

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 360**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2007** **E 07291219 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016** **EP 1908777**

54 Título: **Proteínas de fusión de ácaros**

30 Prioridad:

06.10.2006 EP 06291561

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

10.05.2016

73 Titular/es:

STALLERGENES SA (100.0%)
6, RUE ALEXIS DE TOCQUEVILLE
92183 ANTONY CEDEX, FR

72 Inventor/es:

MOINGEON, PHILIPPE;
BULDER, INGRID;
BORDAS, VÉRONIQUE y
BUSSIERES, LAETITIA

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 569 360 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

Proteínas de fusión de ácaros

5 **[0001]** La presente invención se refiere a una proteína de fusión, un ácido nucleico aislado que codifica a la misma y su uso para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una reacción alérgica a ácaros.

10 **[0002]** La contribución de los ácaros a la alergia en humanos se documentó por primera vez en la década de 1920 cuando Cooke y Kern encontraron que el polvo de las bolsas de aspiradora provocaba reacciones cutáneas positivas en pacientes con asma. Más tarde, Voorhorst y colaboradores fueron los primeros en implicar a los ácaros hallados en el polvo en el desarrollo de la alergia al polvo. Estos investigadores llevaron a cabo un estudio de los continentes de Europa y América y descubrieron que todos tenían ácaros astigmátidos de género *Dermatophagoides*. La concentración de ácaros que se encuentran en muestreos de alfombras y ropa de cama variaba de 1 a 500 ácaros por gramo de polvo. Los extractos de ácaros produjeron reacciones cutáneas positivas
15 similares a las observadas por Cooke y Kern 43 años antes. Este hallazgo condujo a la conclusión de que *Dermatophagoides* era una de las principales fuentes de alérgenos del polvo doméstico. Estudios posteriores confirmaron que *Dermatophagoides pteronyssinus* era la especie de ácaro más abundante en todo el mundo.

20 **[0003]** Las alergias a ácaros del polvo se caracterizan a menudo por una fiebre del heno o rinitis alérgica "perenne" o de "todo el año": estornudos frecuentes, secreción nasal, congestión nasal, picazón en la nariz y ojos irritados. El asma y el eccema también pueden ser provocados por una alergia a los ácaros del polvo.

25 **[0004]** Los alérgenos producidos por los ácaros del género *Dermatophagoides* se encuentran principalmente en dos grupos inmunológicamente importantes: grupo I (*Der p 1*, *Der f 1*) y II (*Der p 2*, *Der f 2*). *Der p 1* y *Der p 2* son los principales alérgenos de ácaros del polvo doméstico (HDM) europeo de *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Der f 1* y *Der f 2* son los principales alérgenos de *Dermatophagoides farinae*. Los alérgenos del grupo I son glicoproteínas de aproximadamente 25.000 Da que se encuentran principalmente en las heces del ácaro. El alérgeno *Der p 1* se encuentra a 10 mg/ml (0,2 ng por gránulo fecal) en las heces de los ácaros y eluye rápidamente de los gránulos fecales. *Der p 1* es una cisteína proteasa secretada por los ácaros durante la digestión y se libera en gránulos fecales que tiene de 10 µm a 40 µm de tamaño. Los alérgenos del grupo I son estructuralmente homólogos (entre los ácaros del polvo doméstico, muy especialmente las especies *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*). Los alérgenos del grupo II, que se encuentran en los cuerpos de los ácaros, tienen proteínas de aproximadamente 15.000 Da, y al igual que los alérgenos del grupo I, comparten homologías estructurales. La reactividad cruzada entre alérgenos específicos de cada especie se observa dentro de cada grupo, pero no está documentado a través de los grupos.
35

[0005] Chapman MD et al. (J Immunol 1980 Aug; 125 (2): 587-92) han descrito la purificación de la proteína *Der p 1* de *D. pteronyssinus* en 1980.

40 **[0006]** Los antígenos de ácaros del grupo I y II son los más relevantes clínicamente para el asma, la dermatitis atópica y la rinitis alérgica, ya que más del 80% de pacientes alérgicos a HDM (ácaros del polvo doméstico) presentan títulos elevados de IgE séricos dirigidos a estos dos alérgenos. Actualmente, se han identificado al menos veintiún grupos de alérgenos diferentes para el ácaro del polvo europeo.

45 **[0007]** Las opciones terapéuticas pueden agruparse en tres categorías principales. La primera oportunidad es evitar el alérgeno o la reducción de la exposición. Puede ser difícil o caro para alérgenos de los ácaros del polvo doméstico. La segunda opción terapéutica y más ampliamente usada es la prescripción de fármacos sintomáticos clásicos como antihistamínicos y esteroides. Los fármacos sintomáticos son seguros y eficientes; sin embargo, no alteran la causa natural de la enfermedad. La tercera alternativa terapéutica es la vacunación contra la alergia específica que, en la mayoría de los casos, reduce o alivia los síntomas alérgicos causados por el alérgeno en cuestión. La vacunación contra la alergia específica convencional es un tratamiento causal para la enfermedad alérgica. Interfiere con los mecanismos inmunológicos básicos dando como resultado la mejora persistente del estado inmunitario de los pacientes. De este modo, el efecto protector de la vacunación contra la alergia específica se extiende más allá del período de tratamiento a diferencia del tratamiento con fármacos sintomáticos. Algunos
50 pacientes que reciben el tratamiento se curan, y, además, la mayoría de los pacientes experimentan un alivio de la gravedad de la enfermedad y los síntomas experimentados, o al menos una detención en el agravamiento de la enfermedad. Por lo tanto, la vacunación contra la alergia específica tiene efectos preventivos que reducen el riesgo de desarrollar la rinitis hacia asma, y reducen el riesgo de desarrollar nuevas sensibilidades.

60 **[0008]** El mecanismo inmunológico subyacente de la exitosa vacunación contra la alergia no se conoce en detalle. Se acepta en general que una vacuna activa debe tener la capacidad de estimular células T específicas de alérgeno, preferiblemente células Th1 y T reguladoras. La vacunación contra una alergia específica, a pesar de sus virtudes, no es de uso generalizado, principalmente por dos razones. Una de las razones es los inconvenientes asociados con el programa de vacunación tradicional que comprende vacunaciones repetidas, es decir, inyecciones durante varios meses. La otra razón es, más importante, el riesgo de reacciones secundarias alérgicas. Las vacunaciones ordinarias contra agentes infecciosos se llevan a cabo de manera eficiente utilizando una sola o unas pocas
65

inmunizaciones de dosis altas. Esta estrategia, sin embargo, no se puede utilizar para la vacunación contra la alergia, ya que una respuesta inmune patológica ya está en acción. Por lo tanto, se lleva a cabo una vacunación contra la alergia específica convencional utilizando inmunizaciones múltiples por vía subcutánea o mucosa (por ejemplo, sublingual) aplicadas durante un período de tiempo prolongado.

[0009] Los alérgenos recombinantes son una alternativa a los extractos biológicos complejos utilizados en la vacunación contra una alergia específica con un mejor rendimiento. Sus propiedades biológicas como la inmunogenicidad y la inocuidad dependen del sistema de expresión elegido.

[0010] WO 88/10297 da a conocer las secuencias de ADNc y de aminoácidos de Der p 1 excretada madura, las formas pre- y preproenzimas transitorias de Der p 1 y Der p 2. La secuencia de nucleótidos del inserto de ADNc de un clon de fago reaccionado con suero anti-Der p 1 de conejo da como resultado la expresión de una proteína de fusión que comprende Der p 1 y un β -galactosidasa. Se ha demostrado que esta quimera recombinante inhibe las respuestas de IgE de ratones a Der p 1 madura.

[0011] La Der p 1 recombinante se ha expresado en *Pichia pastoris* (Jacquet et al Clin Exp Alergia 2002 Jul; 32 (7): 1048-1053) como una proteína hiperglicosilada con actividad de unión y enzimática de IgE, pero con una capacidad de realización de histamina reducida en comparación con el alérgeno natural.

[0012] La expresión de Der p 2 en la levadura de panadero produce una proteína recombinante con propiedades similares a la proteína natural (Hakkaart GA, Harmsen MM, Chua KY, Thomas WR, Aalberse RC, Van Ree R. Clin Exp Alergia 1998 Enero; 28 (1): 45-52).

[0013] Se ha producido Der f 1 recombinante en células de insecto usando un sistema de expresión de baculovirus (Shoji H. et al, Biosci Biotechnol Biochem 1996 Apr; 60 (4): 621-5; Shoji H. et al., Biosci Biotechnol Biochem 1997 Oct; 61 (10): 1668-1673) y en *Aspergillus oryzae* (Shoji H. et al, Biosci Biotechnol Biochem 1999 Apr; 63 (4): 703-9).

[0014] Se ha expresado Der f 2 en *E. coli* (Iwamoto M. et al, Int Arco Allergy Immunol 1996 Apr; 109 (4): 356-61).

[0015] Best et al. (2000. Prot Exp Purif, 20(3), 462-471) describen la producción de la fusión de Der f 1 con una etiqueta estándar, en particular una pre-pro-secuencia del factor α de *S. Cerevisiae*, para asegurar la secreción de la proteína recombinante. La proteína recombinante es reconocida por anticuerpos IgE de pacientes alérgicos.

[0016] El solicitante ha clonado proDer p 1 en plantas de tabaco (W02004/005334) y por lo tanto ha expresado cuatro polipéptidos reconocidos por un anticuerpo específico anti-Der p 1. Tres de ellos son especies intermedias de la síntesis de la proteína Der p 1 madura y el cuarto tiene cinco aminoácidos más que la proteína Der p 1 madura. También se muestra que el propéptido en proDer p 1 es esencial para la expresión de una Der p 1 recombinante en una célula eucariota (WO 2004/005334). La expresión en varios sistemas procariotas y eucariotas (*E. coli*, levadura, células CHO, *Drosophila*) ha establecido que el propéptido es necesario para la expresión de una molécula bien plegada: más específicamente, la expresión de Der p 1 madura (es decir, sin el propéptido) da lugar a niveles bajos de expresión de una molécula de Der p 1 que se pliega incorrectamente.

[0017] Para reemplazar extractos biológicos, existe la necesidad de un producto de vacuna que combina varios alérgenos de ácaros del polvo doméstico recombinantes, con una alta pureza, preferiblemente con conformación natural, con una antigenicidad e inmunogenicidad conservadas (con respecto al reconocimiento de IgE, IgG, y linfocitos T) en comparación con los alérgenos naturales, y que se puede producir en sistemas procariotas y/o eucariotas.

[0018] Esto se consigue mediante una proteína de fusión que comprende un alérgeno del grupo I y un alérgeno del grupo II de género *Dermatophagoides*, teniendo los alérgenos en la proteína de fusión una conformación cercana a la de los alérgenos maduros naturales.

[0019] Los presentes inventores han expresado cuatro proteínas de fusión ensamblando los dos principales alérgenos Der p 1 y Der p 2 del ácaro del polvo doméstico común *Dermatophagoides pteronyssinus*. Der p 2 se ha fusionado en el extremo N- o C-terminal de Der p 1 o proDer p 1 maduras. Estas cuatro proteínas de fusión se han expresado con éxito en *Escherichia coli*. Las dos formas con el propéptido Der p 1 también se han expresado en la levadura *Pichia pastoris*. Estas 6 proteínas de fusión se reconocen en el análisis de inmunotransferencia por anticuerpos monoclonales anti-Der p 2 y por IgE de pacientes alérgicos a los ácaros del polvo doméstico. Los inventores también observaron cierta reactividad con un anticuerpo monoclonal de ratón y anticuerpos policlonales de oveja específicos para Der p 1 nativa. Los datos de inmunorreactividad confirman que Der p 1 y Der p 2 se pliegan correctamente en estas proteínas de fusión, ya que algunos epítomos conformacionales pueden ser reconocidos por varios anticuerpos dirigidos a los distintos componentes de las proteínas de fusión.

[0020] Por lo tanto, estos resultados apoyan que una proteína de fusión se puede preparar con éxito mediante la fusión directa de al menos dos alérgenos, conservando el plegamiento y la inmunogenicidad de los antígenos nativos.

