(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 526 678**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2011** **E 11788523 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014** **EP 2646460**

(54) Título: **Polipéptidos hipoalergénicos para el tratamiento de alergia contra ácaros del polvo doméstico**

(30) Prioridad:

01.12.2010 EP 10193292

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.01.2015

(73) Titular/es:

BIOMAY AG (100.0%)
Lazarettgasse 19
1090 Wien, AT

(72) Inventor/es:

CHEN, KUAN-WEI;
VRTALA, SUSANNE y
VALENTA, RUDOLF

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 526 678 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

Polipéptidos hipoalergénicos para el tratamiento de alergia contra ácaros del polvo doméstico

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia contra alergia mediada por IgE, particularmente alergia contra ácaros del polvo doméstico (HDM). Más específicamente, la invención se refiere al diseño de una nueva vacuna hipoalergénica recombinante contra alergia a HDM.

Antecedentes de la invención

Los ácaros del polvo doméstico (HDM) son uno de los factores de riesgo más importante asociados con el desarrollo de enfermedades alérgicas tales como rinitis, dermatitis atópica y asma (1, 2) y más del 50 % de todos los pacientes alérgicos en todo el mundo padecen alergia a HDM (3).

Hasta ahora, se han identificado y caracterizado 23 proteínas diferentes como alérgenos HDM (4, 5). Los alérgenos del grupo 1 y grupo 2 de *Dermatophagoides pteronyssinus* representan los alérgenos HDM clínicamente más importantes con frecuencias de unión a IgE de más del 80 % (6-9), y que pueden encontrarse a elevadas concentraciones en ácaros y en heces de ácaros (10, 11).

La inmunoterapia específica de alérgeno (SIT) representa el único enfoque causativo y modificador de enfermedad con efectos duraderos (12-16), que se basa en la administración de dosis crecientes de los alérgenos que provocan enfermedad. Actualmente, se realiza SIT con extractos de alérgeno natural. Pero varios estudios recientes han revelado la baja calidad de los extractos de alérgeno natural del polen, caspa de animales y ácaros del polvo doméstico que pueden limitar la eficacia clínica de SIT (17-19). Además, la SIT puede inducir efectos secundarios graves en pacientes alérgicos, que limitan la amplia aplicabilidad de este tratamiento en particular para alergia a ácaros del polvo doméstico.

Se ha hecho muchos esfuerzos por diseñar derivados hipoalergénicos recombinantes para mejorar la seguridad y eficacia de la SIT. Y ya se han desarrollado varios derivados hipoalergénicos de los alérgenos de ácaros del grupo 2 y han demostrado ser adecuados para inmunoterapia (20-26). En contraste, existen solamente unos pocos derivados hipoalergénicos de alérgenos de ácaros del grupo 1, que no están bien caracterizados (27, 28).

La mayoría de las estrategias que usan derivados hipoalergénicos solamente pueden tratar la alergia a Der p 1 o Der p 2 y más del 50 % de los pacientes alérgicos a HDM reaccionan con ambos alérgenos, Der p 1 y Der p 2 (29). Las ventajas de moléculas híbridas son que contienen todos los epítopos de células T en una molécula y estudios previos demostraron que moléculas híbridas inducen respuestas más fuertes y más tempranas de IgG que las moléculas más pequeñas individuales (30, 31).

El WO 2009/118642 A2 describe proteínas híbridas hipoalergénicas compuestas por fragmentos de alérgenos Der p 1 y Der p 2. Puede encontrarse una descripción similar en Asturias et al. (2009) Clinical & Experimental Allergy 39, 1088-1098. Sin embargo, uno de los derivados, es decir, QM1, descrito en Asturias mostró casi la misma reactividad de IgE que el alérgeno natural. El segundo derivado descrito por Asturias, es decir, QM2, mostró reactividad reducida de IgE pero no se demuestra que la inmunización con este derivado indujera anticuerpos IgG específicos para el alérgeno Der p 1. Además, la inhibición media de las IgE de pacientes alérgicos a ácaros del polvo doméstico por anticuerpos IgG anti-QM2 en una mezcla de Der p 1 y Der p 2 no fue mator de un 20 % de inhibición media.

Bussieres et al. (2010) International archives of allergy and immunology 153/2, 141-151 describen estudios sobre proteínas de fusión recombinantes que ensamblan los alérgenos Der p 1 y Der p 2 de *Dermatophagoides pteronyssinus.* Estos derivados muestran ninguna reducción o solamente una reducción moderada de aproximadamente 10 veces de su actividad alergénica y no se ha investigado si la inmunización con estos derivados induce IgG específica de alérgeno que inhiba la unión de IgE de pacientes alérgicos.

Chen et al. (2008) Molecular Immunology Volumen 45, Tema 9, 2486-2498 describe estudios sobre la reducción de la alergenicidad de Der p 2 por ingeniería genética. Este derivado incluye solamente Der p 2 pero no Der p 1 y por lo tanto no puede usarse para tratar a pacientes alérgicos a Der p 1.

Los inventores de esta solicitud usaron la tecnología de híbridos para construir una vacuna de combinación hipoalergénica para inmunoterapia de alergia a HDM. Las dos proteínas mosaico construidas consisten en fragmentos derivados de Der p 1 y Der p 2. Una construcción contenía los aminoácidos originales de los dos alérgenos de tipo silvestre (Der p 2/1C, también mencionados en este documento como Dp 2/1 C) mientras que en la otra construcción los restos de cisteína se remplazaron con restos de serina (Der p 2/1 S, también mencionados en este documento como Dp 2/1 S). Estas dos proteínas mosaico se caracterizan por una ausencia casi completa de reactividad IgE y actividad alergénica y por lo tanto son diferentes del QM1 descrito por Asturias y los derivados

descritos por Bussieres. Ambos derivados incluyen todos los elementos de secuencia de Der p 1 y por lo tanto son diferentes de los derivados descritos por Chen. Los anticuerpos IgG inducidos por ambos derivados (es decir, Der p 2/1C y Der p 2/1S) inhibieron la unión de IgE de pacientes alérgicos a cada uno de los dos alérgenos, Der p 1 y Der p 2 (Tabla I), que no se había mostrado para la IgG inducida por QM2 hecho por Asturias.

Inesperadamente, los anticuerpos IgG inducidos por Der p 2/1S que difiere solamente por el remplazo de los restos de cisteína en restos de serina, inhibieron la unión de IgE de pacientes alérgicos a Der p 1 más del doble de lo inducido por inmunización con Der p 2/1C (véase el ejemplo 6 y los datos en la Tabla I). La presente invención por lo tanto se refiere específicamente a los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de Der p 2/1 S o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos.

Sumario de la invención

Un primer aspecto de la invención es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº 9 o 7.

Otro aspecto de la invención es un polinucleótido que codifica el polipéptido de esta invención.

Otro aspecto más de esta invención es un vector o plásmido, que comprende el polinucleótido de la presente invención.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la invención, el polinucleótido de la invención, o el vector o plásmido de la invención; y un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es el uso del polipéptido de la invención para la prevención y/o tratamiento de alergia, preferiblemente de alergia a ácaros del polvo doméstico. La invención también se refiere al uso del polipéptido de la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de alergia, preferiblemente de alergia a ácaros del polvo doméstico.

Otro aspecto más de la invención es un método para tratar y/o prevenir un trastorno alérgico, que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o polinucleótido de esta invención. Otro aspecto más de la invención es un método para tratar y/o prevenir un trastorno alérgico, que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica o vacuna de esta invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra una ilustración del modo en que se construyeron las proteínas mosaico Der p 2/1. Se volvieron a ensamblar tres fragmentos de Der p 1 que comprende los aminoácidos (aa) 1-84, aa 85-143 y aa 144-222 (1.1, 1.2 y 1.3) y dos fragmentos de Der p 2 que comprenden los aa 1-53 y aa 54-129 (2.1 y 2.2) en el orden 1.3, 2.2, 1.2, 2.1, 1.1. Dp 2/1C contiene la secuencia original de aa de Der p 1 y Der p 2 con doce restos de cisteína (líneas punteadas), en Dp 2/1 S los restos de cisteína se intercambiaron con restos de serina.

La Figura 1B y C muestran las secuencias de ADN con codones optimizados y los correspondientes aminoácidos de Der p 2/1C (B) y Der p 2/1 S (C).

La Figura 2 muestra un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie con las proteínas mosaico Der p 2/1C y Der p 2/1S expresadas (carriles 1) y purificadas (carriles 2) (A). Y un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie que contenía Der p 2/1C y Der p 2/1 S purificadas se separó en condiciones reductoras (carriles r) y no reductoras (carriles nr) y un marcador molecular (carriles M) (B).

La Figura 3 muestra los espectros CD de ultravioleta lejano de nDer p 1, rDer p 2 y las proteínas mosaico Dp 2/1. Los resultados del análisis CD UV lejano de las proteínas se expresan como las elipticidades medias de los restos (eje y) a longitudes de onda dadas (eje x).

La Figura 4 muestra la reactividad a IgE de las proteínas mosaico nDer p 1, rDer p 2 y Dp 2/1. Las proteínas nDer p 1, rDer p 2, las dos proteínas mosaico Dp 2/1 y BSA sometidas a dot-blot se ensayaron para la reactividad de IgE con sueros de 21 pacientes alérgicos a HDM (paciente 1-21), suero de un individuo no alérgico (NC) y tampón sin suero (BC). Las IgE unidas se detectaron con anticuerpos anti-IgE humana marcados con ^{125}I y se visualizaron por autorradiografía.

La Figura 5 muestra la actividad alergénica de Der p 1, Der p 2 y las proteínas mosaico Der p 2/1. Se estimularon basófilos de 8 pacientes alérgicos a ácaros con diversas concentraciones de nDer p 1, rDer p 2, Der p 2/1C y Der p2/1 S (ejes x). La expresión de CD203c se determinó por análisis FACS y se presenta como índice de estimulación (SI) (ejes y).

La Figura 6 muestra las respuestas de anticuerpo IgG inducidas por inmunización de conejos con Der p 1, Der p 2 y las proteínas mosaico Dp2/1. Los sueros obtenidos de conejos antes (pre) o después (inmune) de inmunización con nDer p 1, rDer p 2, Der p 2/1C y Der p 2/1 S se ensayaron para la reactividad de IgG a nDer p 1, rDer p 2, proteínas mosaico Der p 2/1 o BSA sometidas a dot-blot. Los anticuerpos IgG unidos se detectaron con anticuerpos de burro anti-IgG de conejo marcados con ^{125}I.

La Tabla I muestra la inhibición de la unión de IgE de pacientes alérgicos a nDer p 1 y rDer p 2 con antisuero de conejo anti-Der p 1, anti-Der p 2 o anti-Der p 2/1. Los resultados se indican en % de inhibición de la unión de IgE.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos de la invención

El polipéptido de la invención comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº 9 o sustancialmente los mismos aminoácidos. La expresión "sustancialmente los mismos" se refiere a variantes que tienen de 1 a 5 sustituciones de aminoácidos respecto a la SEC ID Nº 9, pero que tienen sustancialmente la misma actividad biológica.

