(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 576 482**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
A61K 39/36 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2012 E 12813812 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2794644**

(54) Título: **Variantes hipoalergénicas de PHL P 5, el principal alérgeno de Phleum prJZatense**

(30) Prioridad:

19.12.2011 IT MI20112301

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2016

(73) Titular/es:

LOFARMA S.P.A. (100.0%)
Viale Cassala, 40
20143 Milano, IT

(72) Inventor/es:

MISTRELLO, GIOVANNI;
ZANOTTA, STEFANIA y
RONCAROLO, DANIELA

(74) Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 576 482 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes hipoalergénicas de PHL P 5, el principal alérgeno de Phleum prJZatense

La presente invención proporciona variantes hipoalergénicas de Phl p 5, moléculas de ácido nucleico que las codifican, las composiciones farmacéuticas que los contienen, y su uso en la inmunoterapia de enfermedades alérgicas causadas por el polen de Phleum pratense.

Antecedentes de la invención

Las alergias son causadas por una anormalidad en el sistema inmune que reacciona produciendo anticuerpos IgE frente a proteínas que, por sí mismas, son totalmente inofensivas y están contenidas principalmente en los pólenes, ácaros, epitelios, y algunos alimentos.

Estimaciones recientes muestran que más del 25% de las personas en los países industrializados se ven afectadas por esta enfermedad, que, persistiendo en el tiempo, puede inducir el empeoramiento de los síntomas (por ejemplo, aparición de asma) y sensibilización a otros alérgenos, haciendo de este modo más complicada la elección de la terapia mas apropiada (1).

Una inmunoterapia específica de hiposensibilización (SIT), a diferencia de una terapia farmacológica, es la única forma de tratamiento etiológico de las enfermedades alérgicas que es capaz de afectar positivamente algunos parámetros inmunológicos que son la base de la enfermedad.

Una SIT consiste en la administración de dosis crecientes de extractos estandarizados (vacunas) obtenidos de la misma sustancia que causa la enfermedad. De esta forma, se induce gradualmente en los pacientes una especie de "tolerancia inmunológica" hacia dicha sustancia. Esta tolerancia inmunológica se asocia a una reducción o incluso la desaparición de los síntomas alérgicos.

El riesgo de provocar efectos secundarios que son incluso de naturaleza más grave (2), también se reduce considerablemente mediante el uso de vacunas de liberación lenta o vacunas que se administran por rutas alternativas a las inyecciones, ha limitado la aplicabilidad de una SIT en la terapia de enfermedades alérgicas. Además, como una SIT se lleva a cabo mediante la administración de una mezcla de proteínas alergénicas y no alergénicas de origen natural sin tener en cuenta el perfil de sensibilización del paciente, pueden surgir nuevas reactividades de IgE a los alérgenos inicialmente perjudiciales que están presentes en el extracto.

El éxito de SIT se asocia con una modulación de la respuesta inmune a las moléculas alergénicas al nivel de células T auxiliares y por la inducción de bloqueo de anticuerpos IgG específicos para la sensibilización de los alérgenos. Estos anticuerpos (de protección) pueden competir con IgE por el antígeno, influyendo la estructura tridimensional de esta molécula, e inhibiendo la presentación mediada por IgE de alérgenos a las células T, por lo que interfieren con la manifestación crónica de atopia (3).

El desarrollo de vacunas hechas de proteínas recombinantes que tienen menos alergenicidad pero una capacidad inmunogénica inalterada podría dar lugar a una mejora adicional en el campo de la terapia de enfermedades alérgicas.

Durante los últimos 15 años, se han hecho considerables avances en el campo de la caracterización de alérgenos gracias a la aplicación de las tecnologías basadas en ADN recombinante. Los ADNc que codifican para los principales alérgenos están disponibles para los estudios de alergenicidad y el desarrollo de pruebas de diagnóstico, y permiten SIT innovadoras con base en el uso de proteínas recombinantes purificadas y sus variantes modificadas genéticamente que se caracteriza por una alergénica reducida.