Proteína de fusión

[0021] De este modo, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende un alérgeno del grupo I y un alérgeno del grupo II del género *Dermatophagoides*, en el que dicho alérgeno del grupo I del género *Dermatophagoides* se selecciona del grupo que consiste en Der p 1, Der f 1, una proforma de Der p 1, una proforma de Der f 1, y una secuencia con una identidad de al menos el 90% con respecto a la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7, que sustancialmente retiene la inmunogenicidad del polipéptido de la secuencia SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7, respectivamente;

y en el que dicho alérgeno del grupo II del género *Dermatophagoides* se selecciona del grupo que consiste en Der p 2, Der f 2, una proforma de Der p 2, una proforma de Der f 2, y una secuencia con una identidad de al menos el 90% con respecto a la SEQ ID NO: 4, que sustancialmente retiene la inmunogenicidad del polipéptido de la secuencia SEQ ID NO: 4.

[0022] Tal como se usa en el presente documento, una "proteína" o "péptido" indica una molécula comprendida de un grupo lineal de residuos de aminoácidos conectados entre sí en el grupo lineal por enlaces peptídicos.

[0023] Una "proteína de fusión" se refiere a una proteína que tiene al menos un alérgeno de grupo I y un alérgeno de Grupo II del género *Dermatophagoides* unida covalentemente, ya sea directamente o mediante un péptido enlazador. Los polipéptidos que forman la proteína de fusión están unidas típicamente de C-terminal a N-terminal, aunque también pueden estar unidas de C-terminal a C-terminal, N-terminal a N-terminal o N-terminal a C-terminal. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden. Alternativamente, la proteína de fusión se podría obtener por acoplamiento químico.

[0024] Una secuencia de péptido enlazador puede emplearse para separar los dos componentes polipeptídicos por una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliega en sus estructuras secundaria y terciaria. Esta secuencia enlazadora puede ser generalmente de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Las secuencias enlazadoras no son necesarias cuando el segundo polipéptido tiene una región N-terminal dispensable que se puede utilizar para separar los dominios funcionales y evitar el impedimento estérico.

[0025] Sin embargo, en el marco de la presente invención, el alérgeno del Grupo I y el Grupo II alérgeno de la proteína de fusión están preferiblemente directamente unidos a efectos de evitar cualquier riesgo de reacción inmunológica al propio enlazador.

[0026] Por consiguiente, el alérgeno del Grupo II se fusiona preferiblemente directamente en el extremo N- o C-terminal del alérgeno del Grupo I. Según una realización de la presente invención, la proteína de fusión consiste en una fusión N- o C-terminal de un alérgeno del grupo I y un alérgeno del grupo II del género *Dermatophagoides*.

[0027] Un "alérgeno" se define como una sustancia, normalmente un péptido o proteína, que provoca la producción de anticuerpos IgE en individuos predispuestos. Definiciones similares se presentan en las siguientes referencias: Clin. Exp. Allergy, No. 26, pp 494-516 (1996); Mol. Biol. of Allergy and Immunology, ed. R. Bush, Immunology and Allergy clinics of North American Series (Agosto de 1996).

[0028] Un "alérgeno del Grupo I del género *Dermatophagoides*" es un péptido o proteína que conserva sustancialmente la inmunogenicidad de un alérgeno del grupo I natural del género *Dermatophagoides*. Preferiblemente, el alérgeno del Grupo I es Der p 1 o Der f 1, o una proforma de los mismos.

[0029] Un "alérgeno del Grupo II del género *Dermatophagoides*" es una proteína que conserva sustancialmente la inmunogenicidad de un alérgeno del Grupo II natural de género *Dermatophagoides*. Preferiblemente, el alérgeno del Grupo II es Der p 2 o Der f 2, o una proforma de los mismos.

[0030] Una "proforma" significa un precursor de la proteína madura, obteniéndose la proteína madura generalmente mediante procesamiento enzimático de la proforma. Una proforma incluye preproteínas (con un péptido líder), proproteínas (con un propéptido) y preproproteínas, por ejemplo proDer p 1 y p preproDer 1.

[0031] "Conservar sustancialmente la inmunogenicidad de un alérgeno natural" significa conservar total o parcialmente la capacidad de inducir y reaccionar con anticuerpos IgE e IgG dirigidos a dicho alérgeno natural. Incluye, en particular, alérgenos con una reactividad de IgE reducida (formas hipoalérgenas).

[0032] Por consiguiente, un "alérgeno del Grupo I (o II) del género *Dermatophagoides*" incluye péptidos o proteínas que comprenden o consisten en la secuencia de un alérgeno del Grupo I (o II) natural, variantes, mutantes, fragmentos, especialmente los que codifican epítopos B y/ o T seleccionados, así como homólogos de los mismos con un porcentaje de identidad por encima del 80%, preferiblemente 90%, más preferiblemente 95%, siempre que conserven sustancialmente la inmunogenicidad de un alérgeno del grupo I (o II) natural del género *Dermatophagoides*.

[0033] En una realización según la invención, el alérgeno del Grupo II es Der p 2 (SEQ ID NO: 4) y el alérgeno del Grupo I es Der p 1 (SEQ ID NO: 5) o proDer p 1 (SEQ ID NO: 7). Preferiblemente, la proteína de fusión según la invención comprende o consiste en la SEQ ID NO: 8 (fusión Der p 2-Der p 1), SEQ ID NO: 9 (fusión Der p 2-ProDer p 1), SEQ ID NO: 10 (fusión Der p 1-Der p 2), SEQ ID NO: 11 (fusión ProDer p 1-Der p 2). Estas cuatro proteínas de fusión se hacen referencia aquí como F1, F2, F3 y F4, respectivamente.

[0034] En otra realización, el alérgeno del Grupo II consiste en Der f 2 y el alérgeno del Grupo I es Der f 1 o proDer f 1.

[0035] Tal como se usa en el presente documento, una secuencia variante es una secuencia de origen natural pero que diverge de la secuencia de referencia por algunas mutaciones puntuales.

[0036] Como se usa en este documento, una secuencia mutante es una secuencia de un alérgeno natural en el que se han introducido una o varias mutaciones, por ejemplo para abrogar sitios de N-glicosilación, aumentar o disminuir la actividad de la cisteína proteasa de dicho alérgeno, mejorar la expresión de la proteína en un sistema de expresión apropiado, por ejemplo en *E. coli*, en particular teniendo en cuenta la preferencia de codones, o mejorar los epítomos de células T que se anclan a sitios a fin de mejorar la asociación con MHC de clase I o clase II. Las mutaciones puntuales preferidas del alérgeno Der p 1 son mutaciones de los sitios de N-glicosilación (N34Q y/o N150Q en SEQ ID NO: 6) o del sitio catalítico (C132V en la SEQ ID NO: 6).

[0037] Una proteína de fusión según la invención puede comprender además al menos un alérgeno adicional del género *Dermatophagoides*. Por ejemplo, puede comprender un alérgeno del grupo V y/o grupo VII y/o Grupo XIII del género *Dermatophagoides*, preferiblemente Der p 5, Der p 7, Der p 13 de *Dermatophagoides pteronyssinus* o Der f 5, Der f 7, Der f 13 de *Dermatophagoides farinae*.

[0038] Una proteína de fusión según la invención también puede comprender una molécula que reconoce o activa células inmunes. Ejemplos de tales moléculas incluyen fragmentos Fc de inmunoglobulina, la subunidad B de la toxina del cólera o ligandos de integrina (por ejemplo, integrinas Mascarell et al, Vaccine 2006 24 de abril; 24 (17): 3490-9); Sun et al., Scand J Immunol. 2006 Sep; 64 (3): 251-9).

[0039] En otras realizaciones, la proteína de fusión podría contener, en posición aminoterminal o carboxiterninal, una etiqueta (por ejemplo una etiqueta de histidina), u otro resto que puede aumentar la expresión, la solubilidad, la estabilidad de la molécula, afectan a la secreción, la maduración, modificaciones posteriores a la traducción, o facilitan el direccionamiento a los diferentes compartimentos subcelulares (retículo endoplasmático, aparato de golgi, endosomas, periplasma ...). Este fragmento adicional se puede fusionar de manera que pueda escindirse.

Ácidos nucleicos y procedimientos de expresión

[0040] Los ácidos nucleicos aislados, también denominados polinucleótidos, tales como moléculas de ADN o ARN, que codifican las proteínas de fusión definida anteriormente son también parte de la invención, teniendo en cuenta la degeneración del código genético. Se pueden obtener mediante técnicas estándar bien conocidas por el experto en la técnica, tales como la amplificación o polimerización in vitro de ADN, la síntesis de genes in vitro, la ligadura a oligonucleótidos, o mediante una combinación de estas técnicas.

[0041] Por consiguiente, la presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para una proteína de fusión según la invención.

[0042] Las proteínas o ácidos nucleicos de la invención están ventajosamente en forma aislada o purificada.

[0043] Por "purificado" y "aislado" se quiere decir, cuando se hace referencia a una proteína o una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. Los términos "purificado" y "aislado" como se usan en el presente documento significan preferiblemente al menos 75% en peso, más preferiblemente al menos 85% en peso, aún más preferiblemente al menos 95% en peso, y lo más preferiblemente al menos 98% en peso, de la proteína o secuencia de nucleótidos de interés. Una molécula de ácido nucleico "aislada" o "purificada" que codifica un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido objeto. Sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan perjudicialmente las características básicas de la composición.

[0044] En resumen, las secuencias que codifican los componentes de polipéptido de la proteína de fusión pueden ensamblarse por separado, y ligarse en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente de polipéptido se liga, con o sin una secuencia enlazadora, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente de polipéptido de modo que los marcos de lectura de las secuencias están en fase. Esto permite la traducción en una sola proteína de fusión que retiene la inmunogenicidad de ambos componentes de polipéptido.

[0045] Los fragmentos de ADN que codifican los componentes de polipéptido de la proteína de fusión también pueden escindir y se utilizan como plantillas de ADN para una PCR de solapamiento con pares de cebadores adecuados. En particular, la presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una fusión de las dos secuencias SEQ ID NO: 1 (Der p 1 maduro) y SEQ ID NO: 2 (Der p 2 maduro), o de SEQ ID NO: 3 (proDer p 1) y SEQ ID NO: 2.

[0046] Como se entenderá por los expertos en la técnica, puede ser ventajoso en algunos casos producir moléculas de nucleótidos que codifican la proteína de fusión que poseen codones de origen no natural en los componentes de la fusión. Por ejemplo, los codones preferidos por un huésped procariota o eucariota particular, pueden seleccionarse para incrementar la tasa de expresión de la proteína recombinante o para producir un transcrito de ARN recombinante que tiene propiedades deseables, tales como una vida media más larga. También puede ser ventajoso, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida al sitio, para alterar los sitios de N-glicosilación, sitios activos enzimáticos, epítomos de células B o T, incluyendo epítomos que se unen a IgE.

[0047] Un ácido nucleico según esta invención también puede incluir secuencias que codifican etiquetas, proteínas portadoras, péptidos señal, o secuencias no transcritas o traducidas que incrementan la expresión o la estabilidad de la molécula.

[0048] La presente invención también proporciona secuencias de ácidos nucleicos que son hibridables con cualquiera de las secuencias anteriores o sus secuencias complementarias en condiciones de hibridación estándar, preferiblemente condiciones de alta rigurosidad.

[0049] Una molécula de ácido nucleico es "hibrizable" con otra molécula de ácido nucleico, cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede hibridarse a la otra molécula de ácido nucleico en las condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica de la solución (véase Sambrook et al, 1989). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la "rigurosidad" de la hibridación. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, son posibles desajustes entre bases. La rigurosidad apropiada para la hibridación de ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación, variables bien conocidas en la técnica. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han derivado ecuaciones para calcular la T_m (véase Sambrook et al., Supra, 9.50-9.51). Una longitud mínima para un ácido nucleico hibrizable es al menos aproximadamente 10 nucleótidos; preferiblemente al menos aproximadamente 15 nucleótidos; y más preferiblemente la longitud es al menos aproximadamente 20 nucleótidos.

[0050] En una realización específica, el término "condiciones de hibridación estándar" se refiere a una T_m de 55°C, y utiliza condiciones como se expuso anteriormente. En una realización preferida, la T_m es de 60°C o incluso preferentemente 65°C. En una realización específica, "alta rigurosidad" se refiere a condiciones de hibridación y/o lavado a 68°C en 0,2 X SSC, a 42°C en formamida al 50%, 4 x SSC, o bajo condiciones que ofrezcan niveles de hibridación equivalentes a los observados bajo cualquiera de estas dos condiciones.