El polipéptido de esta invención no consiste necesariamente sólo en las secuencias de aminoácidos derivadas de los alérgenos. Es posible que se inserten secuencias no nativa (por ejemplo, secuencias espaciadoras) entre los fragmentos (siendo esos fragmentos secuencias de aminoácidos consecutivas de Der p 1 y Der p 2). También es posible que los polipéptidos comprendan una secuencia de marca que facilite la purificación del polipéptido tras la expresión en una célula hospedadora. Una "marca", como se usa en este documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos distinta que puede usarse para detectar o purificar el polipéptido proporcionado, donde la marca no contribuye por lo demás a la función esencial de la composición. Ejemplos de dichas secuencias de marca incluyen, aunque sin limitación marca FLAG, marca Hemaglutinina (HA), marca myc y marca polihistidina. Los especialistas en la técnica conocen otras marcas. La marca preferida es una marca hexahistidina que permite la purificación por cromatografía de quelato Ni^{2+}. Además, el polipéptido puede contener un resto foráneo de metionina en la posición del aminoácido 1 que resulta de su expresión en células hospedadoras. La metionina a menudo estará presente si la parte N-terminal del polipéptido es un fragmento interno o C-terminal de alérgeno. El polipéptido proporcionado puede tener adicionalmente aminoácidos N-terminales, C-terminales o intermedios delecionados que no contribuyen a la actividad esencial del polipéptido.

El polipéptido hipoalergénico puede comprender o consistir en una cualquiera de las siguientes estructuras (I) a (VIII), escritas desde el extremo N- al C-terminal:

(I) Met-X-marca,
(II) Met-X,
(III) X-marca,
(IV) Met-marca-X,
(V) marca-X,
(VI) marca-X-marca,
(VII) X
(VIII) Met-marca-X-marca

donde Met es un resto de metionina N-terminal, X es la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº 9, y marca es una secuencia de marca peptídica (por ejemplo, $(His)_6$). La secuencia marca habitualmente es de 5 a 15 aminoácidos de longitud.

El polipéptido puede consistir en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº 7 y 9.

Determinación de la reactividad a IgE

El polipéptido de la invención preferiblemente tiene una reactividad reducida a IgE respecto a Der p 1 y/o Der p 2. En su sentido más amplio, la expresión "reactividad a IgE" se refiere a la capacidad de una sustancia de unirse a anticuerpos IgE. Más específicamente, como se usa en este documento, la expresión "reactividad a IgE" se refiere a la capacidad del polipéptido de unirse anticuerpos IgE de individuos que son alérgicos contra uno o más de los alérgenos de los cuales se obtienen los fragmentos dentro del polipéptido.

La reactividad a IgE puede medirse determinando el grado de unión entre (1) IgE sérica de individuos que son alérgicos contra uno o más de Der p 1 y Der p 2, y (2) el polipéptido. Esto puede hacerse por el método descrito en la referencia (26).

Como alternativa, la reactividad a IgE y la actividad alergénica pueden determinarse analizando la expresión de

CD203c sobre basófilos humanos que se aislaron de individuos alérgicos a uno o más de Der p 1 y Der p 2. Véase el ejemplo 4 y la referencia (32).

Determinación de la reactividad a células T

El polipéptido preferiblemente tiene reactividad a células T. La expresión "reactividad a células T" como se usa en este documento se refiere a la capacidad de una sustancia de unirse específicamente a receptores de células T. Más específicamente, "reactividad a células T" significa la capacidad del polipéptido de inducir proliferación de células T.

La reactividad a células T de los polipéptidos puede medirse (1) proporcionando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de individuos alérgicos contra uno o más de los alérgenos de los cuales se obtienen los fragmentos, y (2) determinando el grado de proliferación de células T contenido en dichas PBMC. Véase Ball et al. (2009) Allergy 64:569-80.

Inducción de una respuesta protectora de IgG

El polipéptido de la invención preferiblemente tiene la capacidad de inducir una respuesta de IgG contra uno o más de los alérgenos de los cuales se obtienen los fragmentos. Esto puede determinarse (1) inmunizando a un mamífero no humano (por ejemplo, un ratón, rata o conejo) con el polipéptido, y (2) determinando la cantidad de anticuerpos IgG creados en dicho mamífero no humano, que son específicos para dicho uno o más alérgenos de los cuales se obtienen los fragmentos. Los anticuerpos IgG medidos son preferiblemente anticuerpos IgG1. Preferiblemente, la etapa (2) se realiza usando un ensayo ELISA. Véase el ejemplo 5.

Los polipéptidos son preferiblemente capaces de inducir una respuesta protectora de IgG. Esto puede determinarse (1) proporcionando una composición que contiene anticuerpos IgG por inmunización de un mamífero no humano (por ejemplo, un ratón, rata o conejo) con el polipéptido; (2) proporcionando una composición que contiene anticuerpos IgE de individuos que son alérgicos contra uno o más de dichos alérgenos de los cuales se obtienen los fragmentos del polipéptido, y (3) midiendo si dicha composición que contiene anticuerpos IgG puede bloquear la unión de dichos anticuerpos IgE a uno o más dichos alérgenos y/o el grado a que lo hace.

Este ensayo se realiza preferiblemente usando un ensayo ELISA. Por ejemplo, los alérgenos de tipo silvestre de los cuales se obtienen los fragmentos pueden inmovilizarse en una placa ELISA. La placa ELISA pretratada de este modo después puede ponerse en contacto con dicha composición que contiene los anticuerpos IgG para permitir la unión de anticuerpos IgG a dichos alérgenos inmovilizados. Después de lavado, la composición que contiene dichos anticuerpos IgE se pone en contacto con la placa ELISA. Después de lavado, se determina la cantidad de anticuerpos IgE. Véase el Ejemplo 6.

Aspectos adicionales de la invención

La invención se refiere adicionalmente a un polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención. Debido a la degeneración del código genético, muchas moléculas polinucleotídicas diferentes pueden codificar un único polipéptido. El polinucleótido de la invención preferiblemente es una construcción de expresión para obtener el polipéptido después de su expresión en células hospedadoras. La construcción de expresión puede comprender adicionalmente componentes que son generalmente conocidos en la técnica tales como secuencias promotoras, genes que codifican factores de resistencia contra antibióticos, un origen de replicación y similares. Preferiblemente, el polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID Nº 10. Más preferiblemente, el polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID Nº 8.

La invención se refiere adicionalmente a una célula transfectada o transformada con un polinucleótido de la presente invención. Las células adecuadas incluyen células eucariotas y células procariotas. Las células eucariotas pueden transfectarse por métodos conocidos en la técnica tales como transfección mediada por fosfato cálcico, electroporación, lipofección, etc.

La invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica o vacuna que contiene el polipéptido, polinucleótido o célula de acuerdo con esta invención. La composición farmacéutica puede contener adicionalmente uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables tal como un tampón o solución salina. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la invención es una composición de vacuna. En una realización particular, la composición farmacéutica contiene adicionalmente un adyuvante tal como hidróxido de aluminio.

La invención también se refiere a un método para la preparación del polipéptido de la invención. El método comprende proporcionar un polinucleótido que codifica el polipéptido, introducir dicho polinucleótido en una célula hospedadora, cultivar la célula hospedadora obtenida de este modo en condiciones tales que el polipéptido híbrido se exprese, y recuperar el producto de expresión de la célula. El polinucleótido puede prepararse por métodos conocidos en la técnica. Puede preferirse usar la tecnología PCR para preparar el polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención.

La invención se refiere adicionalmente al uso del polipéptido, un polinucleótido o una célula descrita en este documento para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de un trastorno alérgico, preferiblemente de alergia a ácaros del polvo doméstico. Dicho medicamento puede estar compuesto por el polinucleótido que codifica una vacuna que puede usarse directamente para la vacunación basada en ADN contra alergia de Tipo 1. El polipéptido recombinante o sintético puede usarse para preparar formulaciones para el tratamiento oral, sublingual o parenteral de trastornos alérgicos de Tipo 1 que se usan ahora de forma rutinaria para inmunoterapia. Ejemplos de formulaciones para inmunoterapia sublingual o polipéptido híbrido unido a adyuvante para inmunoterapia de inyección. Aplicaciones posibles incluyen también formas basadas en células de inmunoterapia que pueden basarse en, por ejemplo, células dendríticas u otras células presentadoras de antígeno. Esas células se transforman y expresan antígeno *in vivo.* Preferiblemente se usan células ortólogas transformadas con vectores adecuados.

Un modo de aplicación puede ser la inyección subcutánea de polipéptido unido a adyuvante. Otra posibilidad es administración oral o nasal del polipéptido para inducir tolerancia inmunológica o anergia contra los componentes del polipéptido. Todas las posibles formulaciones pueden prepararse de acuerdo con medidas que son conocidas para los especialistas en la técnica (esquema de administración de adyuvantes de dosificación).

La invención se refiere adicionalmente al uso del polipéptido descrito en este documento o de un polipéptido o una célula descrita en este documento para la preparación de un medicamento para vacunación profiláctica o inducción de tolerancia. La administración profiláctica de polipéptidos híbridos significa la administración del polipéptido a individuos, preferiblemente niños todavía no sufren alergia de Tipo 1 para inducir un estado de tolerancia inmunólogica, anergia o ausencia de sensibilidad, o una inmunidad protectora contra los componentes de la vacuna híbrida. Esto puede conseguirse mediante los diversos protocolos resumidos para el tratamiento de un trastorno alérgico establecido. El tratamiento profiláctico puede realizarse con los polipéptidos o polinucleótidos descritos en este documento anteriormente.

En una realización adicional, la invención se refiere al uso de un polipéptido descrito en este documento para la detección de anticuerpos contra una proteína alergénica en una muestra. El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgM IgE, IgG o IgA. La concentración del anticuerpo puede determinarse a partir de una muestra que se ha obtenido de un fluido corporal. La muestra pueden proporcionarla animales o seres humanos. Dichos ensayos pueden basarse en un polipéptido inmovilizado en fase sólida o el polipéptido en fase fluida. Ejemplos para dichos ensayos incluyen ensayos ELISA, ensayos de transferencia de Western o cualquier otro ensayo donde el polipéptido se inmoviliza para unirse a anticuerpos específicos procedentes de la muestra. Como alternativa, el polipéptido se añade directamente al fluido que contiene anticuerpos para adsorber anticuerpos específicos como, por ejemplo, en ensayos inmunológicos competitivos.

El polipéptido de la invención también puede usarse para ensayos celulares tal como un ensayo de proliferación de células T, etc.

Sumario de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos mostradas en la lista de secuencias:

SEC ID Nº	**secuencia/construcción**
1	secuencia de aminoácidos de Der p 1 de tipo silvestre madura (es decir sin secuencia señal y propéptido) con metionina N-terminal
2	secuencia de aminoácidos de Der p 2 de tipo silvestre con 2 aminoácidos foráneos en el extremo N-terminal y una marca hexahistidina en el extremo C-terminal; esta construcción se usó en los ejemplos
3	secuencia de ADN que codifica la SEC ID Nº 1
4	secuencia de ADN que codifica la SEC ID Nº 2
5	secuencia de aminoácidos de la construcción Dp 2/1C
6	secuencia de ácido nucleico que codifica la SEC ID Nº 5
7	secuencia de aminoácidos de la construcción Dp 2/1S
8	secuencia de ácido nucleico que codifica la SEC ID Nº 7
9	secuencia de aminoácidos de la construcción Dp 2/1 S sin $(His)_6$ C-terminal
10	secuencia de ácido nucleico que codifica la SEC ID Nº 9
11	secuencia de aminoácidos de marca hexahistidina

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención. El alcance de la invención, sin embargo, no está limitado a los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de proteínas mosaico Der p 2/1

Para construir la proteína mosaico Der p 2/1, se volvieron a ensamblar tres fragmentos de Der p 1 (1.1 aa1-84; 1.2 aa 85-143; 1.3 aa144-222) y dos fragmentos de Der p 2 (2.1 aa 1-53; 2.2 aa 54-129) en el siguiente orden: 1-3, 2.2, 1.2, 2.1, 1.1 (Figura 1A). Se sintetizaron dos genes sintéticos para las proteínas mosaico Der p 2/1 con una marca hexahistidina C-terminal y se optimizaron los codones para la expresión en *E. coli* (ATG biosynthetics, Merzhausen, Alemania). Un gen contenía el ADN que codifica la secuencia original de aa de Der p 1 y Der p 2 con los doce restos de cisteína (Dp 2/1 C) (Figura 1B) y en el otro gen, los restos de cisteína se intercambiaron con restos de serina (Dp 2/1S) (Figura 1C). Los genes sintéticos se clonaron en el fragmento NdeI/EcoRI del sitio de clonación múltiple del vector de expresión pET17b y las secuencias de ADN se determinaron por secuenciación (ATG biosynthetics).