En el mundo, al menos el 40% de los pacientes alérgicos de tipo 1 están sensibilizados contra el polen de gramíneas de los géneros que pertenecen a la numerosa familia de Poaceae. Cerca de 20 especies de 9000, de cinco subfamilias, se considera que son la causa más frecuente de la alergia al polen de gramíneas; la subfamilia Poideae, en particular, es una de las principales fuentes de alérgenos en las regiones templadas y densamente pobladas en Norteamérica, Europa y partes del sur de Australia, ya que se encuentra ampliamente distribuida y es capaz de producir grandes cantidades de polen (4).

Los alérgenos del polen de gramíneas se han clasificado en diferentes grupos en función de su reactividad cruzada. Se han descrito hasta 13 familias de alérgenos dentro de la subfamilia Pooideae, de las cuales el grupo 1 y 5 alérgenos parecen ser los más clínicamente relevantes, ya que el 95 y hasta el 85% de los pacientes con alergia a gramíneas, respectivamente, son sensibles a ellos. Los anticuerpos IgE contra estas dos clases de alérgenos principales representan 80% o más de los IgE específicos en los sueros de los pacientes.

Los alérgenos del grupo 1 son glicoproteínas con un peso molecular de alrededor de 30-35 kDa, con propiedades bioquímicas y funcionales similares a las β-expansinas, enzimas que pertenecen a la familia de las cisteína-proteinasas que participan en los procesos de crecimiento, diferenciación, fertilización y maduración de los frutos. La secuenciación de los alérgenos del grupo 1 de ocho especies ha puesto de manifiesto un nivel del 90% de conservación de aminoácidos.

Los alérgenos del grupo 5 son proteínas no glicosiladas con un peso molecular de alrededor de 28-32 kDa, que comparten un alto grado de identidad de secuencia de aminoácidos (55-80%) que les confiere reactividad cruzada tanto en el enlazamiento de IgE como de epítopos reactivos de células T; se reportó que uno de sus miembros (Phl p Vb) tiene actividad de ribonucleasa.

Dentro de la subfamilia Pooideae, el polen de Phleum pratense es el más estudiado, ya que representa una causa importante de la rinitis, conjuntivitis y asma bronquial (5); este polen ha sido frecuentemente utilizado como fuente para el aislamiento y clonación de alérgenos, y puede ser considerado como representativo de toda la subfamilia y adecuado para la inmunoterapia específica de alérgenos contra la alergia a los pólenes de gramíneas Poideae (6).

Los dos principales alérgenos en el polen de Phleum pratense son Phl p 1 (cuya secuencia de nucleótidos se identifica por el GenBank Acceso No. X78813) y Phl p 5 (7).

Phl p 5 está representado por varias isoformas que se pueden discernir en dos grupos principales denotados a (AF069470) (8) y b (Z27083). La incubación de las Phl p 5 naturales, separadas por electroforesis bidimensional, con anticuerpos IgE específicos reveló que cada una de las dos isoformas se divide en al menos cuatro isoalérgenos que tienen epítopos idénticos, pero al menos un epítopo diferente, localizado tanto en el terminal C como en el terminal N de la molécula.

En años recientes, la mayor parte de la atención se ha centrado en el desarrollo de vacunas más seguras y más eficaces, que consisten en proteínas recombinantes que han experimentado mutagénesis a nivel de los aminoácidos importantes para en enlazamiento de IgE, a saber variantes hipoalergénicas capaces de influir favorablemente en la progresión natural de la enfermedad sin causar efectos secundarios no deseados (9).

Se han realizado numerosos estudios para identificar o alterar epítopos de IgE del alérgeno principal Phl p 5 de Phleum pratense o de las proteínas homólogas producidas en otras gramíneas pertenecientes a la subfamilia Pooideae.