[0051] La presente invención se refiere además a vectores de clonación y/o expresión que comprenden una secuencia de ácido nucleico de la invención, y a células huésped que comprenden el ácido nucleico de la invención o dicho vector, es decir, una célula huésped en la que al menos uno de estos nucleico ácidos o vectores se transfirió. El vector de expresión según la invención puede comprender un casete de expresión funcional que es también un objeto de la presente invención. Un casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la invención, que está unida operativamente a los elementos necesarios para su expresión. Dicho vector contiene ventajosamente una secuencia de promotor, señales para la iniciación y terminación de la traducción, así como regiones apropiadas para la regulación de la traducción. Su inserción en la célula huésped puede ser transitoria o estable. Dicho vector también puede contener secuencias que codifican señales específicas que desencadenan la secreción de la proteína traducida o su direccionamiento a compartimentos u orgánulos celulares (por ejemplo, aparato de Golgi, endosomas, periplasma ...).

[0052] Estas diferentes señales de control se seleccionan en función de la célula huésped y pueden insertarse en vectores que se autorepican en la célula huésped, o en vectores que integran el genoma de dicho huésped.

[0053] Las células huésped pueden ser procarióticas o eucarióticas, incluyendo, pero no limitado a, bacterias, levaduras, células vegetales, células de insecto, células de mamífero, incluyendo líneas celulares que están disponibles comercialmente. Los ejemplos preferidos para huéspedes de expresión son *Escherichia coli*, lactobacilos, bacterias probióticas, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, células de insecto, células vegetales, células COS y células CHO.

[0054] La transfección de la célula huésped se puede realizar utilizando cualquier técnica estándar, tal como transformación química, electroporación, precipitación con fosfato de calcio o lipofección.

[0055] Alternativamente, la proteína de fusión según la invención se expresa in vitro con una transcripción libre de

células y el sistema de traducción a partir de una matriz de ADN o ARN que contiene elementos necesarios para su expresión en un lisado celular o sistema reconstituido (por ejemplo, Rapid Translation System®, Roche Diagnostics Retic Lysate IVT™, Ambion).

5 [0056] La proteína recombinante puede entonces recuperarse y purificarse, por medio de procedimientos bien conocidos para la purificación: se puede purificar a partir de lisados o extractos celulares, cuerpos de inclusión o del sobrenadante de cultivo mediante procedimientos, tales como la cromatografía de HPLC, técnicas de inmunofinidad con anticuerpos específicos, y similares.

10 *Composiciones vacunales, medicamentos y procedimientos para prevenir o tratar una reacción alérgica contra los ácaros en un individuo*

[0057] La presente invención también se refiere al uso de una proteína de fusión como se define anteriormente, para la fabricación de un medicamento destinado a prevenir y/o tratar una reacción alérgica contra ácaros.

15 [0058] La presente invención también se refiere a una composición inmunológica o de vacuna que comprende una proteína de fusión según la invención, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 [0059] La presente invención también se refiere a un procedimiento para prevenir o tratar una reacción alérgica que comprende administrar a un individuo con necesidad del mismo una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión como se define anteriormente.

[0060] Tal como se utiliza aquí, el término "composición inmunológica" significa una composición que es susceptible de inducir una respuesta inmune cuando se administra en un individuo.

25 [0061] Tal como se utiliza aquí, el término "vacunal" se refiere a la capacidad de una sustancia para prevenir o para tratar una reacción patológica del sistema inmune.

30 [0062] En el contexto de la invención, los términos "tratar" o "tratamiento", significa invertir, aliviar, o inhibir la evolución de una reacción patológica del sistema inmune o una o más de sus síntomas.

[0063] En el contexto de la invención, los términos "prevenir" o "prevención", significa el inicio de una reacción patológica del sistema inmune o una o más de sus síntomas.

35 [0064] Tal como se utiliza aquí, el término "individuo" significa preferiblemente un ser humano, pero pueden ser más generalmente un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate.

40 [0065] Las composiciones inmunológicas o vacunales adecuadas pueden ser, en particular, soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o de disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de tales sales), o secas, especialmente composiciones liofilizadas que después de la adición, según el caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

45 [0066] "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas adversas, alérgicas u otras no deseadas cuando se administra a un animal, o un humano, según sea apropiado.

50 [0067] Tal como se utiliza en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Se contempla su uso en las composiciones vacunales, en los medicamentos, o para la aplicación de los procedimientos para prevenir o tratar una reacción patológica del sistema inmunitario en un individuo según la invención.

55 [0068] En el marco de los procedimientos para prevenir o tratar las reacciones alérgicas, las composiciones vacunales o los medicamentos, según la invención, pueden incluir cualquier adyuvante de vacunación convencional, incluyendo la enterotoxina lábil al calor (LT), toxina de cólera (CT), subunidad B de la toxina del cólera (CTB), liposomas polimerizados, toxinas mutantes.

60 [0069] Para la administración oromucosal, los adyuvantes pueden ser preferiblemente un *Bifidobacterium*, una bacteria de ácido láctico (bien en forma de una suspensión celular, células liofilizadas, un lisado, subcomponentes purificados, o moléculas purificadas), o una combinación de un corticosteroide con la vitamina D3 o cualquier metabolito o análogo de este último.

65 [0070] Ventajosamente, cuando se contempla la administración por las mucosas, el adyuvante puede ser un vector particulado sintético que comprende un núcleo hidrófilo no líquido que comprende un polisacárido reticulado. Por consiguiente, la proteína de fusión, según la invención, se puede formular en una formulación mucoadhesiva basada

en un vector particulado sintético que comprende (i) una partícula que comprende un núcleo hidrófilo no líquido que comprende un polisacárido reticulado; y (ii) una proteína de fusión según la invención. Se observó que dicha formulación era particularmente eficiente en la inducción de tolerancia inmunitaria. Las partículas que se pueden utilizar se describen en la solicitud de patente internacional PCT/IB2007/002379.

[0071] Brevemente, el polisacárido reticulado puede derivar de cualquier monómero de sacárido, preferiblemente glucosa. Los polisacáridos tienen preferiblemente un peso molecular entre 2.000 y 100.000 daltons, y lo más preferiblemente de 3.000 a 10.000 daltons. Los polisacáridos preferidos son almidón (polímeros de glucosa alfa 1-4) y dextrano (polímeros de glucosa alfa 1-6 derivados de bacterias), o hidrolisados de los mismos, tales como dextrinas o maltodextrinas.

[0072] Grupos iónicos, es decir aniónicos (por ejemplo, sulfato o carboxilato) o grupos catiónicos (por ejemplo, iones de amonio cuaternario y aminas primaria, secundaria y terciaria) se injertan opcionalmente en el núcleo del polisacárido reticulado (preferiblemente de 0 a 3 milequivalentes, más preferiblemente de 0 a 2 milequivalentes, de carga iónica por gramo).

[0073] Opcionalmente, el núcleo de polisacárido reticulado está al menos parcialmente recubierto de una capa de compuestos anfífilos y/o una capa de compuestos lipídicos.

[0074] El diámetro de la partícula puede estar comprendido entre 10 nm y 5 µm y preferiblemente entre 20 y 200 nm.

[0075] Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente, si es necesario, y el diluyente líquido hacerse primero isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intramuscular y subcutánea. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción.

[0076] Preferiblemente, la composición vacunal, o el medicamento se administra por la vía de las mucosas, más preferiblemente por la vía oromucosal, y lo más preferiblemente por vía sublingual. Como tal, la composición de vacuna y el medicamento se formulan preferiblemente en una forma adaptada para dichas vías de administración.

[0077] La administración por la mucosa se refiere a cualquier procedimiento de administración, en donde la formulación en parte o en su totalidad entra en contacto con una mucosa. Mucosa se refiere al tejido epitelial que reviste las cavidades internas del cuerpo. La superficie de la mucosa se puede seleccionar del grupo que consiste en una superficie nasal, bucal, ocular, auditiva, del tracto pulmonar, uretral, del tracto digestivo, y rectal.

[0078] La administración oromucosal comprende cualquier procedimiento de administración, en donde la formulación en parte o en su totalidad entra en contacto con la mucosa de la cavidad oral y/o la faringe del paciente. Incluye, en particular, la administración sublingual, perlingual (es decir, a través de la mucosa de la lengua) y oral.

[0079] En el marco de los procedimientos para prevenir o tratar las reacciones alérgicas, las composiciones vacunales o los medicamentos, según la invención, el régimen de administración se puede mantener, por ejemplo, durante un período de menos de 6 semanas a más de 3 años.

[0080] Preferiblemente, en el marco de procedimientos para prevenir o tratar las reacciones alérgicas, el intervalo para las composiciones de la vacuna o los medicamentos, según la invención, puede ser de 0,001 mg/kg a 5 mg/kg/semana. Más preferiblemente, el intervalo de dosis es de entre 0,01 mg y 1 mg/kg y más preferiblemente de 0,03 mg/kg/semana a 0,1 mg/kg/semana. En realizaciones preferidas, la dosis para las composiciones vacunales o los medicamentos según la invención es de 0,056 mg/kg de peso corporal una vez por semana. Se contempla además que la dosis puede estar entre 0,05 mg/kg y 3 mg/kg/semana. Algunas variaciones en la dosificación tendrán lugar necesariamente dependiendo de la afección del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual.

Aplicaciones de detección/diagnóstico

[0081] La proteína de fusión según la invención puede además utilizarse para detectar anticuerpos dirigidos contra un alérgeno del Grupo I y/o un alérgeno del Grupo II del género *Dermatophagoides*, en una muestra de un individuo.

[0082] Por consiguiente, la invención proporciona además un procedimiento para la detección in vitro de anticuerpos dirigidos contra un alérgeno del Grupo I y/o alérgeno del Grupo II, en una muestra biológica de un individuo, cuyo procedimiento comprende las etapas que consisten en:

a) poner en contacto dicha muestra biológica de un paciente con una proteína de fusión que comprende un alérgeno del Grupo I y un alérgeno del Grupo II del género *Dermatophagoides*, según la invención;

b) detectar la formación de complejos inmunes entre dicha proteína de fusión y anticuerpos en la muestra biológica; mediante el cual, si se detectan complejos inmunes, entonces la muestra biológica contiene anticuerpos dirigidos

contra un alérgeno del Grupo I y/o un alérgeno del Grupo II del género *Dermatophagoides*.

[0083] El individuo puede ser un ser humano o un animal no humano, en particular un mamífero no humano, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate.

[0084] La muestra biológica puede ser, en particular, un fluido biológico, tal como sangre o suero.

[0085] La detección de anticuerpos en la muestra biológica de un individuo puede indicar que dicho individuo está sensibilizado, o alérgico, a dicho alérgeno del Grupo I y/o un alérgeno del Grupo II del género *Dermatophagoides*.

[0086] El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgM, IgE, IgG o IgA.

[0087] El experto puede utilizar cualquier procedimiento cualitativo o cuantitativo adecuado conocido en la técnica, para detectar anticuerpos. El ensayo puede llevarse a cabo mediante la inmovilización de la proteína de fusión en una fase sólida, o por el contrario, con la proteína de fusión es la fase fluida. Los procedimientos típicos que pueden utilizarse incluyen ELISA, transferencia Western.

[0088] Cuando se determina la concentración de los anticuerpos, la cuantificación de la respuesta del anticuerpo se pueden repetir en el tiempo, por ejemplo, con el fin de controlar la eficacia de un tratamiento de desensibilización administrada al individuo.

[0089] La proteína de fusión según la invención puede utilizarse además para pruebas celulares, tales como la prueba de la proliferación de células T, prueba de liberación de mediadores etc. La proteína de fusión puede estar expuesta a varios tipos de células con el fin de obtener respuestas medibles. Tales respuestas pueden comprender la liberación de histamina u otros mediadores (por ejemplo, leucotrienos, serotonina, ECP) en el caso de las células efectoras alérgicas (por ejemplo: mastocitos basófilos, eosinófilos). En otro tipo de ensayo, se puede medir la proliferación o la muerte (por ejemplo, apoptosis) de las células por ejemplo, mediante la captación de ³H timidina o cualquier otro ensayo adecuado. Tales células pueden ser células T. Además, las proteínas de fusión pueden usarse para inducir la liberación de citocinas u otras sustancias inmunológicamente relevantes (por ejemplo, de células T) que se pueden medir. Tales pruebas celulares pueden llevarse a cabo, por ejemplo, en PBMC recogidas de un individuo.

