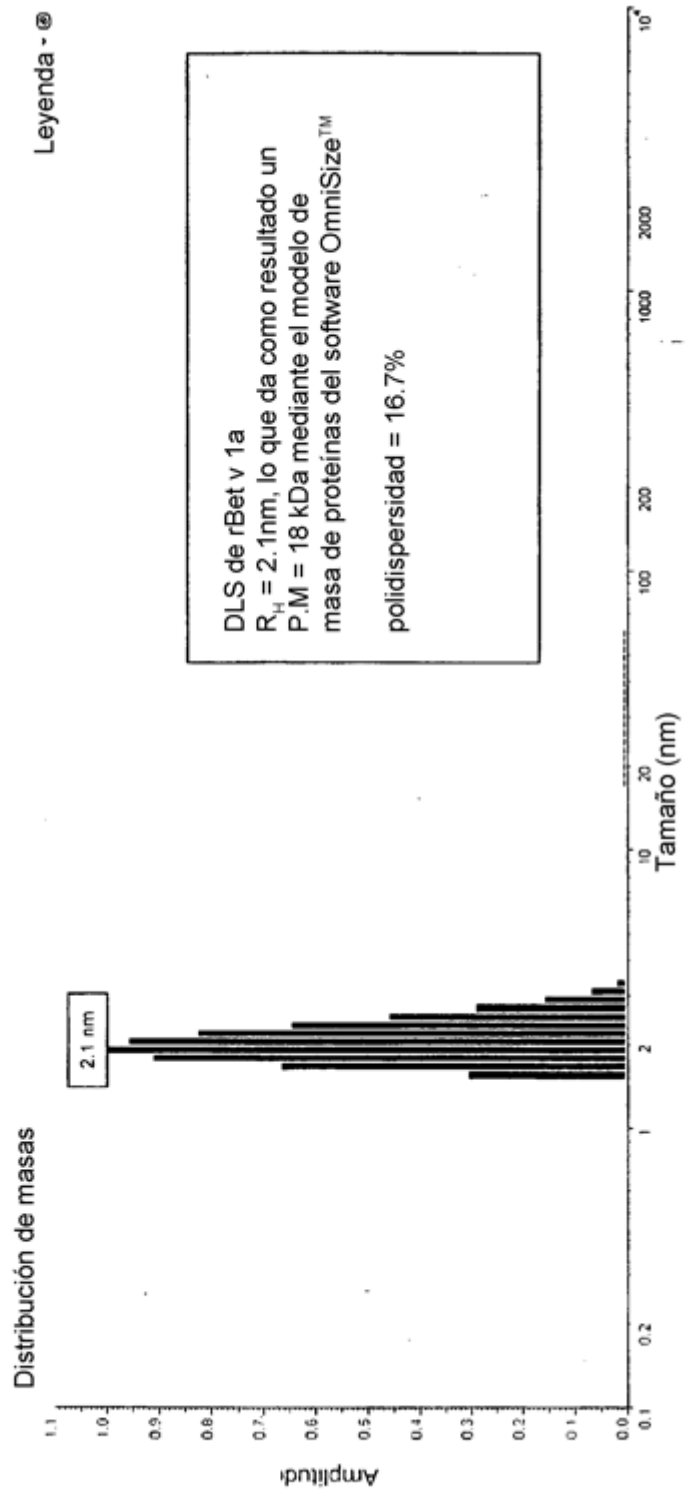


Fig. 19 Continuación

b)