Con respecto a la isoforma Phl p 5b, se demostró la naturaleza conformacional de algunos epítopos de IgE. El uso de mutagénesis dirigida al sitio, 10 lisinas expuestas en la superficie de las 12 lisinas localizadas en el medio del terminal C de la molécula se sustituyeron por alaninas. La capacidad de enlazamiento de IgE del mutante deficiente en lisina disminuyó significativamente como lo demuestran los ensayos de inhibición de ELISA y la estimulación de basófilos, y las pruebas de punción cutánea in vivo (SPT). La capacidad de inducir anticuerpos IgG específicos se mantuvo sin cambios lo que demuestra que la sustitución de aquellos aminoácidos de lisina no obstaculiza la integridad estructural de la proteína (10).

Schramm y colaboradores (Journal of Immunology, vol. 162 no. 4, 15 de Febrero de 1999, páginas 2406 a 2414) describen la producción de algunas variantes (mutantes puntuales y de supresión) de la isoforma Phl p 5b para reducir la capacidad de enlazamiento de IgE, mientras se conserva la reactividad de las células T. Más particularmente, la región 122-164 ha sido reconocida como una región del epítopo de enlazamiento de IgE que es también en parte la región del epítopo de células T.

La construcción de mutantes de Phl p 5b puntuales y de supresión mostró que la capacidad de enlazamiento de IgE de la molécula se redujo dependiendo de la longitud de la supresión. Se analizaron los mutantes que carecen de partes de la molécula, como los tramos de aminoácidos 49-133 (DM1), 50-178 (DM2), 153-178 (DM3), 71-91 acoplado con 153-178 (DM4), o que tienen las siguientes mutaciones puntuales A13C, N32D, N38D, D49L, K50A, A156T, A220T, A241T. La introducción de estas mutaciones puntuales o la supresión más corta DM3 no afectó la capacidad de enlazamiento de IgE de estas variantes, en contraste las supresiones más grandes en los mutantes DM2 y DM4 causaron una fuerte reducción de la reactividad de IgE in vitro (mediante el ensayo de inhibición de ELISA y de liberación de histamina) e in vivo (SPT). Los mutantes que carecen de epítopos individuales no fueron capaces de inducir la proliferación de células T específicas para estos epítopos. El mejor compromiso se encontró en el caso de DM4 mutante, donde los autores observaron una reducción casi completa de la capacidad de enlazamiento de IgE junto con una reactividad total de células conservadas (11).

Con base en los resultados exitosos obtenidos por Schramm (11) y se probó la alta homología de secuencia mostrada por las dos isoformas, el efecto de algunas supresiones estudiadas en Phl p 5b en las regiones correspondientes en la molécula de Phl p 5a. Se observó que el mutante de supresión doble Phl p 5a Δ(94-113, 175-198) mostró un enlace de IgE fuertemente disminuido en el ensayo de inmunotransferencias y pruebas de inhibición de IgE, y una capacidad reducida 11,5 veces para activar basófilos en comparación con la molécula recombinante de tipo silvestre. Los ensayos

de proliferación de células T demostraron retención de la capacidad de estimulación del mutante de doble supresión. El mutante caracterizado por una sola supresión Δ94-113, correspondiente a elix 3 y situado en el terminal N de la molécula, mostró un enlazamiento reducido de IgE sólo en un subgrupo de los sueros de pacientes alérgicos y una capacidad reducida para inducir la liberación de histamina por basófilos. La supresión Δ175-198 solamente localizada en el terminal C causó una mayor reducción en el enlazamiento de IgE que la supresión Δ94-113, pero inferior a la de la doble supresión (12).