[0090] Dado que las proteínas de fusión pueden contener epítomos de alérgenos no relacionados, se pueden utilizar para pruebas de cribado de diagnóstico (in vitro, in vivo, como se describe anteriormente) con el fin de detectar la sensibilización o la falta de respuesta de un individuo contra uno de los componentes de la proteína de fusión. Esto puede permitir que se proporcione al médico una prueba de diagnóstico que es adecuada para cribar los pacientes sensibilizados de manera rápida.

[0091] De este modo, la proteína de fusión según la invención puede también usarse para propósitos de diagnóstico, por ejemplo para pruebas de provocación in vivo. Tales pruebas pueden comprender una prueba cutánea (por ejemplo, punción de la piel o la prueba intradérmica), pruebas de provocación nasal, todas las formas de pruebas de reacción a los alimentos o las pruebas de provocación bronquial.

[0092] En particular, la solicitud describe un procedimiento de diagnóstico que comprende las etapas de (a) inyectar por vía intradérmica o subcutánea la proteína de fusión según la invención; y (b) detectar la reactividad de IgE, en particular midiendo el diámetro de la reacción de roncha y eritema en el sitio de inyección, en el que una reactividad de IgE es indicativa de un individuo sensibilizado o alérgico a un alérgeno del Grupo I y/o un alérgeno del Grupo II del género *Dermatophagoides*.

[0093] La solicitud describe además un procedimiento de detección de una reactividad de IgE en un individuo que comprende las etapas de (a) inyectar por vía intradérmica o subcutánea la proteína de fusión según la invención; y (b) detectar una reacción de roncha y eritema en el sitio de inyección, en el que una reacción de roncha y eritema es indicativa de una reactividad de IgE del individuo a un alérgeno del Grupo I y/o Grupo II del género *Dermatophagoides*.

[0094] El diámetro de la reacción de roncha y eritema en el sitio de la inyección se puede medir para cuantificar la reactividad de IgE.

[0095] La presente invención también se refiere al uso de una proteína de fusión que comprende un alérgeno de Grupo I y un alérgeno de Grupo II del género *Dermatophagoides*, según la invención, para la fabricación de una prueba de diagnóstico. Dicha prueba de diagnóstico forma además parte de la invención y pretende utilizarse para el cribado de pacientes sensibilizados a alérgenos del Grupo I y/o Grupo II de *Dermatophagoides*.

[0096] La invención se ilustra adicionalmente en vista de las siguientes figuras y ejemplos.

FIGURAS

[0097]

Figura 1: Representación esquemática de las proteínas de fusión Der p 1-Der p 2

Figura 2: Producción de las proteínas de fusión de ácaros en *Pichia pastoris*

Análisis de transferencia Western de sobrenadantes de cultivo después de la inducción 15h en medio BMMY con anticuerpos monoclonales específicos contra los grupos Der p 2 (A) y el Der p 1 (B) de las proteínas de fusión. (A): cepa de control negativo (transformada con el vector vacío pPICZ α ; carril 1), F1 (carril 2), F2 (carril 3), F3 (carril 4), F4 (carril 5), proDer p 1 recombinante expresado en tabaco (carril 6, patente W02004005334), Der p 2 recombinante (carril 7). (B): cepa de control negativo (carril 1), F2 (carril 2), F4 (carril 3), proDer p 1 recombinante (carril 4), Der p 2 recombinante (carril 5). Los pesos moleculares (kDa) se indican a la izquierda.

Figura 3: Reactividad de IgE de las proteínas de fusión de ácaros recombinantes producidas en levadura

El análisis por inmunotransferencia de sobrenadantes de cultivo de F2 (carril 2) y F4 (carril 3) con un conjunto de sueros de pacientes alérgicos a los ácaros del polvo doméstico. Los controles son Der p 1 recombinante (carril 4) y Der p 2 recombinante (carril 5). Los pesos moleculares (kDa) se indican a la izquierda.

Figura 4: La desglucosilación de las proteínas de fusión de ácaros expresadas en levadura

El cambio de tampón del sobrenadante de cultivo se realizó por ultrafiltración. Las proteínas se trataron con endoglicosidasa H antes del análisis SDS-PAGE. Sobrenadante de control negativo no tratado (carril 1) y tratado (carril 2), proteína F2 no tratada (carril 3) y tratada (carril 4), proteína F4 no tratada (carril 5) y tratada (carril 6). Carril 7: Der p 2 recombinante. Los números a la izquierda indican los pesos moleculares (kDa).

Figura 5: Producción de proteínas de fusión de ácaros en *Escherichia coli*

Reactividades de Der p 2 (A) e IgE (B) de proteínas de fusión de ácaros expresadas in vitro. F1 (carril 1), F2 (carril 2), F3 (carril 3), F4 (carril 4), Der p 2 recombinante (carril 5, sobrenadante de cultivo de levadura). (C) análisis de transferencia Western anti Der p 2 de proteína de fusión de ácaros expresadas in vivo: control negativo (1), F1 (2), F2 (3), F3 (4), F4 (5), Der p 1 recombinante (6), Der p 2 recombinante (8). Los pesos moleculares (kDa) se indican en los lados izquierdos de las imágenes.

EJEMPLO**Materiales y procedimientos****· Construcción de proteínas de fusión de ácaros:****· Para la expresión en *Pichia pastoris***

[0098] Los fragmentos XhoI-NotI de pPICZ α -Der p 1 y pPICZ α -Der p 2 (Sanquin, Países Bajos) se utilizaron para generar la fusión F1 (Der p 2- Der p 1) mediante una PCR de solapamiento usando los siguientes oligonucleótidos: Dp2FW (SEQ ID NO: 16: GGTTGCTCTTCCAACGATCAAGTCGATGTCAAAGAT), Dp2MDp1FW (SEQ ID NO: 17: CATGCTAAAATCCGCGATCTTAACGCCTGCAGTATC), Dp2MDp1 RV (SEQ ID NO: 18: GATACTGCAGGCGTTAGTATCGCGGATTTTAGCATG), Dp1-RV (SEQ ID NO: 19: GCGGCCGCTCAGAGAATGACAACATATGGATA). El fragmento de PCR se clonó a continuación en el vector pGEM-T (Promega). Este plásmido se utilizó posteriormente como plantilla para PCR con los cebadores Dp2_FW XhoI (SEQ ID NO: 20: GGGCTCGAGAAAAGAGATCAAGTCGATGTCAAAGAT) Dp1_RV_NotI (SEQ ID NO: 21: GGCGGCCGCTCAGAGAATGACAACATATGGATA). El fragmento amplificado se clonó en el marco con la secuencia de péptido del factor alfa en el vector pPICZ α (Invitrogen) en los sitios XhoI y NotI. Las quimeras F2 (Der p 2-proDer p 1), F3 (Der p 1-Der p 2) y F4 (proDer p 1- Der p 2) fueron clonadas directamente en el plásmido pPICZ α en los sitios XhoI y NotI después de una amplificación mediante PCR de solapamiento utilizando los fragmentos XhoI-NotI de pPICZ α -Der p 1 y pPICZ α -Der p 2 (Sanquin, Países Bajos) como plantillas de ADN. Los cebadores que se utilizaron fueron: Dp2_FW_XhoI, Dp2PDp1 FW (SEQ ID NO: 22: CATGCTAAAATCCGCGATCGTCCATCATCGATCAAA), Dp2PDp1 RV (SEQ ID NO: 23: TTTGATCGATGATGGACGATCGCGGATTTTAGCATG) y Dp1_RV_NotI para la fusión de F2, Dp1_FW_XhoI (SEQ ID NO: 24: GGGCTCGAGAAAAGAACTAACGCCTGCAGTATC), Dp1Dp2FW (SEQ ID NO: 25: CCATATGTTGTCTTCATTCGATCAAGTCGATGTCAAA), Dp1Dp2RV (SEQ ID NO: 26: TTTGACATC-GACTTGATCGAGAATGACAACATATGG), Dp2_RV_NotI (SEQ ID NO: 27: GGCGGCCGCTC-AATCGCGGATTTTAGCATGAGT), para F3 y PDp1_FW_XhoI (SEQ ID NO: 28: GGGCTC-GAGAAAAGACGTCCATCATCGATCAAACT), Dp1Dp2FW (SEQ ID NO: 25: CCATATGTTGTCT-TCTCGATCAAGTCGATGTCAAA), Dp1Dp2RV (SEQ ID NO: 26: TTTGACATCGACTTGATCGAGAAT-GACAACATATGG), y Dp2_RV_NotI.

· Para la expresión en *E. coli*

[0099] Las diferentes construcciones se clonaron en pIX2.0 según las instrucciones del fabricante (Qiagen). Los plásmidos derivados de pPICZ α descritos anteriormente sirvieron como plantilla de PCR. Los pares de cebadores

específicos de genes fueron His_Dp2_FW (SEQ ID NO: 29: ATCACCATCACCACGGTATGCAAGAT-CAAGTCGATGTCAAA) / Dp1_RV (SEQ ID NO: 30: CTTGGTTAGTTAGTTATTAGAGAATGACAAC-ATATGGATA) para fusiones F1 y F2; His_Dp1 (SEQ ID NO: 31: ATCACCATCACCACGGTAT-GCAAACCTAACGCCTGCAGTATC) / Dp2_RV (SEQ ID NO: 32: CTTGGTTAGTTAGTTATTAATCG-CGGATTTTAGCATGAGT) para fusión de F3 y His_PDp1_FW (SEQ ID NO: 33: ATCACCATCA-CCACGGTATGCAACGTCCATCATCGATCAAA) / Dp2_RV para fusión de F4.

· Expresión in vitro en lisado de E. coli

[0100] Las proteínas se expresaron en lisado de E. coli utilizando el kit EasyXpress Maxi (Qiagen) con 10 µg de plantillas de ADN plásmido según las instrucciones del fabricante y el contenido de proteínas se analizaron por transferencia Western.

· Expresión in vivo en E. coli

[0101] Las proteínas de fusión se expresaron en E. coli cepa BL21 (DE3) pLysS. Las células se transforman con los diferentes vectores pIX2.0 mediante el procedimiento de choque térmico según las instrucciones del proveedor (Invitrogen). Los clones transformados se seleccionaron en placas LB que contenían carbenicilina (50 µg/ml) y cloranfenicol (20 µg/ml). La integridad construcción se comprobó mediante PCR.

[0102] Las colonias individuales se inocularon en medio LB Cb (50 µg/ml) Cam (20 µg/ml) y se hicieron crecer durante la noche a 37°C. Se diluyeron cultivos de la noche 1:100 en LB Cb (50 µg/ml) y se hicieron crecer hasta que la DO_{600 nm} fue entre 0,4 y 0,8. A continuación, se indujo la expresión de la proteína diana con IPTG 1 mM (Sigma Aldrich). Los sedimentos celulares se recogieron por centrifugación y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis. La lisis se realizó según el siguiente procedimiento. Los sedimentos celulares se congelan primero en nitrógeno líquido y se descongelaron a 37°C cinco veces, se resuspendieron en tampón de lisis (50 mM Tris pH 8 NaCl 50 mM EDTA 1 mM) y se incubaron en un tubo en rotación durante 30 minutos a 4°C. Las muestras a continuación se sonicaron (10 veces 10 segundos, 50W, en hielo) y se clarificaron mediante centrifugación. Los sobrenadantes de la lisis se sometieron a análisis de transferencia Western.

· Expresión en levadura

[0103] Las proteínas de fusión se expresaron en cepas de P. pastoris GS115 o X33 metanotróficas. La transformación se realizó según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Brevemente, los plásmidos pPICZα que contienen las diferentes construcciones se digirieron con SacI y los plásmidos digeridos se usaron para transformar células de levadura por electroporación. Los clones positivos se seleccionaron en placas de YPD zeocina (100 µg/ml) y la integración de las construcciones se comprobó mediante PCR.

[0104] Los clones seleccionados se inocularon en medio complejo de glicerol tamponado (BMGY pH 6) y se cultivó durante la noche a 30°C hasta una DO_{600 nm} de 2-6. Las células se diluyeron a continuación en medio complejo de metanol tamponado (BMMY pH 6) a una DO_{600 nm} de 1 y se continuó el crecimiento durante 15 horas a 30°C. El sobrenadante del cultivo se recogió por centrifugación y se almacenó a -20°C hasta su uso.