Ejemplo 2: Expresión y purificación de proteínas mosaico Der p 2/1

Los vectores de expresión que contenían las construcciones Der p 2/1 se transformaron en *E. coli* cepa BL21 (DE3). La expresión de proteínas se realizó en 250 ml de cultivo líquido por inducción con isopropil-β-tiogalactopiranósido (IPTG) 0,5 mM a una DO_{600} de 0,8 durante 4 h a 37 ºC y las células se recogieron por centrifugación a 4000xg durante 15 min. a 4 ºC. Los sedimentos bacterianos obtenidos de los 250 ml de cultivo líquido se resuspendieron en 10 ml de imidazol 25 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1 % (v/v). Las células se lisaron mediante tres ciclos de congelación/descongelación (-70 ºC/+50 ºC), se degradó el ADN por incubación con 1 µg de DNasa I durante 10 min. a temperatura ambiente y los desechos celulares se retiraron por centrifugación (10.000xg, 30 min., 4 ºC). Las proteínas mosaico Dp2/1C y Dp 2/1 S se encontraron en el sedimento en la fracción de cuerpos de inclusión, que se solubilizó con clorhidrato de guanidina 6 M, NaH_2PO_4 100 mM, Tris-Cl 10 mM, pH 8 durante 4 h a temperatura ambiente. Los residuos insolubles se retiraron por centrifugación (10.000xg, 15 min., 4 ºC) y las dos proteínas mosaico se purificaron en condiciones desnaturalizantes sobre columnas de afinidad de resina Ni-NTA (QIAGEN, Hilden, Alemania).

Las fracciones, que contenían proteínas recombinantes de más del 90 % de pureza se dializaron frente a NaH_2PO_4 10 mM pH 4,7 y las concentraciones finales de proteína se determinaron mediante el kit de ensayo de proteínas BCA (Novagen, Merck, Darmstadt, Alemania).

Ejemplo 3: Caracterización de proteínas mosaico Der p 2/1

La pureza y la masa molecular se controlaron por SDS-PAGE mostrado en la Figura 2A. Ambos proteínas mosaico muestran una clara banda a aproximadamente 37 kDa. Para conseguir información acerca del comportamiento de polimerización de las proteínas mosaico, se realizó SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras mostradas en la Figura 2B. Para condiciones reductoras, se usó un tampón de muestra que contenía β-Mercaptoetanol y las muestras se hirvieron a 95 ºC durante 5 minutos, para condiciones no reductoras, se usó un tampón de muestra sin β-Mercaptoetanol. En condiciones reductoras las dos proteínas mosaico Der p 2/1 aparecen como proteínas monoméricas (Figura 2B, carriles r). Pero en condiciones no reductoras las dos proteína mosaico Der p 2/1 forman agregados, mientras que Der p 2/1C forma más agregados que Der p 2/1 S (Figura 2B, carriles nr).

Para analizar el plegamiento proteico, se realizaron mediciones de dicroísmo circular (CD) con nDer p 1, rDer p 2, Der p 2/1C y con Der p 2/1 S a concentraciones de proteína de 0,1 mg/ml en NaH_2PO_4 10 mM, pH 4,7 usando una cubeta de cuarzo rectangular con una longitud de paso de 0,2 cm. Se registraron los espectros de 190 a 260 nm con 0,5 nm de resolución a una velocidad de exploración de 50 nm/min y resultaron del promedio de tres exploraciones. Los espectros finales se corrigieron sustrayendo los espectros basales obtenidos con el tampón correspondiente (NaH_2PO_4 10 mM, pH 4,7) en condiciones idénticas. Los resultados se expresan como la elipticidad media de los restos (Θ) a una longitud de onda dada. El espectro CD de nDer p 1 indicó un elevado contenido de hélice α, que se caracteriza por un mínimo a 208 nm y a 222 nm (Figura 3). El espectro CD de rDer p 2 muestra un mínimo a 215 nm y un máximo a 197 nm, que es típico de conformación en lámina β (Figura 3). Los espectros CD de Der p 2/1C y Der p 2/1 S son muy similares mostrando un mínimo amplio a 215 nm y un máximo a 195 nm, que es una forma típica de un plegamiento mixto α/β (Figura 3).

Ejemplo 4: Reactividad a IgE y actividad alergénica de las proteínas mosaico Der p 2/1

Se ensayó la reactividad de IgE de pacientes alérgicos a los ácaros a proteínas mosaico Der p 2/1 por análisis dot blot mostrado en la Figura 4. Se aplicaron puntualmente 2 µl de nDer p 1, rDer p 2, las dos proteínas mosaico (Der p 2/1C y Der p 2/1 S) y, para propósitos de control, BSA (cada una 0,1 mg/ml) en tiras de membrana de nitrocelulosa. Se determinó la reactividad de IgE de 21 pacientes alérgicos a los ácaros y dos controles (NC: persona no alérgica, BC: control de tampón) a las proteínas sometidas a dot-blot como se ha descrito (26). Todos los pacientes alérgicos mostraron una reactividad positiva de IgE a nDer p 1 y rDer p 2, mientras que solamente tres pacientes (paciente 1, 8, y 19) mostraron reactividad de IgE a Der p 2/1C y dos pacientes (paciente 1 y 8) mostraron reactividad reducida de IgE a Der p 2/1 S. Todos los demás pacientes no mostraron reactividad detectable de IgE a Der p 2/1C y Der p

2/1 S. Cuando se usó suero de una persona no alérgica (NC) o tampón sin suero (BC), no se encontraron reactividades a ninguna proteína aplicada puntualmente (Figura 4, carriles NC, BC). Ninguno de los pacientes mostró ninguna reactividad de IgE a la proteína de control, BSA (Figura 4).

La actividad alergénica de las dos proteínas mosaico Der p 2/1 se comparó con los alérgenos de tipo silvestre nDer p 1 y rDer p 2 por determinación de la expresión de CD203c en basófilos de 8 pacientes alérgicos a HDM, cuando se estimulaban con los dos alérgenos de tipo silvestre o las dos proteínas mosaico Der p 2/1 mostradas en la Figura 5. Se recogieron muestras de sangre heparinizada de 8 pacientes alérgicos a los ácaros después de dar el consentimiento informado. Los basófilos se estimularon con diversas concentraciones (0,04-400 nM) de nDer p 1, rDer p 2, Der p 2/1C y Der p 2/1 S, y para propósitos de control, con un anticuerpo monoclonal anti-IgE (1 µg/ml) o PBS durante 15 min. (37 ºC). La expresión de CD203c se determinó como se ha descrito (32). Estos análisis mostraron que ambos alérgenos nDer p 1 y rDer p 2 de tipo silvestre inducían fuerte regulación positiva de la expresión de CD203c en todos los pacientes alérgicos a HDM ensayados a concentraciones entre 0,4 nM y 400 nM, mientras que no se obtuvieron regulaciones positivas relevantes con las proteínas mosaico Der p 2/1C y Der p 2/1 S hasta una concentración de 400 nM. Se usaron anticuerpos anti-IgE humana como control positivo e indujeron regulación positiva de expresión de CD203c en basófilos de todos los pacientes, mientras que no se obtuvo regulación positiva con tampón solo (datos no mostrados).

Ejemplo 5: Inmunización de conejos con las dos proteínas mosaico Der p 2/1

Para demostrar si las dos proteínas mosaico son capaces de inducir anticuerpos IgG específicos contra Der p 1 y Der p 2, se inmunizaron conejos cinco veces con Der p 2/1C o con Der p 2/1S (200 pg/inyección), usando CFA para la primera inmunización y cuatro veces IFA como adyuvantes. Además, los conejos se inmunizaron tres veces con nDer p 1 o rDer p 2 (200 µg/inyección) usando una vez adyuvante completo de Freund (CFA) y dos veces adyuvante incompleto de Freund (IFA) para crear anticuerpos IgG específicos contra los dos alérgenos de tipo silvestre. Ambas proteínas mosaico Der p 2/1 fueron capaces de inducir anticuerpos IgG específicos de Der p 1 y Der p 2 (Figura 6). Para propósitos de control, se usaron sueros de conejo anti-Der p 1 y anti-Der p 2. El suero de conejo anti-Der p 1 dio reacción positiva solamente con nDer p 1 aplicado puntualmente, mientras que el suero de conejo anti-Der p 2 dio reacción positiva con rDer p 2 y también con las dos proteínas mosaico Der p 2/1 (Figura 6). Ninguno de los sueros de conejo mostró ninguna reactividad a la proteína de control, BSA (Figura 6).

Ejemplo 6: Inhibición de la unión de IgE de pacientes alérgicos a nDer p 1 y rDer p 2 por anticuerpos de conejo anti-Der p 2/1C y anti-Der p 2/1S

Se investigó si los anticuerpos IgG inducidos por proteínas mosaico Der p 2/1 son capaces de inhibir la unión de IgE de pacientes alérgicos a HDM a nDer p 1 y rDer p 2 en experimentos de competición ELISA.

Se recubrieron placas Maxisorp ELISA (Nunc) durante una noche a 4 ºC con nDer p 1 o rDer p 2 (0,5 µg/pocillo en PBS), se lavaron dos veces con PBST (PBS; Tween 20 al 0,05 % [v/v]) y después se bloquearon en tampón de bloqueo (PBST, BSA al 1 % [p/v]) durante 3 h a temperatura ambiente. Se añadieron antisueros de conejo anti-nDer p 1, rDer p 2, Der p 2/1C y anti-Der p 2/1S (dilución 1:20 en PBST, BSA al 0,5 % (p/v)), y los correspondientes sueros preinmunes (dilución 1:20 en PBST, BSA al 0,5 % (p/v)) a las placas y se incubaron durante una noche a 4 ºC. Después de lavado, las placas se incubaron con sueros de pacientes alérgicos a ácaros (dilución 1:10 en PBST, BSA al 0,5 % (p/v)) durante una noche a 4 ºC. Los anticuerpos IgE humanos unidos se detectaron con anticuerpos de cabra anti-IgE humana conjugados a HRP (KPL, Gaithersburg, MD, EEUU) diluidos 1:2500 en PBST, BSA al 0,5 % (p/v) como se ha descrito (33). El porcentaje de inhibición de la unión de IgE se calculó del siguiente modo: 100 - (DOs/DOp) x 100. La DOs y la DOp representan las extinciones después de preincubación con el suero inmune y suero preinmune de conejo, respectivamente.