Para confirmar la presencia de epítopos importantes en la región del terminal N de Phl p 5a, se caracterizó el fragmento de Phl p 5a (56-165), que comprende alrededor de un tercio de la longitud completa de la molécula. Este estudio demostró que este fragmento representa una parte inmunodominante del alérgeno y contiene epítopos de IgE, ya que reacciona fuertemente con IgE de suero del 90% de los pacientes alérgicos al polen de las gramíneas analizadas (13).

Con base en estudios de mapeo de epítopos de células B y T y en la comparación de secuencias de alérgenos del grupo 5 de diferentes gramíneas, la secuencia de Lol p 5, el alérgeno del grupo 5 de ballico, fue modificado mediante mutagénesis dirigida al sitio en cinco dominios altamente conservados (D1-D5). El reemplazo de los aminoácidos K57A (D1), K172N, F173L, T174A, V175A (D2), A204G, V205A, K206A (D3), G273A (D4), K275A (D5), combinados de diferentes maneras para obtener múltiple mutantes, condujeron a una reducción de la capacidad de enlazamiento de IgE y actividad alergénica, como se determina por la liberación de histamina de los basófilos y SPT en pacientes alérgicos, pero no afectó la capacidad de inducir la proliferación de células T. Este trabajo demostró que un epítopo de células B inmunodominante en Lol p 5 implica el dominio D2 (14).

La posibilidad de utilizar diseñado moléculas multiméricas modificadas genéticamente que constan de diferentes alérgenos del mismo organismo o de diferentes organismos para terapia específica de hiposensibilización ha sido considerada desde hace mucho tiempo como fascinante. Este enfoque permite ensamblar una cantidad de alérgenos en una sola molécula con la ventaja de producir una única preparación que contiene los alérgenos en una relación molar precisa.

Se ha demostrado que la inmunogenicidad de dos moléculas hipoalergénicas puede ser aumentada mediante su ensamblaje como una sola molécula híbrida. En relación con alergia a las gramíneas, la asociación de Phl p 1 y Phl p 5 en una sola molécula híbrida debe representar el repertorio de epítopos T de ambas moléculas, y puede inducir una fuerte respuesta protectora de IgG contra ambos alérgenos.

Linhart y colaboradores (15) desarrollaron una molécula hipoalergénica modificada genéticamente compuesta de los alérgenos Phl p 2 y Phl p 6, en donde se rompió la secuencia de nucleótidos de Phl p 2 por fragmentación, ensamblada nuevamente en orden alterado y fusionada con una secuencia truncada de Phl p 6. El híbrido retuvo la reducción de la reactividad de IgE y la actividad alergénica de sus componentes como se muestra por ELISA y ensayos de activación de basófilos. La inmunización de ratones con la molécula híbrida demostró la mayor inmunogenicidad de esta molécula híbrida, lo que conduce a niveles más altos de anticuerpos IgG específicos del alérgeno en comparación con los componentes individuales.

Se desarrolló una molécula modificada genéticamente mediante el ensamblaje de los ADNc que codifican para los cuatro principales alérgenos de Phleum pratense Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6. El híbrido contenía la mayoría de los epítopos de células B de polen de gramíneas y podría ser utilizado para el diagnóstico de alergias en 98% (n = 652) de los pacientes alérgicos a estas plantas. La inmunización de ratones y conejos con la molécula híbrida indujo una respuesta más fuerte y temprana al anticuerpo IgG que mezclas equimolares de los componentes individuales (16). Los resultados de un trabajo posterior confirmó la capacidad de este híbrido, que consta de cuatro alérgenos principales, de reemplazar el extracto tradicional de polen de Phleum pratense para el diagnóstico in vivo de la alergia al polen de gramíneas por medio de SPT (17).