· SDS-PAGE y análisis de transferencia Western

[0105] Las proteínas se separaron por SDS-PAGE utilizando geles de acrilamida NuPAGE 4-12% Bis-Tris con tampón de MES en condiciones no reductoras y a continuación se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa tal como se describe por el fabricante (Invitrogen). El marcador de tamaño molecular es SeeBlue Plus2 (Invitrogen). Los sitios sin reaccionar se bloquearon por incubación de las membranas en tampón TBS que contenía leche no grasa al 1% (BioRad). Las reactividades de los grupos Der p 2 y Der p 1 se analizaron a continuación con un anticuerpo anti DPX (0,2 µg/ml; Indoor Biotechnologies, EE.UU.), un anticuerpo monoclonal de ratón anti Der p 1 en la casa (0,25 µg/ml) o conjunto de sueros de pacientes alérgicos (1:30). Las incubaciones se realizaron en tampón TBS suplementado con leche no grasa al 0,2% y Tween 20 al 0,1%. Los anticuerpos secundarios fueron un anticuerpo anti IgG ratón de oveja conjugado a HRP (Sigma), o un anticuerpo anti IgE humano de conejo (Dakota) seguido de un anticuerpo anti IgG de conejo de cabra conjugado a HRP (Calbiochem). Para la detección, se utilizaron los sustratos quimioluminiscentes West Pico o West Femto (Molecular Probes).

· Tratamiento con endoglicosidasa H

[0106] Las proteínas se colocaron en un tampón de acetato sódico 50 mM pH 5,2 por intercambio de tampón con 500 filtros Vivaspin (PES MWCO 10 kDa, Sartorius). Posteriormente se añadió SDS al 0,04%. Se incubaron muestras de 50 µl con o sin 5 mU de endoglicosidasa H (Roche Diagnostics) a 37°C durante 4 horas. Las proteínas fueron analizadas por SDS-PAGE.

Abreviaturas:

[0107] Cb: carbenicilina, Cam: cloranfenicol

Resultados

[0108] Se construyeron las fusiones N-terminal y C-terminal de Der p 2, ya sea con Der p 1 maduro o proDer p 1. Las cajas de la figura 1 representan los diferentes dominios: Der p 2 (sombreada), propéptido Der p 1 (blanco), Der p 1 maduro (de puntos). Los números indican las posiciones de los límites de estos diferentes grupos en las proteínas de fusión.

[0109] Las cuatro proteínas de fusión F1, F2, F3 y F4 se han expresado en *E. coli*. Estas proteínas son reconocidas por un anticuerpo anti-Der p 2 e IgE de pacientes alérgicos a los ácaros del polvo doméstico.

[0110] Las proteínas de fusión F2 y F4 se han expresado con éxito en *P. pastoris*. Estas proteínas son reconocidas por ambos anticuerpos anti Der p 1 y Der p 2 y por los pacientes con IgE. Cuando se expresa en levaduras, las proteínas de fusión F2 y F4 están hiperglicosiladas. Sus hidratos de carbono se han eliminado mediante tratamiento enzimático con endoglicosidasa H.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0111]

<110> STALLERGENES SA

<120> Proteínas de fusión de ácaros

<130> BET07P1253

<160> 33

<170> Patent In version 3.2

<210> 1

<211> 666

<212> ADN

<213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 1

```

actaacgcct gcagtatcaa tggaaatgct ccagctgaaa tcgatttgcg acaaatgcga      60
actgtcactc ccattcgtat gcaaggaggc tgtggttcat gttgggcttt ctctggtggt      120
gccgcaactg aatcagctta tttggcttac cgtaatcaat cattggatct tgctgaacaa      180
gaattagtcg attgtgcttc ccaacacggt tgtcatggtg ataccattcc acgtggtatt      240
gaatacatcc aacataatgg tgtcgtccaa gaaagctact atcgatacgt tgcacgagaa      300
caatcatgcc gacgaccaa tgcacaacgt ttcggtatct caaactattg ccaaattttac      360
ccaccaaatg caaacaaaat tcgtgaagct ttgggtcaaa cccacagcgc tattgccgtc      420
attattggca tcaaagattt agacgcattc cgtcattatg atggccgaac aatcattcaa      480
cgcgataatg gttaccaacc aaactatcac gctgtcaaca ttgttggtta cagtaacgca      540
caaggtgtcg attattggat cgtacgaaac agttgggata ccaattgggg tgataatggt      600
tacggttatt ttgctgcaa catcgatttg atgatgattg aagaatatcc atatgttgtc      660
attctc

```

<210> 2

<211> 387

<212> ADN

<213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 2

ES 2 569 360 T3

	gatcaagtcg atgtcaaaga ttgtgccaat catgaaatca aaaaagtttt ggtaccagga	60
	tgccatgggt cagaaccatg tatcattcat cgtggtaaac cattccaatt ggaagccgtt	120
5	ttcgaagcca accaaaacac aaaaacggct aaaattgaaa tcaaagcctc aatcgatggt	180
	ttagaagttg atgttcccg tatcgatcca aatgcatgcc attacatgaa atgcccattg	240
10	gttaaaggac aacaatatga tattaatat acatggaatg ttccgaaaat tgcacaaaa	300
	tctgaaaatg ttgtcgtcac tgttaaagtt atgggtgatg atggtgtttt ggctgtgct	360
15	attgctactc atgctaaaat ccgcgat	387
20	<210> 3 <211> 906 <212> ADN <213> Dermatophagoides pteronyssinus <400> 3	
25		
	cgtecatcat cgatcaaaac ttttgaagaa tacaaaaaag cttcaacaa aagttatgct	60
30	accttcgaag atgaagaagc tgcccgtaaa aacttttttg aatcagtaaa atatgttcaa	120
	tcaaatggag gtgccatcaa ccatttgtcc gatttgtcgt tggatgaatt caaaaaccga	180
35	tttttgatga gtgcagaagc ttttgaacac ctcaaaactc aattcgattt gaatgctgaa	240
	actaacgcct gcagtatcaa tggaaatgct ccagctgaaa tcgatttgcg acaaatgcga	300
40	actgtcactc ccattcgtat goaaggaggc tgtggttcat gttgggcttt ctctgggtgtt	360
	gccgcaactg aatcagctta tttggcttac cgtaatcaat cattggatct tgctgaacaa	420
	gaattagtcg atttgtcttc ccaacacggt tgtcatgggtg ataccattcc acgtgggtatt	480
45	gaatacatcc aacataatgg tgtcgtccaa gaaagctact atcgatacgt tgcacgagaa	540
	caatcatgcc gacgacaaa tgcacaacgt ttcggtatct caaactattg ccaaatttac	600
50	ccaccaaagc caaacaatat tcgtgaagct ttggtcctaa cccacagcgc tattgccgtc	660
	attattggca tcaaagattt agacgcattc cgtcattatg atggccgaac aatcattcaa	720
55	cgcgataatg gttaccaacc aaactatcac gctgtcaaca ttgttgggta cagtaacgca	780
	caaggtgtcg attattggat cgtacgaaac agttgggata ccaattgggg tgataatggg	840
60	tacgggttatt ttgtgctcaa catcgatttg atgatgattg aagaatatcc atatgttgct	900
	attctc	906
65	<210> 4 <211> 129 <212> PRT	

ES 2 569 360 T3

<213> Dermatophagoides pteronyssinus
<400> 4

[illegible]

<210> 5
<211> 222
<212> PRT
<213> Dermatophagoides pteronyssinus
<400> 5

5	Thr	Asn	Ala	Cys	Ser	Ile	Asn	Gly	Asn	Ala	Pro	Ala	Glu	Ile	Asp	Leu	1	5	10	15
10	Arg	Gln	Met	Arg	Thr	Val	Thr	Pro	Ile	Arg	Met	Gln	Gly	Gly	Cys	Gly	20	25	30	
15	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Gly	Val	Ala	Ala	Thr	Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	35	40	45	
20	Ala	Tyr	Arg	Asn	Gln	Ser	Leu	Asp	Leu	Ala	Glu	Gln	Glu	Leu	Val	Asp	50	55	60	
25	Cys	Ala	Ser	Gln	His	Gly	Cys	His	Gly	Asp	Thr	Ile	Pro	Arg	Gly	Ile	65	70	75	80
30	Glu	Tyr	Ile	Gln	His	Asn	Gly	Val	Val	Gln	Glu	Ser	Tyr	Tyr	Arg	Tyr	85	90	95	
35	Val	Ala	Arg	Glu	Gln	Ser	Cys	Arg	Arg	Pro	Asn	Ala	Gln	Arg	Phe	Gly	100	105	110	
40	Ile	Ser	Asn	Tyr	Cys	Gln	Ile	Tyr	Pro	Pro	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Arg	115	120	125	
45	Glu	Ala	Leu	Ala	Gln	Thr	His	Ser	Ala	Ile	Ala	Val	Ile	Ile	Gly	Ile	130	135	140	
50	Lys	Asp	Leu	Asp	Ala	Phe	Arg	His	Tyr	Asp	Gly	Arg	Thr	Ile	Ile	Gln	145	150	155	160
55	Arg	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gln	Pro	Asn	Tyr	His	Ala	Val	Asn	Ile	Val	Gly	165	170	175	
60	Tyr	Ser	Asn	Ala	Gln	Gly	Val	Asp	Tyr	Trp	Ile	Val	Arg	Asn	Ser	Trp	180	185	190	
65	Asp	Thr	Asn	Trp	Gly	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Ala	Ala	Asn	Ile	195	200	205	
	Asp	Leu	Met	Met	Ile	Glu	Glu	Tyr	Pro	Tyr	Val	Val	Ile	Leu	210	215	220			

ES 2 569 360 T3

<210> 6

<211> 320

<212> PRT

5 <213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 6

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

ES 2 569 360 T3

5	Asp	Leu	Arg	Gln	Met	Arg	Thr	Val	Thr	Pro	Ile	Arg	Met	Gln	Gly	Gly	
			115					120					125				
10	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Gly	Val	Ala	Ala	Thr	Glu	Ser	Ala	
		130					135					140					
15	Tyr	Leu	Ala	Tyr	Arg	Asn	Gln	Ser	Leu	Asp	Leu	Ala	Glu	Gln	Glu	Leu	
	145					150					155					160	
20	Val	Asp	Cys	Ala	Ser	Gln	His	Gly	Cys	His	Gly	Asp	Thr	Ile	Pro	Arg	
					165					170					175		
25	Gly	Ile	Glu	Tyr	Ile	Gln	His	Asn	Gly	Val	Val	Gln	Glu	Ser	Tyr	Tyr	
				180					185					190			
30	Arg	Tyr	Val	Ala	Arg	Glu	Gln	Ser	Cys	Arg	Arg	Pro	Asn	Ala	Gln	Arg	
			195					200					205				
35	Phe	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr	Cys	Gln	Ile	Tyr	Pro	Pro	Asn	Ala	Asn	Lys	
		210					215					220					
40	Ile	Arg	Glu	Ala	Leu	Ala	Gln	Thr	His	Ser	Ala	Ile	Ala	Val	Ile	Ile	
	225					230					235					240	
45	Gly	Ile	Lys	Asp	Leu	Asp	Ala	Phe	Arg	His	Tyr	Asp	Gly	Arg	Thr	Ile	
					245					250					255		
50	Ile	Gln	Arg	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gln	Pro	Asn	Tyr	His	Ala	Val	Asn	Ile	
				260					265					270			
55	Val	Gly	Tyr	Ser	Asn	Ala	Gln	Gly	Val	Asp	Tyr	Trp	Ile	Val	Arg	Asn	
			275					280					285				
60	Ser	Trp	Asp	Thr	Asn	Trp	Gly	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Ala	Ala	
		290					295					300					
65	Asn	Ile	Asp	Leu	Met	Met	Ile	Glu	Glu	Tyr	Pro	Tyr	Val	Val	Ile	Leu	
	305					310					315					320	
	<210> 7																
	<211> 302																