Los anticuerpos de conejo anti-Der p 1 inhibieron la unión de IgE de los pacientes a nDer p 1 entre el 49,1 % y el 91,8 % (media del 74,9 %). Las inhibiciones para nDer p 1 obtenidas con anticuerpo de conejo anti-Der p 2/1C (es decir, el 0-48,7 %; media del 24,1 %) y con anticuerpo de conejo anti-Der p 2/1S (es decir, el 31,9-66,0 %; media del 49,9 %) fueron inferiores en comparación con anticuerpo de conejo anti-Der p 1. Usando anticuerpo de conejo anti-Der p 2 se inhibió la unión de IgE de los pacientes a rDer p 2 entre el 50,3 % y el 92,9 % (media del 73,9 %) y la inhibición con anticuerpo de conejo anti-Der p 2/1C (es decir, el 56,9-93,4 %; media del 78,1 %) y con anticuerpo de conejo anti-Der p 2/1S (es decir, el 73-93,3 %; media del 86,1 %) fueron comparables con anticuerpo de conejo anti-Der p 2 (Tabla I).

Tabla I. Inhibición de la unión de IgE de pacientes alérgicos a nDer p 1 y rDer p 2 con antisueros de conejo anti-Der p 1, anti-Der p 2 o anti-Der p 2/1.

	inhibición para nDer p 1			inhibición para rDer p 2		
	nDer p 1	de conejo anti-Der p 2/1C	Der p 2/1S	rDer p 2	de conejo anti-Der p 2/1C	Der p 2/1S
Paciente 1	89,58	19,09	44,97	75,46	81,73	87,16
Paciente 2	88,09	41,54	56,23	92,20	93,35	94,30
Paciente 3	61,12	1,25	38,10	67,08	72,44	83,21

Paciente 4	72,28	35,68	59,61	69,94	71,64	82,09
Paciente 5	76,79	45,17	54,16	92,93	92,35	93,04
Paciente 6	89,30	43,06	61,66	80,89	85,07	90,28
Paciente 7	49,12	0,00	35,17	61,98	69,39	80,65
Paciente 8	58,05	0,00	31,92	59,21	64,62	78,48
Paciente 9	82,53	20,15	51,54	69,23	77,31	88,79
Paciente 10	91,78	48,72	65,99	88,12	89,86	93,47
Paciente 11	57,88	4,16	43,82	50,34	56,90	72,97
Paciente 12	82,10	30,41	55,72	79,37	82,59	88,31
media	**74,89**	**24,10**	**49,91**	**73,90**	**78,10**	**86,06**
Los resultados se muestran en % de inhibición de la unión de IgE						

Ejemplo 7

Los especialistas en la técnica son conscientes de que los polipéptidos hipoalergénicos correspondientes a los descritos anteriormente en los Ejemplos 1-6 pueden prepararse sobre la base de variantes de Der p 1 y Der p 2. Los números de acceso de diversos isoalérgenos de Der p 1 y Der p 2 se proporcionan en las siguientes tablas:

Tabla II

Isoalérgeno Der p 1	**Nº de acceso a GenBank Nucleótidos**	**Nº de acceso a UniProt**
Der p 1.0101	U11695 (variante)	P08176 (variante)
Der p 1.0102	U11695	P08176
Der p 1.0103	U11695 (variante)	P08176 (variante)
Der p 1.0104	U11695 (variante)	P08176 (variante)
Der p 1.0105	U11695 (variante)	P08176 (variante)
Der p 1.0106	U11695 (variante)	P08176 (variante)
Der p 1.0107	U11695 (variante)	P08176 (variante)
Der p 1.0108	U11695 (variante)	P08176 (variante)
Der p 1.0109	U11695 (variante)	P08176 (variante)
Der p 1.0110	U11695 (variante)	P08176 (variante)
Der p 1.0111	U11695 (variante)	P08176 (variante)
Der p 1.0112	U11695 (variante)	P08176 (variante)
Der p 1.0113	DQ185508 (variante)	Q3HWZ5 (variante)
Der p 1.0114	DQ185508 (variante)	Q3HWZ5 (variante)
Der p 1.0115	DQ185508 (variante)	Q3HWZ5 (variante)
Der p 1.0116	DQ185508 (variante)	Q3HWZ5 (variante)
Der p 1.0117	DQ185508 (variante)	Q3HWZ5 (variante)
Der p 1.0118	DQ185508 (variante)	Q3HWZ5 (variante)
Der p 1.0119	DQ185508 (variante)	Q3HWZ5 (variante)
Der p 1.0120	DQ185508 (variante)	Q3HWZ5 (variante)
Der p 1.0121	DQ185508 (variante)	Q3HWZ5 (variante)
Der p 1.0122	DQ185508 (variante)	Q3HWZ5 (variante)
Der p 1.0123	DQ185508 (variante)	Q3HWZ5 (variante)
Der p 1.0124	FM177224	

Tabla III

Isoalérgeno Der p 2	**Nº de acceso a GenBank Nucleótidos**	**Nº de acceso a UniProt**
Der p 2.0101	AF276239	P49278
Der p 2.0102	AF276239	P49278
Der p 2.0103	AF276239	P49278
Der p 2.0104	AF276239	P49278
Der p 2.0105	AF276239	P49278
Der p 2.0106	AF276239	P49278
Der p 2.0107	AF276239	P49278
Der p 2.0108	AF276239	P49278
Der p 2.0109	DQ185510	Q3HWZ3
Der p 2.0110	DQ185510	Q3HWZ3
Der p 2.0111	DQ185510	Q3HWZ3
Der p 2.0112	DQ185510	Q3HWZ3
Der p 2.0113	DQ185510	Q3HWZ3
Der p 2.0114	AM263560	Q1H8P8
Der p 2.0115	FM177223	

Estas secuencias de aminoácidos y ácido nucleicos de estas isoformas difieren de aquellas mostradas en las SEC ID Nº 1-4 en solamente pocas sustituciones. Por lo tanto, los especialistas en la técnica pueden proporcionar fácilmente construcciones también sobre la base de los isoalérgenos enumerados anteriormente.

Referencias

1. Voorhorst, R., M. I. Spieksma-Boezeman, y F. T. Spieksma. 1964. Is A Mite (Dermatophagoides Sp.) The Producer Of The House-Dust Allergen? Allerg. Asthma (Leipz) 10:329-334.
2. Platts-Mills, T. A., y M. D. Chapman. 1987. Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control. J. Allergy Clin, Immunol. 80:755-775.
3. Boulet, L. P., H. Turcotte, C. Laprise, C. Lavertu, P. M. Bedard, A. Lavoie, y J. Hebert. 1997. Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma. Clin. Exp. Allergy 27:52-59.
4. Thomas, W. R., W. A. Smith, B. J. Hales, K. L. Mills, y R. M. O'Brien. 2002. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. Int. Arch. Allergy Immunol. 129:1-18.
5. Weghofer, M., Y. Dall'Antonia, M. Grote, A. Stocklinger, M. Kneidinger, N. Balic, M. T. Krauth, E. Fernandez-Caldas, W. R. Thomas, M. van Hage, S. Vieths, S. Spitzauer, F. Horak, D. I. Svergun, P. V. Konarev, P. Valent, J. Thalhamer, W. Keller, R. Valenta, y S. Vrtala. 2008. Characterization of Der p 21, a new important allergen derived from the gut of house dust mites. Allergy 63:758-767.
6. Pittner, G., S. Vrtala, W. R. Thomas, M. Weghofer, M. Kundi, F. Horak, D. Kraft, y R. Valenta. 2004. Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens. Clin. Exp. Allergy 34:597-603.
7. Hales, B. J., A. C. Martin, L. J. Pearce, I. A. Laing, C. M. Hayden, J. Goldblatt, P. N. Le Souef, y W. R. Thomas. 2006. IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease. J. Allergy Clin. Immuno/. 118:361-367.
8. Chapman, M. D., y T. A. Platts-Mills. 1980. Purification and characterization of the major allergen from Dermatophagoides pteronyssinus-antigen P1. J. Immunol. 125:587-592.
9. Meyer, C. H., J. F. Bond, M. S. Chen, y M. T. Kasaian. 1994. Comparison of the levels of the major allergens Der p I and Der p II in standardized extracts of the house dust mite, Dermatophagoides pteronyssinus. Clin. Exp. Allergy 24:1041-1048.
10. Tovey, E. R., M. D. Chapman, y T. A. Platts-Mills. 1981. Mite faeces are a major source of house dust allergens. Nature 289:592-593.
11. Peake, H. L., A. J. Currie, G. A. Stewart, y A. S. McWilliam. 2003. Nitric oxide production by alveolar macrophages in response to house dust mite fecal pellets and the mite allergens, Der p 1 and Der p 2. J. Allergy Clin. Immunol. 112:531-537.
12. Durham, S. R., S. M. Walker, E. M. Varga, M. R. Jacobson, F. O'Brien, W. Noble, S. J. Till, Q. A. Hamid, y K. T. Nouri-Aria. 1999. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. N. Engl. J. Med. 341:468-475.
13. Larche, M., C. A. Akdis, y R. Valenta. 2006. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Nat. Rev. Immunol. 6:761-771.
14. Valenta, R. 2002. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. Nat. Rev. Immunol. 2:446-453.
15. Valenta, R., F. Ferreira, M. Focke-Tejkl, B. Linhart, V. Niederberger, I. Swoboda, y S. Vrtala. 2010. From allergen genes to allergy vaccines. Annu, Rev. Immunol. 28:211-241.
16. Akdis, M., y C. A. Akdis. 2009. Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. Nat Rev Drug Discov 8:645-660.
17. Focke, M., K. Marth, S. Flicker, y R. Valenta. 2008. Heterogeneity of commercial timothy grass pollen extracts. Clin. Exp. Allergy 38:1400-1408.
18. Focke, M., K. Marth, y R. Valenta. 2009. Molecular composition and biological activity of commercial birch pollen allergen extracts. Eur J Clin Invest 39:429-436.
19. Brunetto, B., R. Tinghino, M. C. Braschi, L. Antonicelli, C. Pini, y P. Iacovacci. Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis. Allergy 65:184-190.
20. Korematsu, S., Y. Tanaka, S. Hosoi, S. Koyanagi, T. Yokota, B. Mikami, y N. Minato. 2000. C8/119S mutation of major mite allergen Derf-2 leads to degenerate secondary structure and molecular polymerization and induces potent and exclusive Th1 cell differentiation. J. Immunol. 165:2895-2902.
21. Nakazawa, T., T. Takai, H. Hatanaka, E. Mizuuchi, T. Nagamune, K. Okumura, y H. Ogawa. 2005. Multiple-mutation at a potential ligand-binding region decreased allergenicity of a mite allergen Der f 2 without disrupting global structure. FEBS Lett. 579:1988-1994.
22. Smith, A. M., y M. D. Chapman. 1996. Reduction in IgE binding to allergen variants generated by site-directed mutagenesis: contribution of disulfide bonds to the antigenic structure of the major house dust mite allergen Der p 2. Mol. Immunol. 33:399-405.
23. Takai, T., S. Ichikawa, H. Hatanaka, F. Inagaki, y Y. Okumura. 2000. Effects of proline mutations in the major house dust mite allergen Der f 2 on IgE-binding and histamine-releasing activity. Eur. J. Biochem. 267:6650-6656.
24. Takai, T., A. Mori, T. Yuuki, H. Okudaira, y Y. Okumura. 1999. Non-anaphylactic combination of partially deleted fragments of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy. Mol. Immunol. 36:1055-1065.
25. Takai, T., T. Yokota, M. Yasue, C. Nishiyama, T. Yuuki, A. Mori, H. Okudaira, y Y. Okumura. 1997. Engineering of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy. Nat. Biotechnol. 15:754-758.