Como la inmunoterapia convencional es más eficaz en pacientes con sensibilidades alérgicas particulares en comparación con los sujetos sensibles a múltiples alergias, se modificó genéticamente una quimera de alérgeno para el tratamiento de sensibilidad múltiple al polen de abedul y de gramíneas. El principal alérgeno del polen de abedul Bet v 1 sirve como un andamio para el enlazamiento al terminal N y C de los péptidos inmunodominantes de los principales alérgenos de polen de Phleum pratense Phl p 1 y Phl p 5. La quimera fue inmunogénica en ratones para las respuestas de células T y B a los tres alérgenos. la aplicación intranasal de la quimera antes de la sensibilización múltiple suprimió significativamente las respuestas Th2 humorales y celulares específicas para los tres alérgenos e impidió el desarrollo de la inflamación de las vías respiratorias después de la exposición al alérgeno con Phleum pratense y extractos de polen de abedul (18).

Los datos disponibles en la literatura muestran las regiones donde se localizan los epítopos de IgE de los alérgenos de polen de gramíneas, en particular que pertenece al grupo 5, sin indicar los aminoácidos individuales implicados en el enlazamiento de IgE.

Con base en los conocimientos actuales, la mayoría de los pacientes alérgicos a las gramíneas se sensibilizan

principalmente contra alérgenos del grupo 1 y 5. El uso de una variante híbrida hipoalergénica altamente purificada como Phl p i - Phl p 5 puede inducir una respuesta específica a los dos alérgenos principales y eliminar los efectos secundarios relacionados con la terapia tradicional causados por la fuerte actividad alergénica del extracto crudo y la presencia de numerosas moléculas adicionales.

Contrariamente a los resultados propuestos por Wild (18), donde el alérgeno quimérico incluía exclusivamente los epítopos inmunodominantes de Phl p 1 y Phl p 5, la asociación de los dos alérgenos completos representaría todo el repertorio de epítopos T, y podría inducir una fuerte respuesta protectora de IgG en una población alérgica más amplia.

Descripción de la invención

Ahora se ha encontrado que el enlazamiento del alérgeno Phl p 5 a la IgE puede ser reducida mediante la modificación de su secuencia por medio de la sustitución de residuos de aminoácidos específicos.

De acuerdo con un primer aspecto de la misma, la invención proporciona una variante de Phl p 5 derivada del alérgeno principal de Phl p 5 de Phleum pratense (secuencia de tipo silvestre SEQ ID NO: 1), o de una isoforma de la misma que tiene al menos 94% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, preferiblemente al menos 96%, la dicha variante que se caracteriza por:

a) reactividad reducida a IgE comparado con la SEQ ID NO: 1 de Phl p 5 de tipo silvestre;

b) una secuencia de aminoácidos que presenta una sustitución en el residuo Pro en la posición 158 de la SEQ ID NO: 1, o, cuando la variante se deriva de una isoforma de Phl p 5, se presenta una sustitución en la posición correspondiente de dicha isoforma, es decir, en la posición que coincide con el residuo 158 de la SEQ ID NO: 1 en una alineación de la secuencia de la isoforma Phl p 5 con la SEQ ID NO: 1.

Las isoformas de Phl p 5 que tienen al menos 94% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 incluyen las secuencias naturales depositadas con los números de acceso Phl p 5.0101 (UniProt Q40960) 97%, Phl p 5.0102 (UniProt Q40962) 96%, Phl p 5.0104 (UniProt P93467) 94%.

Las variantes preferidas del alérgeno Phl p 5 son aquellas en las que el residuo Pro 158 está sustituido con un aminoácido neutro, polar, ácido o básico, que se selecciona preferiblemente de Leu, Ala, Thr, Gly, He, Ser, Phe, Lys, Arg, Glu, Asp, y más preferiblemente de Ala, Thr, Ser , Gly, Lys, Arg, Glu, Asp.

En una realización preferida, la variante de acuerdo con la invención que contiene una sustitución tiene la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 2.

La variante de sustitución del alérgeno Phl p 5 de acurdo con la presente invención muestra una reducción de la reactividad de IgE de al menos 10% en comparación con la molécula de tipo silvestre, preferiblemente de al menos 30%, y más preferiblemente de al menos 60%, con el suero de los pacientes alérgicos a Phleum pratense.