<212> PRT
<213> Dermatophagoides pteronyssinus
<400> 7

5
Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15
10 Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20 25 30
15 Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35 40 45
20 Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50 55 60
25 Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65 70 75 80
30 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
85 90 95
35 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
100 105 110
40 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu
115 120 125
45 Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
130 135 140
50 Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile
145 150 155 160
55 Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
165 170 175
60 Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly
180 185 190
65 Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg
195 200 205
70 Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile
210 215 220
75 Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
225 230 235 240
80 Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
245 250 255

5 Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp
260 265 270

10 Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile
275 280 285

15 Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
290 295 300

<210> 8
<211> 351
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Fusión de Derp2-Derp1
25 <400> 8

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

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

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

40 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp
50 55 60

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

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

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

55 Asp Asp Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg
115 120 125

60 Asp Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp
130 135 140

65 Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys
145 150 155 160

5 Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr
165 170 175

10 Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val
180 185 190

15 Asp Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly
195 200 205

20 Ile Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg
210 215 220

25 Tyr Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe
225 230 235 240

30 Gly Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile
245 250 255

35 Arg Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly
260 265 270

40 Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile
275 280 285

45 Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val
290 295 300

50 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser
305 310 315 320

55 Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn
325 330 335

60 Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
340 345 350

<210> 9
<211> 431
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

ES 2 569 360 T3

<223> Fusión de Derp2-ProDerp1
<400> 9

5	Asp	Gln	Val	Asp	Val	Lys	Asp	Cys	Ala	Asn	His	Glu	Ile	Lys	Lys	Val	1	5	10	15
10	Leu	Val	Pro	Gly	Cys	His	Gly	Ser	Glu	Pro	Cys	Ile	Ile	His	Arg	Gly	20	25	30	
15	Lys	Pro	Phe	Gln	Leu	Glu	Ala	Val	Phe	Glu	Ala	Asn	Gln	Asn	Thr	Lys	35	40	45	
20	Thr	Ala	Lys	Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Ser	Ile	Asp	Gly	Leu	Glu	Val	Asp	50	55	60	
25	Val	Pro	Gly	Ile	Asp	Pro	Asn	Ala	Cys	His	Tyr	Met	Lys	Cys	Pro	Leu	65	70	75	80
30	Val	Lys	Gly	Gln	Gln	Tyr	Asp	Ile	Lys	Tyr	Thr	Trp	Asn	Val	Pro	Lys	85	90	95	
35	Ile	Ala	Pro	Lys	Ser	Glu	Asn	Val	Val	Val	Thr	Val	Lys	Val	Met	Gly	100	105	110	
40	Asp	Asp	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Ala	Ile	Ala	Thr	His	Ala	Lys	Ile	Arg	115	120	125	
45	Asp	Arg	Pro	Ser	Ser	Ile	Lys	Thr	Phe	Glu	Glu	Tyr	Lys	Lys	Ala	Phe	130	135	140	
50	Asn	Lys	Ser	Tyr	Ala	Thr	Phe	Glu	Asp	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Lys	Asn	145	150	155	160
55	Phe	Leu	Glu	Ser	Val	Lys	Tyr	Val	Gln	Ser	Asn	Gly	Gly	Ala	Ile	Asn	165	170	175	
60	His	Leu	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	Asp	Glu	Phe	Lys	Asn	Arg	Phe	Leu	Met	180	185	190	
65	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Glu	His	Leu	Lys	Thr	Gln	Phe	Asp	Leu	Asn	Ala	195	200	205	
	Glu	Thr	Asn	Ala	Cys	Ser	Ile	Asn	Gly	Asn	Ala	Pro	Ala	Glu	Ile	Asp	210	215	220	
	Leu	Arg	Gln	Met	Arg	Thr	Val	Thr	Pro	Ile	Arg	Met	Gln	Gly	Gly	Cys	225	230	235	240
	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Gly	Val	Ala	Ala	Thr	Glu	Ser	Ala	Tyr	245	250	255	

Leu Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val
 260 265 270
 5
 Asp Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly
 275 280 285
 10
 Ile Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg
 290 295 300
 15
 Tyr Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe
 305 310 315 320
 20
 Gly Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile
 325 330 335
 25
 Arg Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly
 340 345 350
 30
 Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile
 355 360 365
 35
 Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val
 370 375 380
 40
 Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser
 385 390 395 400
 45
 Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn
 405 410 415
 50
 Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
 420 425 430

<210> 10
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fusión de Derp1-Derp2
 <400> 10

ES 2 569 360 T3

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

5

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 569 360 T3

	20	25	30
5	Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu 35 40 45		
10	Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp 50 55 60		
15	Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile 65 70 75 80		
20	Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr 85 90 95		
25	Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly 100 105 110		
30	Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg 115 120 125		
35	Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile 130 135 140		
40	Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln 145 150 155 160		
45	Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly 165 170 175		
50	Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp 180 185 190		
55	Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile 195 200 205		
60	Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu Asp Gln 210 215 220		
65	Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val Leu Val 225 230 235 240		
70	Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro 245 250 255		
75	Phe Gln Leu Glu Ala Val Phe Glu Ala Asn Gln Asn Thr Lys Thr Ala 260 265 270		

5 Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp Val Pro
275 280 285

10 Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Lys Cys Pro Leu Val Lys
290 295 300

15 Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys Ile Ala
305 310 315 320

20 Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly Asp Asp
325 330 335

25 Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg Asp
340 345 350

30 <210> 11
<211> 431
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> ProDerp1-Derp2
<400> 11

35

40 Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20 25 30

45 Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35 40 45

50 Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50 55 60

55 Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65 70 75 80

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
85 90 95

60 Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly
100 105 110

65 Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu

ES 2 569 360 T3

	115		120		125	
5	Ala Tyr Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp	130	135	140		
10	Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile	145	150	155	160	
15	Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr	165	170	175		
20	Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly	180	185	190		
25	Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg	195	200	205		
30	Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile	210	215	220		
35	Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln	225	230	235	240	
40	Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly	245	250	255		
45	Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp	260	265	270		
50	Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile	275	280	285		
55	Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu Asp Gln	290	295	300		
60	Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val Leu Val	305	310	315	320	
65	Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro	325	330	335		
70	Phe Gln Leu Glu Ala Val Phe Glu Ala Asn Gln Asn Thr Lys Thr Ala	340	345	350		
75	Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp Val Pro	355	360	365		

Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Lys Cys Pro Leu Val Lys
370 375 380

5

Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys Ile Ala
385 390 395 400

10

Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly Asp Asp
405 410 415

15

Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg Asp
420 425 430

20

<210> 12
<211> 1053
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> ADN de Derp2-Derp1
<400> 12

25

30

gatcaagtcg atgtcaaaga ttgtgccaat catgaaatca aaaaagtttt ggtaccagga 60

tgccatgggt cagaacctg tatlattcat cgtggtaaac cattccaatt ggaagccgtt 120

35

ttcgaagcca accaaaacac aaaaacggct aaaattgaaa tcaaagcctc aatcgatggt 180

ttagaagttg atgttcccgg tatcgatcca aatgcatgcc attacatgaa atgcccattg 240

40

gttaaaggac aacaatatga tattaatat acatggaatg ttccgaaaat tgcacaaaaa 300

tctgaaaatg ttgtcgtcac tgttaaagtt atgggtgatg atgggtgttt ggctgtgct 360

45

attgctactc atgctaaaat ccgcgatact aacgcctgca gtatcaatgg aaatgctcca 420

gctgaaatcg atttgcgaca aatgcgaact gtcactccca ttcgtatgca aggaggctgt 480

ggttcatggt gggctttctc tgggtgttgc gcaactgaat cagcttattt ggcttaccgt 540

50

aatcaatcat tggatcttgc tgaacaagaa ttagtcgatt gtgcttccca acacggttgt 600

catggtgata ccattccacg tggatttgaa tacatccaac ataattggtgt cgtccaagaa 660

55

agctactatc gatacgttgc acgagaacaa tcatgccgac gaccaaagtc acaacgtttc 720

ggtatctcaa actattgcca aatttaccba ccaaagcaa acaaaattcg tgaagctttg 780

60

gctcaaacc cagcgctat tgccgtcatt attggcatca aagatttaga cgcattccgt 840

cattatgatg gccgaacaat cattcaacgc gataatggtt accaaccaaa ctatcacgct 900

65

gtcaacattg ttggttacag taacgcacaa ggtgtcgatt attggatcgt acgaaacagt 960

tgggatacca attggggtga taatggttac gggtattttg ctgccaacat cgatttgatg 1020

	atgattgaag aatatccata tgttgtcatt etc	1053
5	<210> 13 <211> 1293 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> ADN de Derp2-ProDerp1 <400> 13	
	gatcaagtcg atgtcaaaga ttgtgccaat catgaaatca aaaaagtttt ggtaccagga	60
15	tgccatgggt cagaacccatg tatcattcat cgtggtaaac cattccaatt ggaagccggt	120
	ttcgaagcca accaaaacac aaaaacggct aaaattgaaa tcaaagcctc aatcgatggt	180
20	ttagaagttg atgttcccggt tatcgatcca aatgcatgcc attacatgaa atgcccattg	240
	gttaaaggac aacaatatga tattaaatat acatggaatg ttccgaaaat tgcaccaaaa	300
25	tctgaaaatg ttgtcgtcac tgttaaagtt atgggtgatg atggtgtttt ggctgtgct	360
	attgctactc atgctaaaat ccgcgatcgt ccatcatcga tcaaaacttt tgaagaatac	420
30	aaaaaagcct tcaacaaaag ttatgctacc ttcgaagatg aagaagctgc ccgtaaaaac	480
	tttttggaat cagtaaaata tgttcaatca aatggagggtg ccatcaacca tttgtccgat	540
	ttgtcgttgg atgaattcaa aaaccgattt ttgatgagtg cagaagcttt tgaacacctc	600
35	aaaactcaat tcgatttgaa tgctgaaact aacgcctgca gtatcaatgg aaatgctcca	660
	gctgaaatcg atttgcgaca aatgcgaact gtcactccca ttcgtatgca aggaggctgt	720
40	ggttcatggt gggctttctc tgggtgttgc gcaactgaat cagcttattt ggcttaccgt	780
	aatcaatcat tggatcttgc tgaacaagaa ttagtcgatt gtgcttccca acacggttgt	840
45	catgggtgata ccattccacg tggatttgaa tacatccaac ataatgggtg cgtccaagaa	900
	agctactatc gatacgttgc acgagaacaa tcatgccgac gaccaaattgc acaacgtttc	960
50	ggtatctcaa actattgcca aatttaccba ccaaattgcaa acaaaattcg tgaagctttg	1020
	gctcaaacc acagcgctat tgccgtcatt attggcatca aagatttaga cgcattccgt	1080
	cattatgatg gccgaacaat cattcaacgc gataatggtt accaaccaaa ctatcacgct	1140
55	gtcaacattg ttgggttacag taacgcacaa ggtgtcgatt attggatcgt acgaaacagt	1200
	tgggatacca attgggggtga taatgggttac gggtattttg ctgccaacat cgatttgatg	1260
60	atgattgaag aatatccata tgttgtcatt etc	1293

65

ES 2 569 360 T3

	<210> 14	
	<211> 1053	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ADN de Derp1-Derp2	
	<400> 14	
10	actaacgcct gcagtatcaa tggaaatgct ccagctgaaa tcgatttgcg acaaatgcga	60
	actgtcactc ccattcgtat gcaaggaggc tgtggttcat gttgggcttt ctctggtggt	120
15	gccgcaactg aatcagctta tttggcttac cgtaatcaat cattggatct tgctgaacaa	180
	gaattagtcg attgtgcttc ccaacacggt tgtcatggtg ataccattcc acgtggtatt	240
	gaatacatcc aacataatgg tgtcgtccaa gaaagctact atcgatacgt tgcacgagaa	300
20	caatcatgcc gacgaccaa tgcacaacgt ttcggtatct caaactattg ccaaatttac	360
	ccaccaaatg caaacaaaat tcgtgaagct ttgggtcaaa cccacagcgc tattgccgtc	420
25	attattggca tcaaagattt agacgcattc cgtcattatg atggccgaac aatcattcaa	480
	cgcgataatg gttaccaacc aaactatcac gctgtcaaca ttgttggtta cagtaacgca	540
30	caaggtgtcg attattggat cgtacgaaac agttgggata ccaattgggg tgataatggt	600
	tacggttatt ttgctgcaa catcgatttg atgatgattg aagaatatcc atatgttgtc	660
	attctcgatc aagtcgatgt caaagattgt gccaatcatg aaatcaaaaa agttttggta	720
35	ccaggatgcc atggttcaga accatgtatc attcatcgtg gtaaaccatt ccaattggaa	780
	gccgttttcg aagccaacca aaacacaaaa acggctaaaa ttgaaatcaa agcctcaatc	840
40	gatggtttag aagttgatgt tcccgtatc gatccaaatg catgccatta catgaaatgc	900
	ccattggtta aaggacaaca atatgatatt aaatatacat ggaatgttcc gaaaattgca	960
45	ccaaaatctg aaaatgttgt cgtcactggt aaagttatgg gtgatgatgg tgttttggcc	1020
	tgtgctattg ctactcatgc taaaatccgc gat	1053
50		
	<210> 15	
	<211> 1293	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> ADN de ProDerp1-Derp2	
	<400> 15	
60		
65		