26. Chen, K., G. Fuchs, K. Sonneck, A. Gieras, I. Swoboda, N. Douladiris, B. Linhart, M. Jankovic, T. Pavkov, W. Keller, N. G. Papadopoulos, P. Valent, R. Valenta, y S. Vrtala. 2008. Reduction of the in vivo allergenicity of Der p 2, the major house-dust mite allergen, by genetic engineering. Mol. Immunol. 45:2486-2498.
27. Walgraffe, D., C. Matteotti, M. El Bakkoury, L. Garcia, C. Marchand, D. Bullens, M. Vandenbranden, y A. Jacquet. 2009. A hypoallergenic variant of Der p 1 as a candidate for mite allergy vaccines. J. Allergy Clin. Immunol. 123:1150-1156.
28. Suzuki, K., O. Kaminuma, L. Yang, Y. Motoi, T. Takai, S. Ichikawa, K. Okumura, H. Ogawa, A. Mori, F. Takaiwa, y T. Hiroi. 2009. Development of transgenic rice expressing mite antigen for a new concept of immunotherapy. Int. Arch. Allergy Immunol. 149 Suppl 1:21-24.
29. Taketomi, E. A., D. A. Silva, M. C. Sopelete, A. M. Gervasio, R. Alves, y S. J. Sung. 2006. Differential IgE reactivity to Der p 1 and Der p 2 allergens of Dermatophagoides pteronyssinus in mite-sensitized patients. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 16:104-109.
30. Linhart, B., B. Jahn-Schmid, P. Verdino, W. Keller, C. Ebner, D. Kraft, y R. Valenta. 2002. Combination vaccines for the treatment of grass pollen allergy consisting of genetically engineered hybrid molecules with increased immunogenicity. Faseb J. 16:1301-1303.
31. Linhart, B., A. Hartl, B. Jahn-Schmid, P. Verdino, W. Keller, M. T. Krauth, P. Valent, F. Horak, U. Wiedermann, J. Thalhamer, C. Ebner, D. Kraft, y R. Valenta. 2005. A hybrid molecule resembling the epitope spectrum of grass pollen for allergy vaccination. J. Allergy Clin. Immunol. 115:1010-1016.
32. Hauswirth, A. W., S. Natter, M. Ghannadan, Y. Majlesi, G. H. Schernthaner, W. R. Sperr, H. J. Buhring, R. Valenta, y P. Valent. 2002. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. J. Allergy Clin. Immunol. 110:102-109.
33. Swoboda, I., A. Bugajska-Schretter, P. Verdino, W. Keller, W. R. Sperr, P. Valent, R. Valenta, y S. Spitzauer. 2002. Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy. J. Immunol. 168:4576-4584.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biomay AG

<120> Polipéptidos hipoalergénicos para el tratamiento de alergia contra ácaros del polvo doméstico

<130> Mosaico de ácaro

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 223
<212> PRT
<213> *Dermatophagoides pteronyssinus*

<400> 1

Met Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys
20 25 30

Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr
35 40 45

Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val
50 55 60

Asp Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly
65 70 75 80

Ile Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg
85 90 95

Tyr Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe
100 105 110

Gly Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Val Asn Lys Ile
115 120 125

Arg Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly
130 135 140

Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile
145 150 155 160

Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val
165 170 175

Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser
180 185 190

Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn
195 200 205

Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
210 215 220

<210> 2
<211> 137
<212> PRT
<213> *Dermatophagoides pteronyssinus*

<400> 2

His Met Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys
1 5 10 15

Lys Val Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His
20 25 30

Arg Gly Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Val Phe Glu Ala Asn Gln Asn
35 40 45

Ser Lys Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Glu Gly Leu Glu
50 55 60

Val Asp Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Lys Cys
65 70 75 80

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

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

Met Gly Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys
115 120 125

Ile Arg Asp His His His His His His
130 135

<210> 3
<211> 672
<212> ADN
<213> *Dermatophagoides pteronyssinus*

<400> 3

atgaccaacg cttgctctat caacggtaac gctccggctg aaatcgacct gcgtcagatg 60

cgtaccgtta ccccgatccg tatgcagggt ggttgcggtt cttgctgggc tttctctggt 120

gttgctgcta ccgaatctgc ttacctggct taccgtaacc agtctctgga cctggctgaa 180

caggaactgg ttgactgcgc ttctcagcac ggttgccacg gtgacaccat cccgcgtggt 240

atcgaataca tccagcacaa cggtgttgtt caggaatctt actaccgtta cgttgctcgt 300

gaacagtctt gccgtcgtcc gaacgctcag cgtttcggta tctctaacta ctgccagatc 360

tacccgccga acgttaacaa aatccgtgaa gctctggctc agacccactc tgctatcgct 420

gttatcatcg gtatcaaaga cctggacgct ttccgtcact acgacggtcg taccatcatc 480

cagcgtgaca acggttacca gccgaactac cacgctgtta acatcgttgg ttactctaac 540

gctcagggtg ttgactactg gatcgttcgt aactcttggg acaccaactg gggtgacaac 600

ggttacggtt acttcgctgc taacatcgac ctgatgatga tcgaagaata cccgtacgtt 660

gttatcctgt aa 672

<210> 4
<211> 414
<212> ADN
<213> *Dermatophagoides pteronyssinus*

<400> 4

catatggatc aagtcgatgt caaagattgt gccaatcatg aaatcaaaaa agttttggta 60

ccaggatgcc atggttcaga accatgtatc attcatcgtg gtaaaccatt ccaattggaa 120

gccgttttcg aagccaacca aaactcaaaa accgctaaaa ttgaaatcaa agcttcaatc 180

gaaggtttag aagttgatgt tcccggtatc gatccaaatg catgccatta tatgaaatgt 240

ccattggtta aaggacaaca atatgatatt aaatatacat ggattgttcc aaaaattgca 300

ccaaaatctg aaaatgttgt cgtcactgtt aaagttatgg gtgataatgg tgttttggct 360

tgtgctattg ctactcatgc taaaatccgc gatcatcacc atcaccatca ctaa 414

<210> 5
<211> 357
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción Dp 2/1C

<400> 5

Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile
1 5 10 15

Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val
20 25 30

Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser
35 40 45

Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn
50 55 60

Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu Ile
65 70 75 80

Lys Ala Ser Ile Glu Gly Leu Glu Val Asp Val Pro Gly Ile Asp Pro
85 90 95

Asn Ala Cys His Tyr Met Lys Cys Pro Leu Val Lys Gly Gln Gln Tyr
100 105 110

Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Ile Val Pro Lys Ile Ala Pro Lys Ser Glu
115 120 125

Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly Asp Asn Gly Val Leu Ala
130 135 140

Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg Asp His Asn Gly Val Val
145 150 155 160

Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg
165 170 175

Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro
180 185 190

Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala
195 200 205

Ile Ala Val Ile Ile Gly Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn
210 215 220

His Glu Ile Lys Lys Val Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro
225 230 235 240

Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Val Phe Glu
245 250 255

Ala Asn Gln Asn Ser Lys Thr Ala Lys Ile Glu Thr Asn Ala Cys Ser
260 265 270

Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr
275 280 285

Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe
290 295 300

Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln
305 310 315 320

Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His
325 330 335

Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His
340 345 350

His His His His His
355

<210> 6
<211> 1086
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción Dp 2/1C

<400> 6

```
catatgatca aagacctgga cgctttccgt cactacgacg gtcgtaccat catccagcgt      60
gacaacggtt accagccgaa ctaccacgct gttaacatcg ttggttactc taacgctcag     120
ggtgttgact actggatcgt tcgtaactct tgggacacca actggggtga caacggttac     180
ggttacttcg ctgctaacat cgacctgatg atgatcgaag aatacccgta cgttgttatc     240
ctgatcaaag cttctatcga aggtctggaa gttgacgttc cgggtatcga cccgaacgct     300
tgccactaca tgaaatgccc gctggttaaa ggtcagcagt acgacatcaa atacacctgg     360
atcgttccga aaatcgctcc gaaatctgaa aacgttgttg ttaccgttaa agttatgggt     420
gacaacggtg ttctggcttg cgctatcgct acccacgcta aaatccgtga ccacaacggt     480
gttgttcagg aatcttacta ccgttacgtt gctcgtgaac agtcttgccg tcgtccgaac     540
gctcagcgtt tcggtatctc taactactgc cagatctacc cgccgaacgt taacaaaatc     600
cgtgaagctc tggctcagac ccactctgct atcgctgtta tcatcggtga ccaggttgac     660
gttaaagact gcgctaacca cgaaatcaaa aaagttctgg ttccgggttg ccacggttct     720
gaaccgtgca tcatccaccg tggtaaaccg ttccagctgg aagctgtttt cgaagctaac     780
cagaactcta aaaccgctaa aatcgaaacc aacgcttgct ctatcaacgg taacgctccg     840
gctgaaatcg acctgcgtca gatgcgtacc gttaccccga tccgtatgca gggtggttgc     900
ggttcttgct gggctttctc tggtgttgct gctaccgaat ctgcttacct ggcttaccgt     960
aaccagtctc tggacctggc tgaacaggaa ctggttgact gcgcttctca gcacggttgc    1020

cacggtgaca ccatcccgcg tggtatcgaa tacatccagc accaccacca ccaccactaa    1080
gaattc                                                               1086
```

<210> 7
<211> 357
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción Dp 2/1S

<400> 7

Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile
1 5 10 15

Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val
20 25 30

Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser
35 40 45

Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn
50 55 60

Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu Ile
65 70 75 80

Lys Ala Ser Ile Glu Gly Leu Glu Val Asp Val Pro Gly Ile Asp Pro
85 90 95

Asn Ala Ser His Tyr Met Lys Ser Pro Leu Val Lys Gly Gln Gln Tyr
100 105 110

Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Ile Val Pro Lys Ile Ala Pro Lys Ser Glu
115 120 125

Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly Asp Asn Gly Val Leu Ala
130 135 140

Ser Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg Asp His Asn Gly Val Val
145 150 155 160

Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu Gln Ser Ser Arg Arg
165 170 175

Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr Ser Gln Ile Tyr Pro
180 185 190

Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala
195 200 205

Ile Ala Val Ile Ile Gly Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Ser Ala Asn
210 215 220

His Glu Ile Lys Lys Val Leu Val Pro Gly Ser His Gly Ser Glu Pro
225 230 235 240

Ser Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Val Phe Glu
245 250 255

Ala Asn Gln Asn Ser Lys Thr Ala Lys Ile Glu Thr Asn Ala Ser Ser
260 265 270

Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr
275 280 285

Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Ser Gly Ser Ser Trp Ala Phe
290 295 300

Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln
305 310 315 320

Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Ser Ala Ser Gln His
325 330 335

Gly Ser His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His
340 345 350

His His His His His
355

<210> 8
<211> 1086
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción Dp 2/1S