La reactividad de IgE de la variante de la SEQ ID NO: 2 se analizó en una combinación de sueros de individuos alérgicos mediante el ensayo de ELISA (Fig. 1). Cuando se incubó con una combinación de sueros de once pacientes alérgicos al polen de Phleum pratense, dicha variante presenta una reducción media de la reactividad de IgE en comparación con alérgeno de tipo silvestre Phl p 5 (SEQ ID NO: 1) de 61% (SEQ ID NO: 2).

Estos resultados fueron confirmados por experimentos de inhibición de ELISA, que permiten evaluar la reactividad de epítopos homólogos de proteínas diferentes. Se encontró que con 3,125 pmol/ml de inhibidor, el enlazamiento de la proteína Phl p 5 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) con las IgE de una combinación de sueros es inhibido en un 73,2% cuando se trata previamente el suero con la misma proteína, y en un 20,4% cuando se incuba previamente con la variante de la SEQ ID NO: 2 (Fig. 2).

Estos resultados indican claramente que la sustitución del aminoácido en la posición 158 de la SEQ ID NO: 1 interfiere con el reconocimiento del alérgeno Phl p 5 alérgeno por las IgE.

El alérgeno Phl p 5 de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 1 y la variante hipoalergénica de la SEQ ID NO: 2, que se utiliza para inmunizar ratones Balb/c, induce una respuesta específica de IgG (Fig. 3). En particular, los anticuerpos producidos contra la SEQ ID NO: 2 también reconocen la SEQ ID NO: 1 de la contraparte de tipo silvestre (Fig. 4), lo que demuestra que la modificación del residuo en la posición 158 no causa una alteración significativa en los epítopos de IgG de la molécula. Por otra parte, la inmunización con variantes de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 induce una respuesta inmune más rápida al extracto del polen de Phleum pratense (Phl p) que la obtenida con el mismo extracto (Fig. 5). Por el contrario, los anticuerpos presentes en el suero de animales inmunizados con un antígeno no relacionado son incapaces de reconocer a Phl p 5 de tipo silvestre y extracto de polen de Phleum pratense. La

reactividad del extracto de polen de Phleum pratense de los anticuerpos inducidos por la inmunización de ratones con las SEQ ID NO: 1 y 2 alcanza el máximo en la segunda semana, cuando se observa el reconocimiento muy débil por los anticuerpos producidos por la inmunización con el extracto de polen de Phleum pratense (Fig. 5).

En cuanto a la inducción de anticuerpos protectores capaces de competir en el enlazamiento entre Phl p 5 e IgE, se ha observado que los anticuerpos IgG producidos contra SEQ ID NO: 2 inhiben el enlazamiento de Phl p 5 con las IgE de los pacientes alérgicos a gramíneas con la misma eficacia que las IgG inducidas por la proteína de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) (Fig. 6). Los experimentos de inhibición de ELISA han demostrado que las IgG de ratones inmunizados con la SEQ ID NO: 2 inhiben la reactividad de IgE de sueros de siete pacientes con Phl p 5 en un promedio de 69,1% (con valores que van desde 48,3 hasta 82,4%), y aquellos producidos contra la SEQ ID NO: 1 en un 71,7% (49,5-84,3%). El suero de los animales no inmunizados usado como control no da lugar a ningún tipo de inhibición del enlazamiento específico IgE-Phl p 5.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un péptido inmunológicamente activo que corresponde a un fragmento de Phl p 5 que contiene la sustitución descrita anteriormente. Dicho péptido contiene preferiblemente 15 a 35, y más preferiblemente 15 a 20, residuos de aminoácidos. En la presente memoria, la expresión "inmunológicamente activo" significa que el péptido debe ser capaz de estimular una respuesta inmune independientemente de IgE.