5 cgtccatcat cgatcaaaac ttttgaagaa tacaaaaaag ccttcaacaa aagttatgct 60
 accttcgaag atgaagaagc tgcccgtaaa aacttttttg aatcagtaaa atatgttcaa 120
 tcaaattggag gtgccatcaa ccatttgtcc gatttgtcgt tggatgaatt caaaaaccga 180
 10 tttttgatga gtgcagaagc ttttgaacac ctcaaaactc aattcgattt gaatgctgaa 240
 actaacgcct gcagtatcaa tggaaatgct ccagctgaaa tcgatttgcg acaaatgcga 300
 15 actgtcactc ccattcgtat gcaaggaggc tgtgggtcat gttgggcttt ctctgggtgtt 360
 gccgcaactg aatcagctta tttggcttac cgtaatcaat cattggatct tgctgaacaa 420
 20 gaattagtcg attgtgcttc ccaacacggt tgtcatgggtg ataccattcc acgtgggtatt 480
 gaatacatcc aacataatgg tgtcgtccaa gaaagctact atcgatacgt tgcacgagaa 540
 25 caatcatgcc gacgacaaaa tgcacaacgt ttcggtatct caaactattg ccaaatttac 600
 ccaccaaattg caaacaaaat tcgtgaagct ttgggtcaaa cccacagcgc tattgccgtc 660
 30 attattggca tcaaagattt agacgcattc cgtcattatg atggccgaac aatcattcaa 720
 cgcgataatg gttaccaacc aaactatcac gctgtcaaca ttgttggta cagtaacgca 780
 caagggtgctg attattggat cgtacgaaac agttgggata ccaattgggg tgataatggt 840
 35 tacgggttatt ttgctgcaa catcgatttg atgatgattg aagaatatcc atatgttgtc 900
 attctcgatc aagtcgatgt caaagattgt gccaatcatg aaatcaaaaa agttttggta 960
 40 ccaggatgcc atgggtcaga accatgtatc attcatcgtg gtaaacatt ccaattggaa 1020
 gccgttttcg aagccaacca aaacacaaaa acggctaaaa ttgaaatcaa agcctcaatc 1080
 45 gatgggttag aagttgatgt tcccggatc gatccaaatg catgccatta catgaaatgc 1140
 ccattggta aaggacaaca atatgatatt aaatatacat ggaatgttcc gaaaattgca 1200
 50 ccaaaatctg aaaatgttgt cgtcactgtt aaagttatgg gtgatgatgg tgttttggcc 1260
 tgtgctattg ctactcatgc taaaatccgc gat 1293

55 <210> 16
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> cebador
 <400> 16
 gggtgctctt ccaacgatca agtcgatgc aaagat 36
 65 <210> 17
 <211> 37

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 17
 catgctaaaa tccgcgatac ttaacgcctg cagtatc 37

 <210> 18
 <211> 36
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 18
 15 gatactgcag gcgtagtat cgcggtttt agcatg 36

 <210> 19
 <211> 32
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 19
 gcggccgctc agagaatgac aacatatgga ta 32
 25
 <210> 20
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 20
 gggctcgaga aaagatatca agtcgatgac aaagat 36

 35 <210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 21
 ggccggccgct cagagaatga caacatatgg ata 33

 <210> 22
 45 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 50 <400> 22
 catgctaaaa tccgcgatcg tccatcatcg atcaaa 36

 <210> 23
 <211> 36
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 23
 60 ttgatcgat gatggacgat cgcggtttt agcatg 36

 <210> 24
 <211> 33
 <212> ADN
 65 <213> Artificial
 <220>

<223> cebador
 <400> 24
 gggctcgaga aaagaactaa cgcctgcagt atc 33

5 <210> 25
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

10 <223> cebador
 <400> 25
 ccatatgttg tcattctcga tcaagtcgat gtcaaa 36

15 <210> 26
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

20 <223> cebador
 <400> 26
 ttgacatcg acttgatcga gaatgacaac atatgg 36

25 <210> 27
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

30 <223> cebador
 <400> 27
 ggcggccgct caatcgcgga ttttagcatg agt 33

35 <210> 28
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

40 <223> cebador
 <400> 28
 gggctcgaga aaagacgtcc atcatcgatc aaaact 36

45 <210> 29
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

50 <223> cebador
 <400> 29
 atcaccatca ccacggtatg caagatcaag tcgatgtcaa a 41

55 <210> 30
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

60 <223> cebador
 <400> 30
 cttggttagt tagttattag agaatgacaa catatggata 40

65 <210> 31
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

70 <223> cebador
 <400> 31

ES 2 569 360 T3

atcaccatca ccacggtatg caaactaacg cctgcagtat c 41

<210> 32

<211> 40

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 32

10 cttggttagt tagttattaa tcgcggttt tagcatgagt 40

<210> 33

<211> 41

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 33

20 atcaccatca ccacggtatg caacgtccat catcgatcaa a 41

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión que comprende un alérgeno del Grupo I y un alérgeno del Grupo II del género *Dermatophagoides*,
 5 en la que dicho alérgeno del grupo I del género *Dermatophagoides* se selecciona del grupo que consiste en Der p 1, Der f 1, una proforma de Der p 1, una proforma de Der f 1, y una secuencia con una identidad de al menos el 80% con respecto a la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7, que sustancialmente retiene la inmunogenicidad del polipéptido de la secuencia SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7, respectivamente; y
 10 en la que dicho alérgeno del Grupo II del género *Dermatophagoides* se selecciona del grupo que consiste en Der p 2, Der f 2, una proforma de Der p 2, una proforma de Der f 2, y una secuencia con una identidad de al menos el 80% con respecto a la SEQ ID NO: 4, que sustancialmente retiene la inmunogenicidad del polipéptido de la secuencia SEQ ID NO: 4.
2. Proteína de fusión, según la reivindicación 1, en la que el alérgeno del Grupo II se fusiona al extremo N-terminal o
 15 C-terminal del alérgeno del Grupo I.
3. Proteína de fusión, según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho alérgeno del Grupo I es Der p 1.
4. Proteína de fusión, según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho alérgeno del Grupo I es Der p 1 o proDer p 1, y
 20 dicho alérgeno del Grupo II es Der p 2.
5. Proteína de fusión, según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho alérgeno del Grupo I es Der f 1 o proDer f 1, y dicho alérgeno del Grupo II es Der f 2.
- 25 6. Proteína de fusión, según la reivindicación 4, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.
7. Proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende al menos un alérgeno adicional del género *Dermatophagoides*.
 30 8. Proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende al menos una molécula de direccionamiento que reconoce células inmunitarias.
9. Ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína de fusión según cualquiera de las
 35 reivindicaciones 1 a 8.
10. Ácido nucleico que comprende una secuencia que consiste en una fusión de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 2.
- 40 11. Ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.
12. Cassette de expresión que comprende un ácido nucleico, tal como se define en cualquiera de las
 45 reivindicaciones 9 a 11, colocado bajo el control de los elementos necesarios para su expresión en una célula procariota o eucariota o en un sistema libre de células *in vitro*.
13. Cassette de expresión, según la reivindicación 12, **caracterizado porque** la célula procariota o eucariota se selecciona de células de *Escherichia coli*, *Pichia Pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, células COS y CHO.
- 50 14. Vector de clonación y/o expresión que contiene un cassette de expresión, según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13.
15. Célula procariota o eucariota que contiene un cassette de expresión, según cualquiera de las reivindicaciones 12
 55 ó 13, o un vector según la reivindicación 14.
16. Célula procariota o eucariota, según la reivindicación 15, selecciona del grupo que consiste en una célula de *Escherichia coli*, *Pichia Pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, una célula de COS y una célula de CHO.
17. Composición inmunitaria o vacunal que comprende una proteína de fusión, tal como se define en cualquiera de
 60 las reivindicaciones 1 a 8, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
18. Composición inmunitaria o vacunal, según la reivindicación 17, que comprende además un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 65 19. Composición inmunitaria o vacunal, según la reivindicación 18, en el que el adyuvante farmacéuticamente aceptable es un vector particulado sintético que comprende un núcleo hidrófilo no líquido que comprende un

polisacárido reticulado.

20. Proteína de fusión, tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para utilizar en la prevención y/o tratamiento de una reacción alérgica contra ácaros.

5 21. Procedimiento para detectar *in vitro* anticuerpos dirigidos contra un alérgeno del Grupo I y/o un alérgeno del Grupo II, en una muestra biológica de un individuo, cuyo procedimiento comprende las etapas que consiste en:

a) poner en contacto dicha muestra biológica de un paciente con una proteína de fusión que comprende un alérgeno del Grupo I y un alérgeno del Grupo II del género *Dermatophagoides*,

10 en la que dicho alérgeno del grupo I del género *Dermatophagoides* se selecciona del grupo que consiste en Der p 1, Der f 1, una proforma de Der p 1, una proforma de Der f 1, y una secuencia con una identidad de al menos el 80% con respecto a la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7, que sustancialmente retiene la inmunogenicidad del polipéptido de la secuencia SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7, respectivamente; y

15 en la que dicho alérgeno del Grupo II del género *Dermatophagoides* se selecciona del grupo que consiste en Der p 2, Der f 2, una proforma de Der p 2, una proforma de Der f 2, y una secuencia con una identidad de al menos el 80% con respecto a la SEQ ID NO: 4, que sustancialmente retiene la inmunogenicidad del polipéptido de la secuencia SEQ ID NO: 4;

20 b) detectar la formación de complejos inmunes entre dicha proteína de fusión y anticuerpos en la muestra biológica; mediante el cual, si se detectan complejos inmunes, entonces la muestra biológica contiene anticuerpos dirigidos contra un alérgeno del Grupo I y/o un alérgeno del Grupo II del género *Dermatophagoides*.