<400> 8

```
catatgatca aagacctgga cgctttccgt cactacgacg gtcgtaccat catccagcgt      60
gacaacggtt accagccgaa ctaccacgct gttaacatcg ttggttactc taacgctcag     120
ggtgttgact actggatcgt tcgtaactct tgggacacca actggggtga caacggttac     180
ggttacttcg ctgctaacat cgacctgatg atgatcgaag aatacccgta cgttgttatc     240
ctgatcaaag cttctatcga aggtctggaa gttgacgttc cgggtatcga cccgaacgct     300

tctcactaca tgaaatctcc gctggttaaa ggtcagcagt acgacatcaa atacacctgg     360
atcgttccga aaatcgctcc gaaatctgaa aacgttgttg ttaccgttaa agttatgggt     420
gacaacggtg ttctggcttc tgctatcgct acccacgcta aaatccgtga ccacaacggt     480
gttgttcagg aatcttacta ccgttacgtt gctcgtgaac agtcttctcg tcgtccgaac     540
gctcagcgtt tcggtatctc taactactct cagatctacc cgccgaacgt taacaaaatc     600
cgtgaagctc tggctcagac ccactctgct atcgctgtta tcatcggtga ccaggttgac     660
gttaaagact ctgctaacca cgaaatcaaa aaagttctgg ttccgggttc tcacggttct     720
gaaccgtcta tcatccaccg tggtaaaccg ttccagctgg aagctgtttt cgaagctaac     780
cagaactcta aaaccgctaa aatcgaaacc aacgcttctt ctatcaacgg taacgctccg     840
gctgaaatcg acctgcgtca gatgcgtacc gttaccccga tccgtatgca gggtggttct     900
ggttcttctt gggctttctc tggtgttgct gctaccgaat ctgcttacct ggcttaccgt     960
aaccagtctc tggacctggc tgaacaggaa ctggttgact ctgcttctca gcacggttct    1020
cacggtgaca ccatcccgcg tggtatcgaa tacatccagc accaccacca ccaccactaa    1080
gaattc                                                               1086
```

<210> 9
<211> 351
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción Dp 2/1S sin (His)6 C-terminal

<400> 9

Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile
1 5 10 15

Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val
20 25 30

Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser
35 40 45

Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn
50 55 60

Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu Ile
65 70 75 80

Lys Ala Ser Ile Glu Gly Leu Glu Val Asp Val Pro Gly Ile Asp Pro
85 90 95

Asn Ala Ser His Tyr Met Lys Ser Pro Leu Val Lys Gly Gln Gln Tyr
100 105 110

Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Ile Val Pro Lys Ile Ala Pro Lys Ser Glu
115 120 125

Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly Asp Asn Gly Val Leu Ala
130 135 140

Ser Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg Asp His Asn Gly Val Val
145 150 155 160

Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu Gln Ser Ser Arg Arg
165 170 175

Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr Ser Gln Ile Tyr Pro
180 185 190

Pro Asn Val Asn Lys Ile Arg Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala
195 200 205

Ile Ala Val Ile Ile Gly Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Ser Ala Asn
210 215 220

His Glu Ile Lys Lys Val Leu Val Pro Gly Ser His Gly Ser Glu Pro
225 230 235 240

Ser Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Val Phe Glu
245 250 255

Ala Asn Gln Asn Ser Lys Thr Ala Lys Ile Glu Thr Asn Ala Ser Ser
260 265 270

Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr
275 280 285

Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Ser Gly Ser Ser Trp Ala Phe
290 295 300

Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Gln
305 310 315 320

Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Ser Ala Ser Gln His
325 330 335

Gly Ser His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln
340 345 350

<210> 10
<211> 1053
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción Dp 2/1S sin (His)6 C-terminal

<400> 10

```
atcaaagacc tggacgcttt ccgtcactac gacggtcgta ccatcatcca gcgtgacaac      60
ggttaccagc cgaactacca cgctgttaac atcgttggtt actctaacgc tcagggtgtt     120
gactactgga tcgttcgtaa ctcttgggac accaactggg gtgacaacgg ttacggttac     180
ttcgctgcta acatcgacct gatgatgatc gaagaatacc cgtacgttgt tatcctgatc     240
aaagcttcta tcgaaggtct ggaagttgac gttccgggta tcgacccgaa cgcttctcac     300
tacatgaaat ctccgctggt taaaggtcag cagtacgaca tcaaatacac ctggatcgtt     360
ccgaaaatcg ctccgaaatc tgaaaacgtt gttgttaccg ttaaagttat gggtgacaac     420
ggtgttctgg cttctgctat cgctacccac gctaaaatcc gtgaccacaa cggtgttgtt     480
caggaatctt actaccgtta cgttgctcgt gaacagtctt ctcgtcgtcc gaacgctcag     540
cgtttcggta tctctaacta ctctcagatc tacccgccga acgttaacaa aatccgtgaa     600
gctctggctc agacccactc tgctatcgct gttatcatcg gtgaccaggt tgacgttaaa     660
gactctgcta accacgaaat caaaaaagtt ctggttccgg gttctcacgg ttctgaaccg     720
tctatcatcc accgtggtaa accgttccag ctggaagctg ttttcgaagc taaccagaac     780
tctaaaaccg ctaaaatcga aaccaacgct tcttctatca acggtaacgc tccggctgaa     840
atcgacctgc gtcagatgcg taccgttacc ccgatccgta tgcagggtgg ttctggttct     900
tcttgggctt tctctggtgt tgctgctacc gaatctgctt acctggctta ccgtaaccag     960
tctctggacc tggctgaaca ggaactggtt gactctgctt ctcagcacgg ttctcacggt    1020
gacaccatcc cgcgtggtat cgaatacatc cag                                 1053
```

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marca (His)6

<400> 11

```
His His His His His His
1               5
```

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº 9.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:

(I) Met-X-marca,
(II) Met-X,
(III) X-marca,
(IV) Met-marca-X,
(V) marca-X,
(VI) marca-X-marca,
(VII) X,
y
(VIII) Met-marca-X-marca,

en el que X es la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº 9, Met es metionina, y marca es secuencia de marca peptídica.

3. El polipéptido de la reivindicación 2, que consiste en la estructura X-marca.

4. El polipéptido de las reivindicaciones 2 o 3, en el que la marca consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº 11.

5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº 7.

6. El polipéptido de la reivindicación 5, que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº 7.

7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que tiene menor actividad alergénica que Der p 2 de tipo silvestre.

8. El polipéptido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno alérgico.

9. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el trastorno alérgico es alergia a ácaros del polvo doméstico.

10. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

11. El polinucleótido de la reivindicación 10, que tiene la secuencia de ácido nucleico mostrada en las SEC ID Nº 8 o 10.

12. Un vector o un plásmido que comprenden el polinucleótido de las reivindicaciones 10 u 11.

13. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el polinucleótido de las reivindicaciones 10 u 11, o el vector o el plásmido de la reivindicación 12; y un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

14. Una vacuna que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el polinucleótido de las reivindicaciones 10 u 11, o el vector o el plásmido de la reivindicación 12; y opcionalmente un adyuvante.

15. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido de las reivindicacione 10 u 11, o el vector o el plásmido de la reivindicación 12.