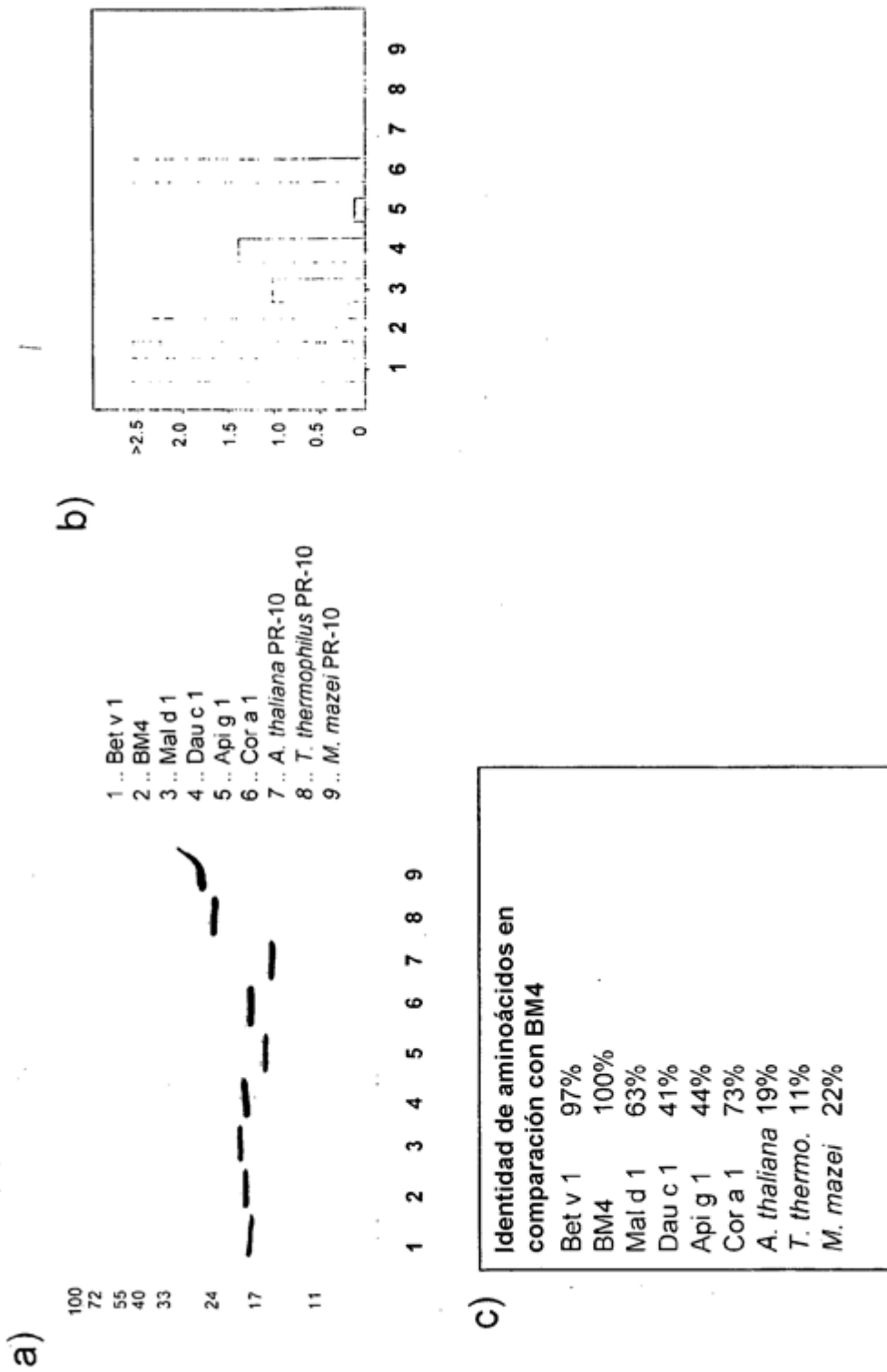


Fig. 20

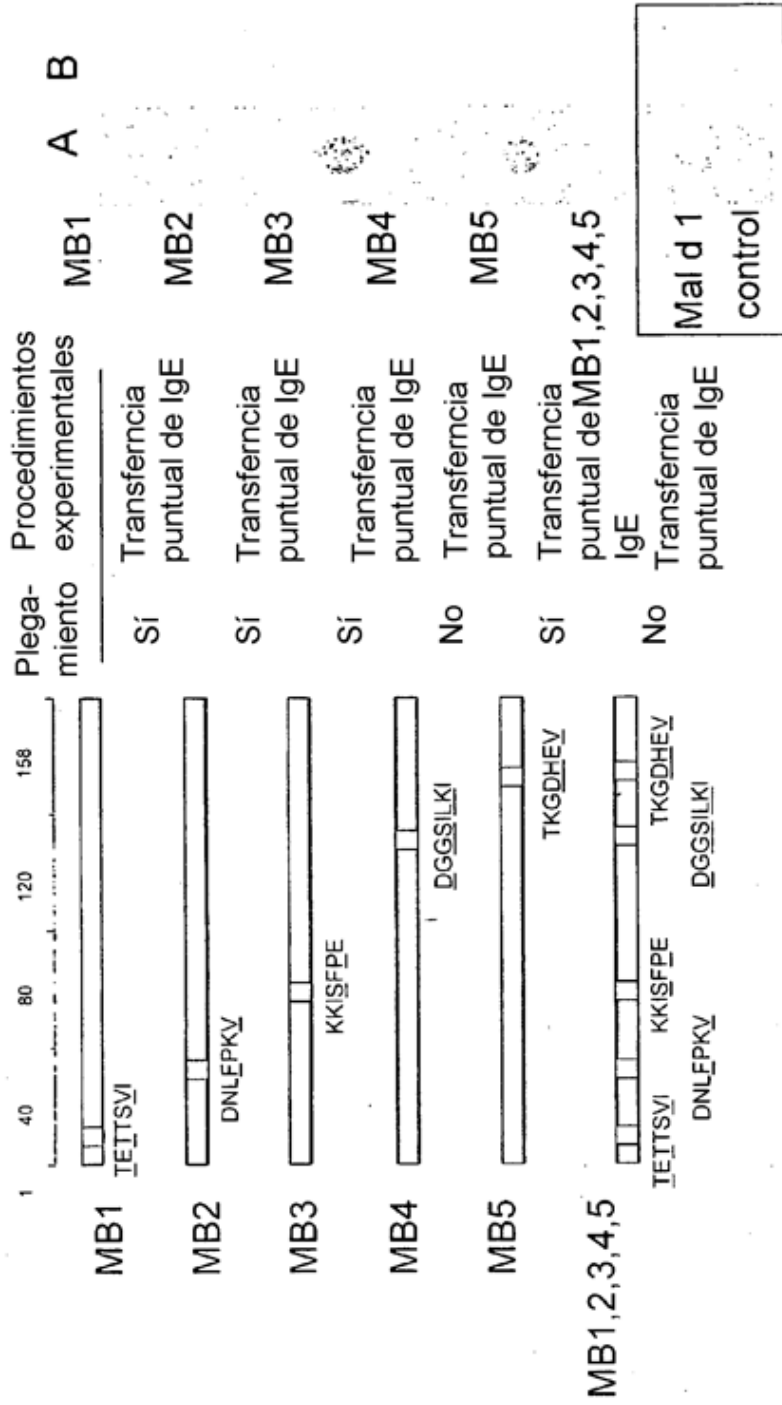


Fig. 21

A.. Transferencia puntual de IgE usando una combinación de suero de pacientes alérgicos a Bet v 1 con síndrome de polen-alimentos (n = 14)

B.. Inmunotransferencia usando un anticuerpo policlonal anti-Bet v 1