22. Prueba de diagnóstico para cribar pacientes sensibilizados a los alérgenos del Grupo I y/o el Grupo II de *Dermatophagoides*, que comprende una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

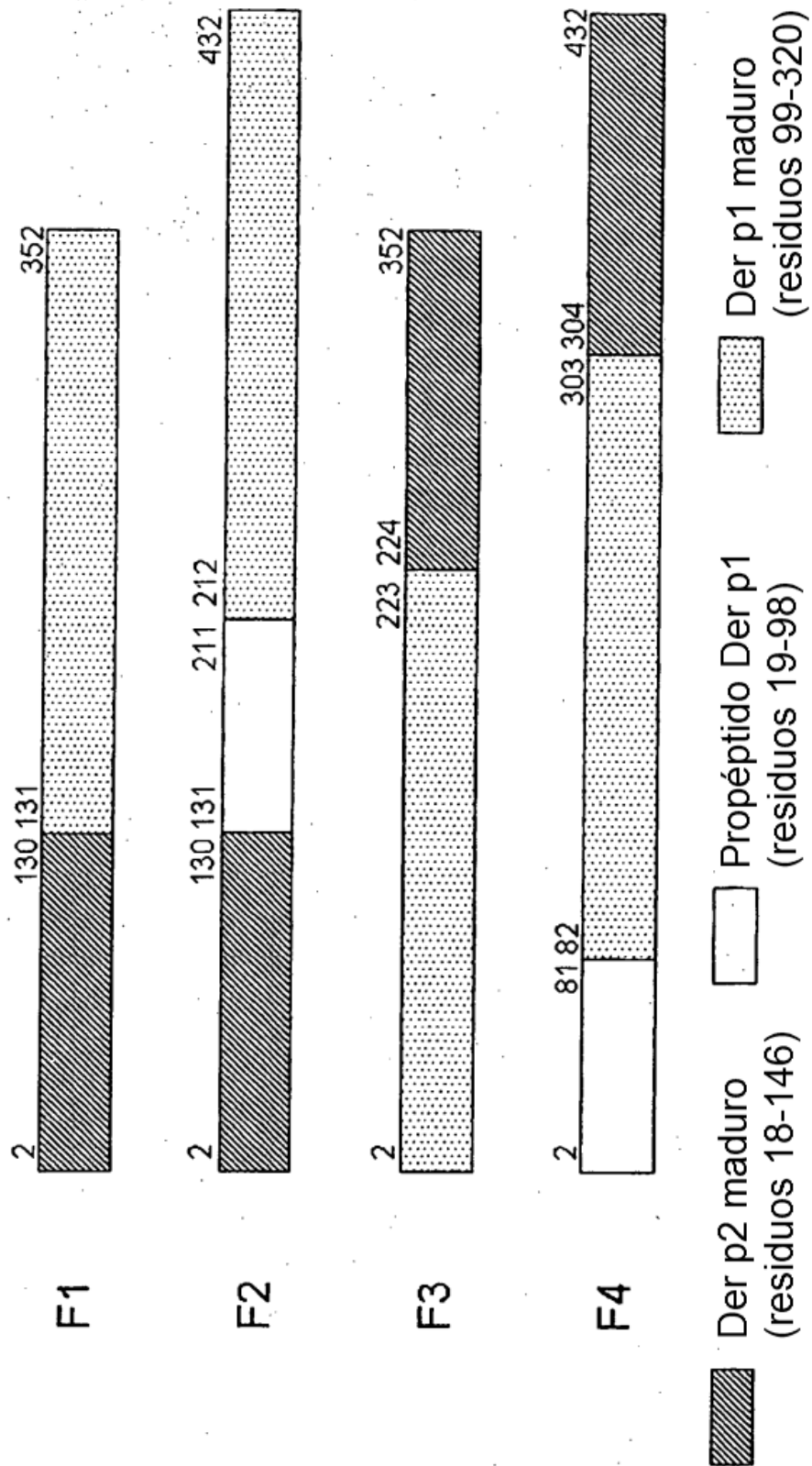
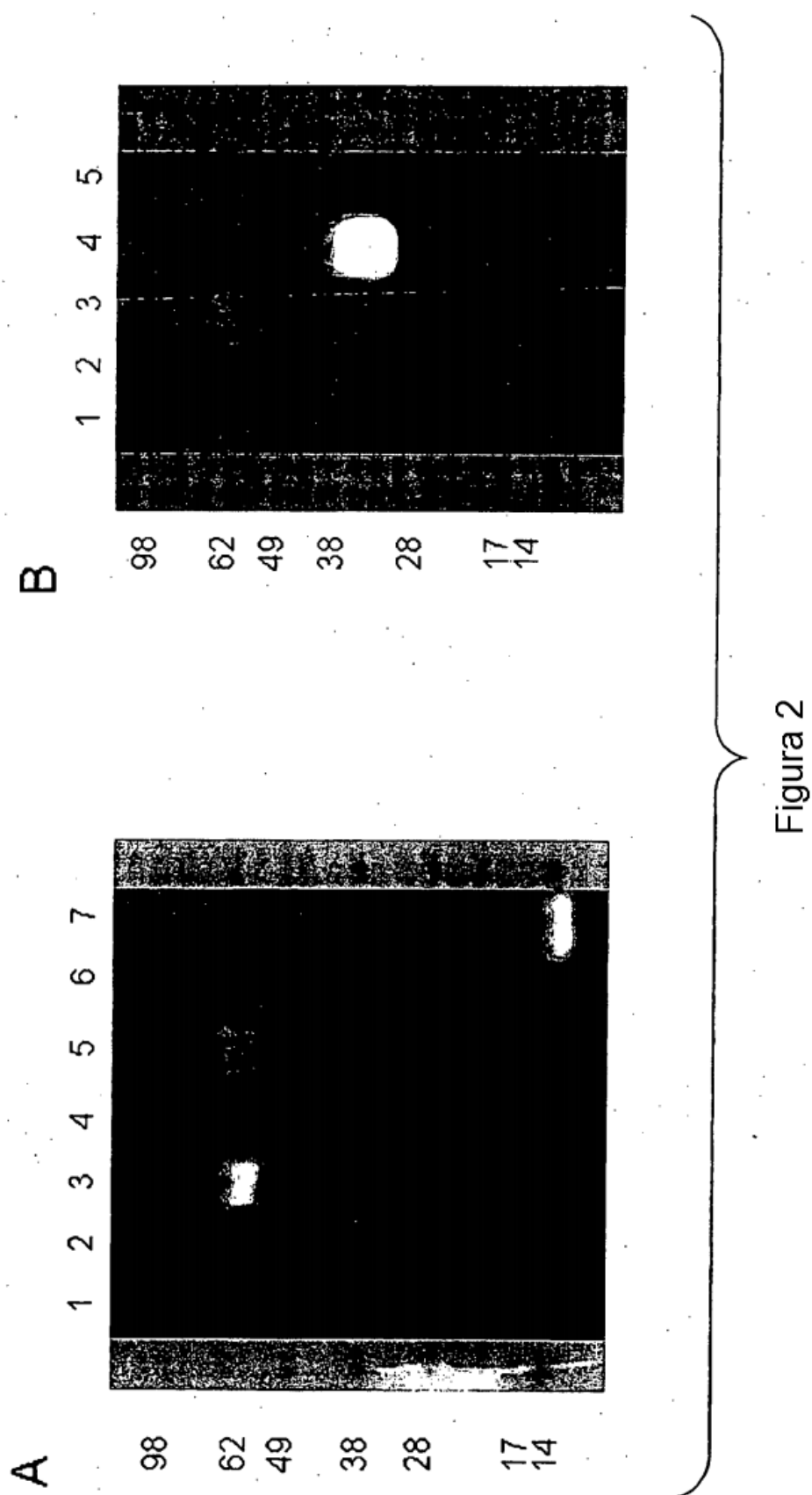


Figura 1



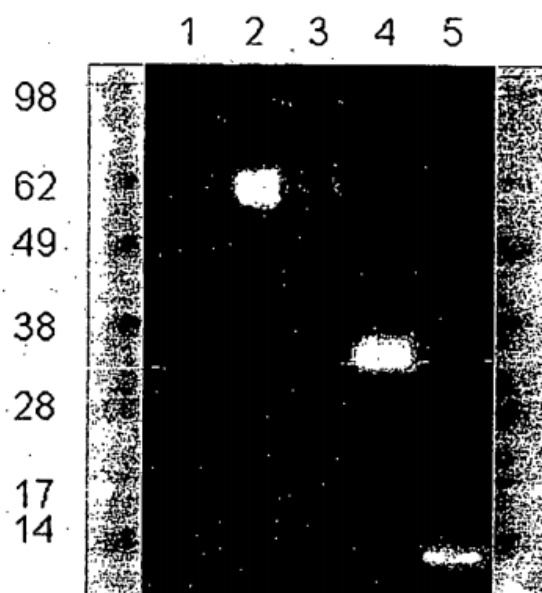


Figura 3

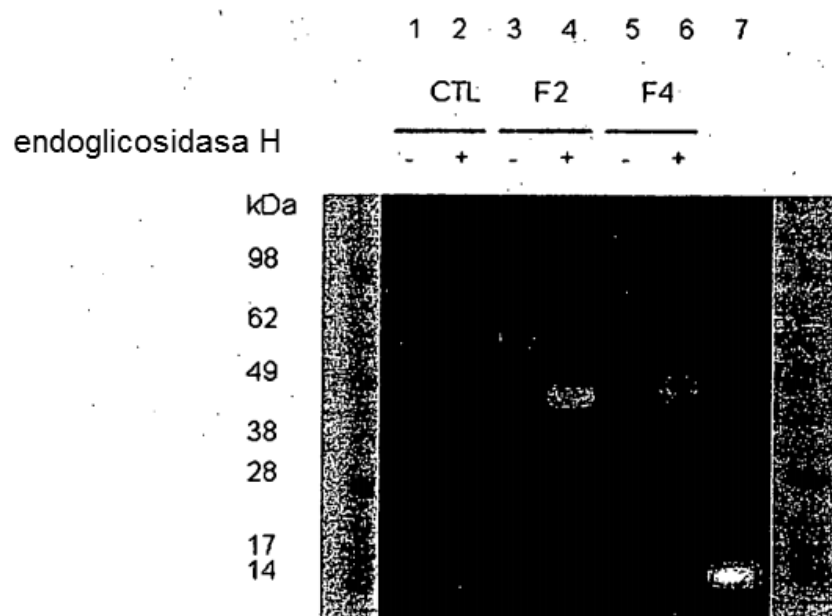


Figura 4

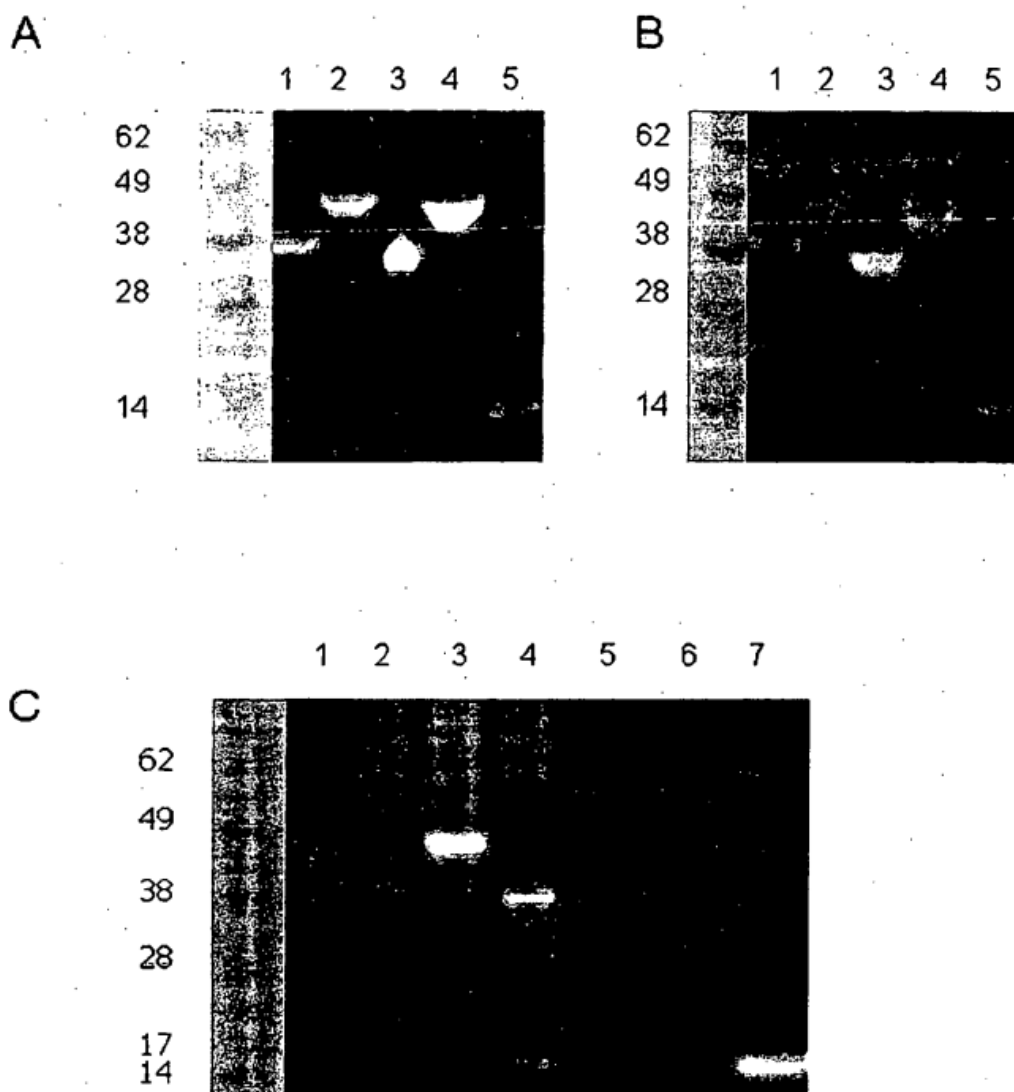


Figura 5