Figura 1A

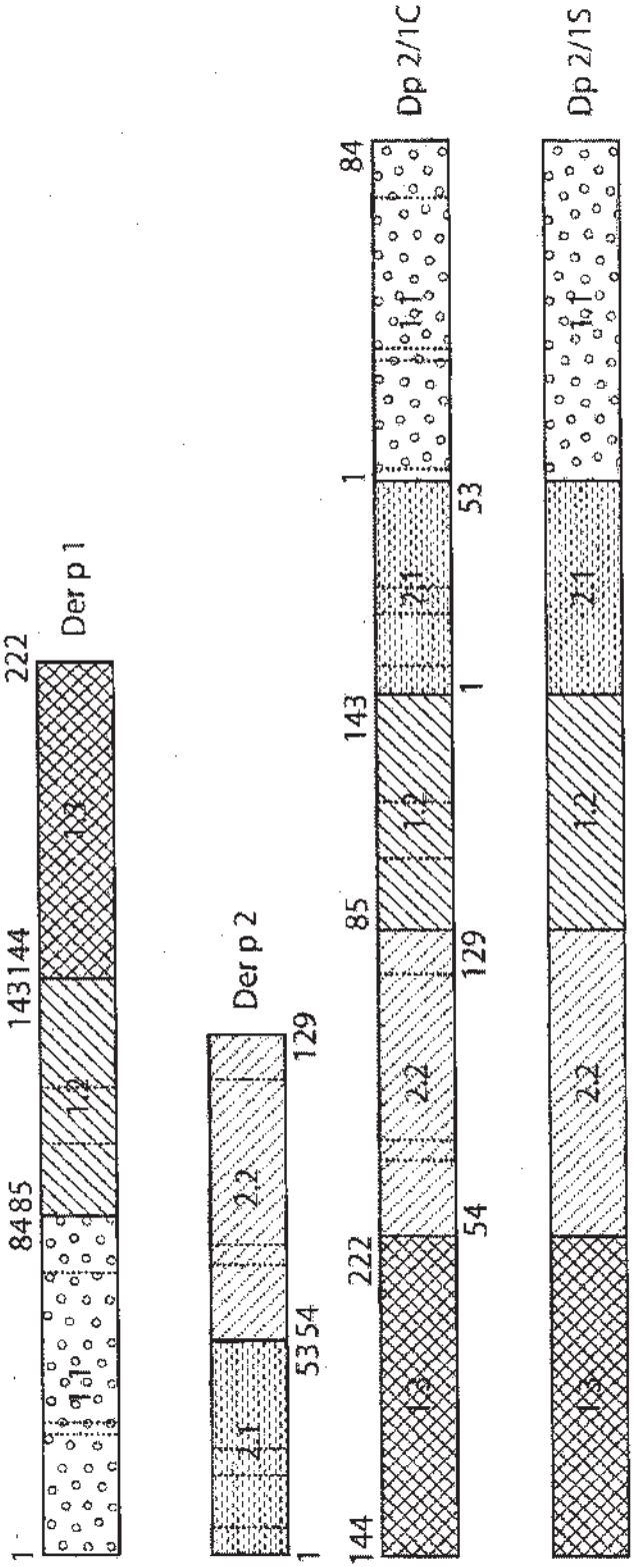

Figura 1A

Figura 1B

Construcción con restos de cisteína (Der p 2/1C)

```
CATATGATCAAAGACCTGGACGCTTTCCGTCACTACCACCGTCGTACCATCATCCAGCGTGACAACGGTTACCAGCCGAACTACCACGCTGTTAACATCGTTGGTTACTCTAACGCT
 NdeI  I  K  D  L  D  A  F  R  H  Y  D  G  R  T  I  I  Q  R  D  N  G  Y  Q  P  N  Y  H  A  V  N  I  V  G  Y  S  N  A

CAGGGTGTTGACTACTGGATCGTTCGTAACTCTTGGGACACCAACCGGCGTGACAACGGTTACGGTTACTTCGCTGCTAACATCGACCTGATGATGATCGAAGAATACCCGTACGTT
 Q  G  V  D  Y  W  I  V  R  N  S  W  D  T  N  W  G  D  N  G  Y  G  Y  F  A  A  N  I  D  L  M  M  I  E  E  Y  P  Y  V

GTTATCCTGATCAAAGCTTCTATCGAAGGTCTGGAAGTTGACGTTCCGGGTATCGACCCGAACGCTTGCCACTACATGAAATGCCCGCTGGTTAAAGGTCAGCAGTACGACATCAAA
 V  I  L  I  K  A  S  I  E  G  L  E  V  D  V  P  G  I  D  P  N  A  C  H  Y  M  K  C  P  L  V  K  G  Q  Q  Y  D  I  K

TACACCTGGATCGTTCCGAAAATCGCTCCGAAATCTGAAAACGTTGTTGTTACCGTTAAAGTTATGGGTGACAACGGTGTTCTGGCTTGCGCTATCGCTACCCACGCTAAAATCCGT
 Y  T  W  I  V  P  K  I  A  P  K  S  E  N  V  V  V  T  V  K  V  M  G  D  N  G  V  L  A  C  A  I  A  T  H  A  K  I  R

GACCACAACGGTGTTGTTCAGGAATCTTACTACCGTTACGTTGCTCGTGAACAGTCTTGCCGTCGTCCGAACGCTCAGCGTTTCGGTATCTCTAACTACTGCCAGATCTACCCGCCG
 D  H  N  G  V  V  Q  E  S  Y  Y  R  Y  V  A  R  E  Q  S  C  R  R  P  N  A  Q  R  F  G  I  S  N  Y  C  Q  I  Y  P  P

AACGTTAACAAAATCCGTGAAGCTCTGGCTCAGACCCACTCTGCTATCGCTGTTATCATCGGTGACCAGGTTGACGTTAAAGACTGCGCTAACCACGAAATCAAAAAAGTTCTGGTT
 N  V  N  K  I  R  E  A  L  A  Q  T  H  S  A  I  A  V  I  I  G  D  Q  V  D  V  K  D  C  A  N  H  E  I  K  K  V  L  V

CCGGGTTGCCACGGTTCTGAACCGTGCATCATCCACCGTGGTAAACCGTTCCAGCTGGAAGCTGTTTTCGAAGCTAACCAGAACTCTAAAACCGCTAAAATCGAAACCAACGCTTGC
 P  G  C  H  G  S  E  P  C  I  I  H  R  G  K  P  F  Q  L  E  A  V  F  E  A  N  Q  N  S  K  T  A  K  I  E  T  N  A  C

TCTATCAACGGTAACGCTCCGGCTGAAATCGACCTGCGTCAGATGCGTACCGTTACCCCGATCCGTATGCAGGGTGGTTGCGGTTCTTGCTGGGCTTTCTCTGGTGTTGCTGCTACC
 S  I  N  G  N  A  P  A  E  I  D  L  R  Q  M  R  T  V  T  P  I  R  M  Q  G  G  C  G  S  C  W  A  F  S  G  V  A  A  T

GAATCTGCTTACCTGGCTTACCGTAACCAGTCTCTGGACCTGGCTGAACAGGAACTGGTTGACTGCGCTTCTCAGCACGGTTGCCACGGTGACACCATCCCGCGTGGTATCGAATAC
 E  S  A  Y  L  A  Y  R  N  Q  S  L  D  L  A  E  Q  E  L  V  D  C  A  S  Q  H  G  C  H  G  D  T  I  P  R  G  I  E  Y

ATCCAGCACCACCACCACCACCACTAA GAATTC
 I  Q  H  H  H  H  H  H Parada EcoRI
```

Figura 1C

Construcción con restos de serina (Der p 2/19)

CATATGATCAAAGACCTGGACGCTTTCCGTCACTACGACGGTCGTACCATCATCCAGCGTGACAACGGTTACCAGCCGAACTACCACGCTGTTAACATCGTTGGTTACTCTAACGCT
NdeI I K D L D A F R H Y D G R T I I Q R D N G Y Q P N Y H A V N I V G Y S N A

CAGGGTGTTGACTACTGGATCGTTCGTAACTCTTGGGACACCAACTGGGGTGACAACGGTTACGGTTACTTCGCTGCTAACATCGACCTGATGATGATCGAAGAATACCCGTACGTT
Q G V D Y W I V R N S W D T N W G D N G Y G Y F A A N I D L M M I E E Y P Y V

GTTATCCTGATCAAAGCTTCTATCGAAGGTCTGGAAGTTGACGTTCCGGGTATCGACCCGAACGCTTCTCACTACATGAAATCTCCGCTGGTTAAAGGTCAGCAGTACGACATCAAA
V I L I K A S I E G L E V D V P G I D P N A S H Y M K S P L V K G Q Q Y D I K

TACACCTGGATCGTTCCGAAAATCGCTCCGAAATCTGAAAACGTTGTTGTTACCGTTAAAGTTATGGGTGACAACGGTGTTCTGGCTTCTGCTATCGCTACCCACGCTAAAATCCGT
Y T W I V P K I A P K S E N V V V T V K V M G D N G V L A S A I A T H A K I R

GACCACAACGGTCTTGTTCAGGAATCTTACTACCGTTACGTTGCTCGTGAACAGTCTTCTCGTCGTCCGAACGCTCAGCGTTTCGGTATCTCTAACTACTCTCAGATCTACCCGCCG
D H N G V V Q E S Y Y R Y V A R E Q S S R R P N A Q R F G I S N Y S Q I Y P P

AACGTTAACAAAATCCGTGAAGCTCTGGCTCAGACCCACTCTGCTATCGCTGTTATCATCGGTGACCAGGTTGACGTTAAAGACTCTGCTAACCACGAAATCAAAAAAGTTCTGGTT
N V N K I R E A L A Q T H S A I A V I I G D Q V D V K D S A N H E I K K V L V

CCGGGTTCTCACGGTTCTGAACCGTCTATCATCCACCGTGGTAAACCGTTCCAGCTGGAAGCTGTTTTCGAAGCTAACCAGAACTCTAAAACCGCTAAAATCGAAACCAACGCTTCT
P G S H G S E P S I I H R G K P F Q L E A V F E A N Q N S K T A K I E T N A S

TCTATCAACGGTAACGCTCCGGCTGAAATCGACCTGCGTCAGATGCGTACCGTTACCCCGATCCGTATGCAGGGTGGTTCTGGTTCTTCTTGGGCTTTCTCTGGTGTTGCTGCTACC
S I N G N A P A E I D L R Q M R T V T P I R M Q G G S G S S W A F S G V A A T

GAATCTGCTTACCTGGCTTACCGTAACCAGTCTCTGGACCTGGCTGAACAGGAACTGGTTGACTCTGCTTCTCAGCACGGTTCTCACGGTGACACCATCCCGCGTGGTATCGAATAC
E S A Y L A Y R N Q S L D L A E Q E L V D S A S Q H G S H G D T I P R G I E Y

ATCCAGCACCACCACCACCACCACTAA GAATTC
I Q H H H H H H Parada *EcoRI*

Figura 2

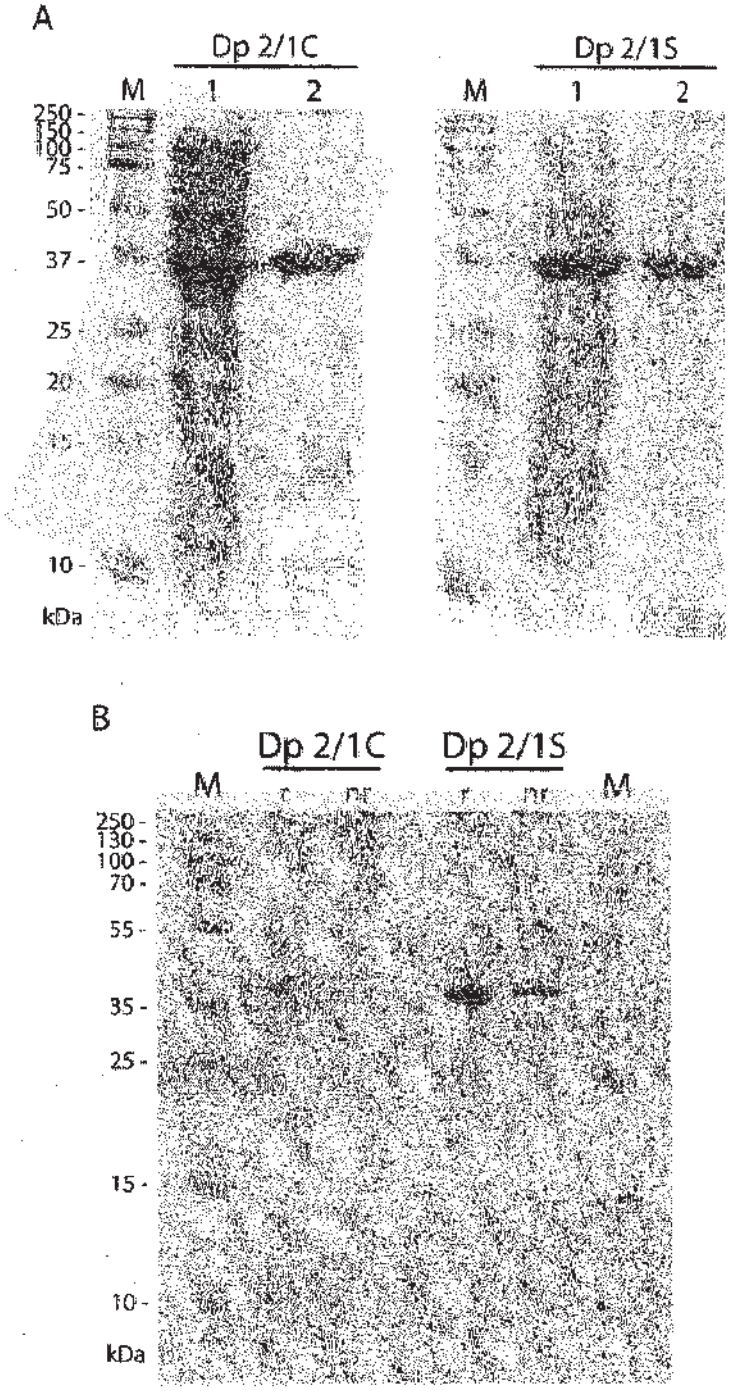
A
Dp 2/1C
Dp 2/1S
M
1
2
M
1
2
250 -
150 -
100 -
75 -
50 -
37 -
25 -
20 -
15 -
10 -
kDa
B
Dp 2/1C
Dp 2/1S
M
r
nr
r
nr
M
250 -
130 -
100 -
70 -
55 -
35 -
25 -
15 -
10 -
kDa

Figura 3

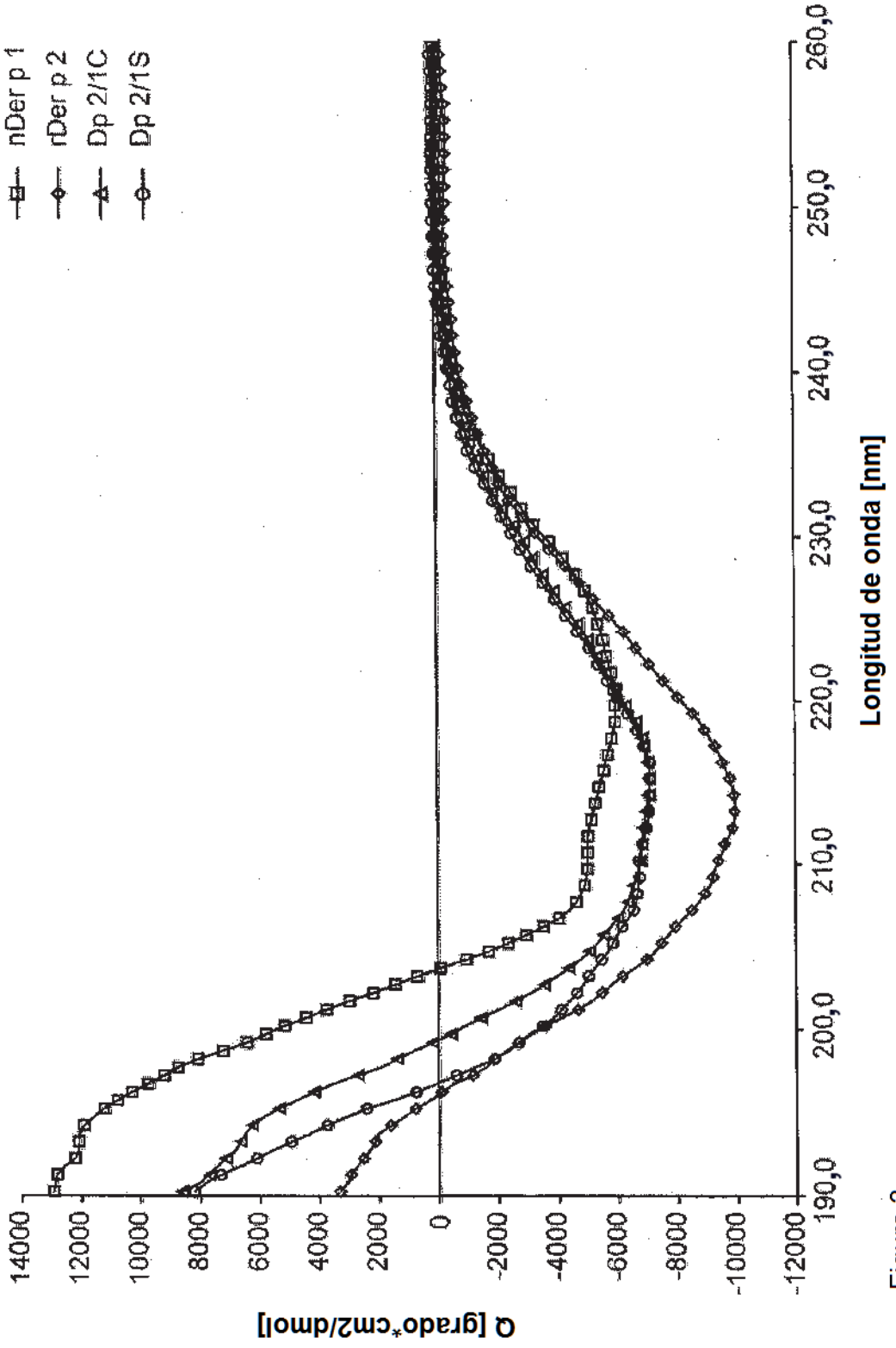

Figura 3

Figura 4

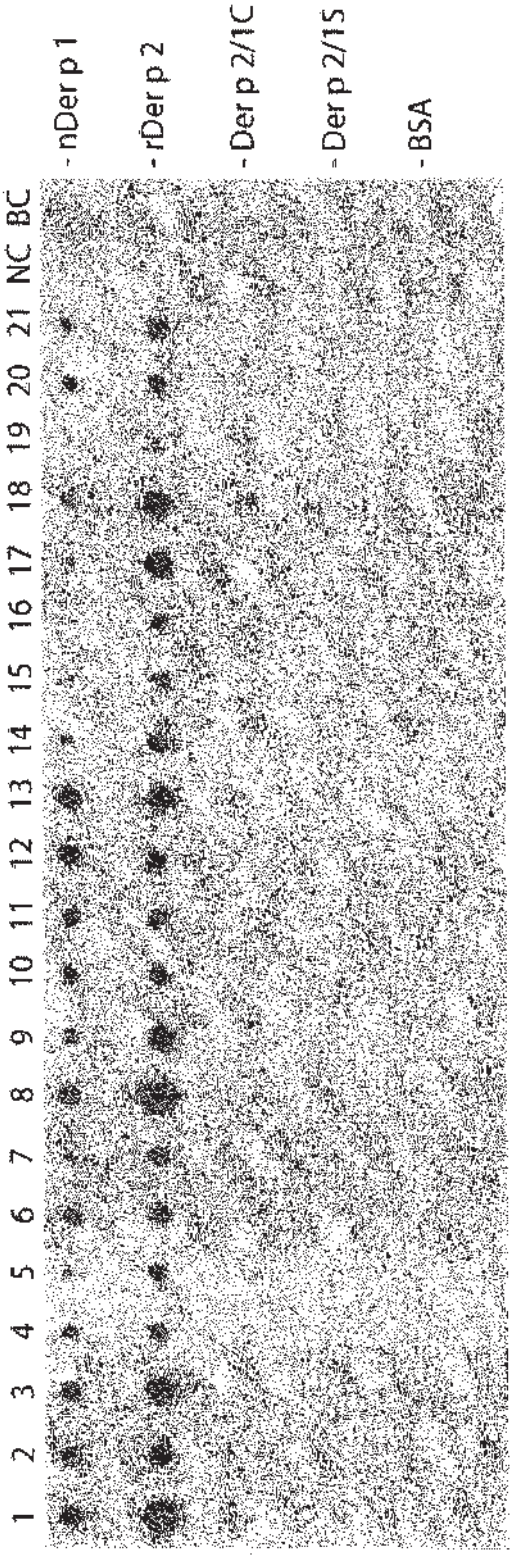

Figura 4

Figura 5

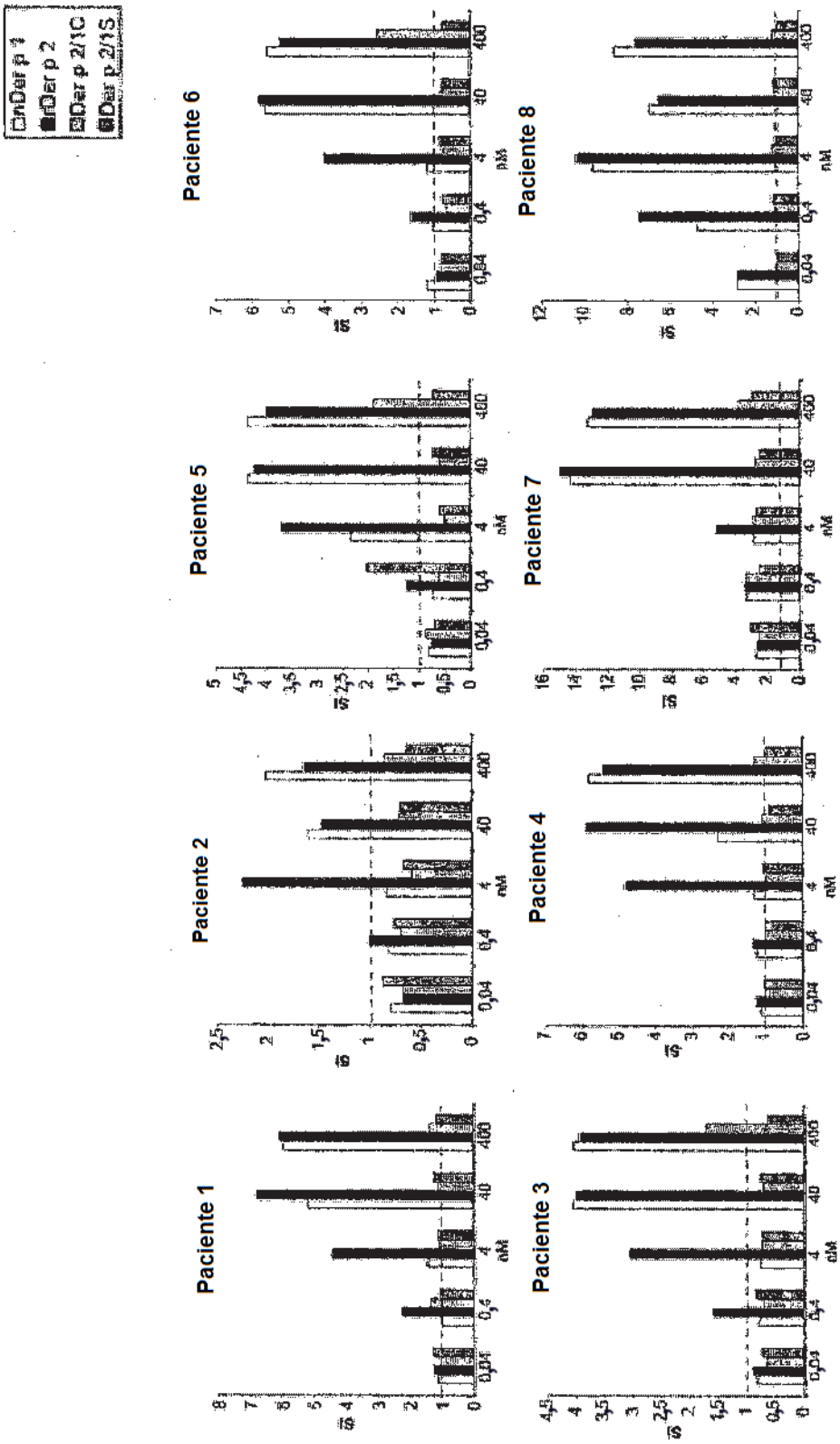
Dar p 1
Dar p 2
Dar p 2/1C
Dar p 2/1S
Paciente 1
Paciente 2
Paciente 3
Paciente 4
Paciente 5
Paciente 6
Paciente 7
Paciente 8
nM

Figura 6

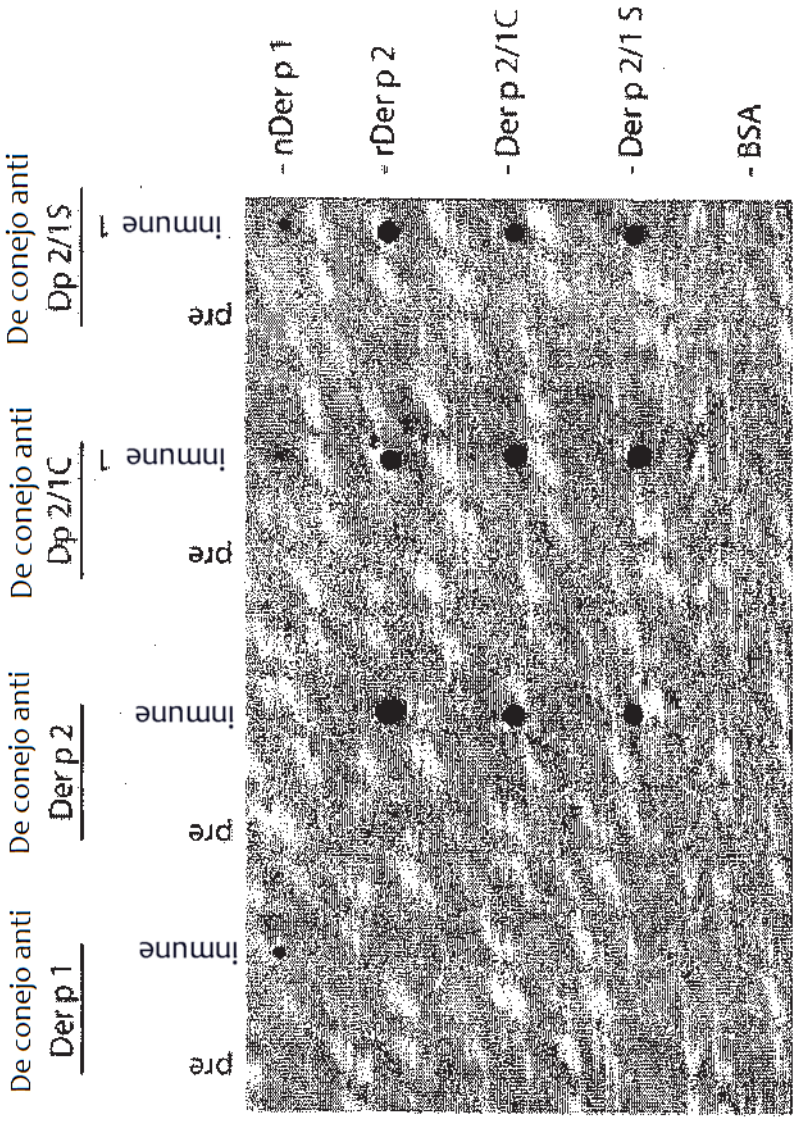

Figura 6