Otro aspecto de la invención se refiere a una proteína híbrida que contiene una variante del alérgeno principal de Phl p 5 de Phleum pratense como se describe en la presente memoria y una variante hipoalergénica del alérgeno principal Phl p 1 del polen de Phleum pratense, posiblemente separados por un enlazador.

En la proteína híbrida de acuerdo con la invención, dichas variantes hipoalergénicas de Phl p 5 y Phl p 1 están colocadas indiferentemente en el terminal amino o carboxilo con orientación de cabeza a cola; en otras palabras, cuando el terminal amino de la proteína híbrida coincide con el terminal amino de Phl p 1 o Phl p 5, el terminal carboxilo de la proteína híbrida coincide con el terminal carboxilo de la proteína Phl p 5 o Phl p 1 respectivamente. De acuerdo con una realización preferida, el terminal amino de la proteína híbrida está ocupado por Phl p 1, y el terminal carboxilo por Phl p 5 (Fig. 7).

El enlazador que separa las secuencias mutadas de Phl p 1 y Phl p 5 consiste preferiblemente en una cadena de 8 aminoácidos, más preferiblemente una cadena de dos aminoácidos, e incluso más preferiblemente del dipéptido EF (Glu-Phe).

En una realización preferida de la invención, la proteína híbrida contiene la variante hipoalergénica de Phl p 1 descrita en la solicitud internacional de patente WO2002/022679 presentada por Consiglio Nazionale delle Ricerche. En particular, la variante hipoalergénica de Phl p 1 contenida en la proteína híbrida de acuerdo con la invención se obtiene a partir de una proteína de la secuencia SEQ ID NO: 5 o una isoforma de la misma que es al menos 85%, y preferiblemente al menos 90% idéntica a dicha secuencia SEQ ID NO: 5, mediante la sustitución de los residuos de Lys en posición 28, 35, 44, 48, 179, 181, 183 y/o 185 (en el caso de la SEQ ID NO: 5), o en las posiciones correspondientes de dicha isoforma, con aminoácidos neutros o polares, preferiblemente seleccionados de Ala, Thr, Gly, Pro, Leu, Ile, Phe y Ser, y más preferiblemente Ala. En una realización preferida, dicha variante hipoalergénica de Phl p 1 es la SEQ ID NO: 6. Las variantes hipoalergénicas de Phl p 1 denominadas aquí se describen en la solicitud de patente citada anteriormente.

Las isoformas de Phl p 1, que tiene más de 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 incluyen las moléculas naturales depositadas bajo los números de acceso Phl p 1.0101 (UniProt Q40967) 93%, Phl p 1.0102 (UniProt P43213) 99%.

La proteína híbrida de la secuencia SEQ ID NO: 4 en la que la variante hipoalergénica de Phl p 1 (SEQ ID NO: 6) se enlaza a la variante hipoalergénica de Phl p 5 (SEQ ID NO: 2) con orientación de cabeza a cola (Phl p 1 → Phl p 5) a través del enlazador dipéptido EF, es particularmente preferido.

La variante híbrida de acuerdo con la presente invención muestra una reducción de enlazamiento de IgE de al menos 10%, preferiblemente al menos 25% en comparación con el híbrido de tipo silvestre.

La reactividad de IgE de la variante de SEQ ID NO: 4 se analizó en una combinación de sueros de individuos alérgicos al polen de Phleum pratense mediante el ensayo de ELISA (Fig. 8). Cuando se incubaron con los sueros, dicha variante (a 3,125 nM) mostró una reducción media del 27% en la reactividad de IgE en comparación con el híbrido de tipo silvestre (SEQ ID NO: 3).

Estos resultados fueron confirmados por experimentos de inhibición de ELISA. Se ha observado que en concentraciones iguales (150 nm/ml) del inhibidor, se inhibe el enlazamiento entre el extracto de polen de Phleum pratense adsorbido en los pozos y las IgE específicas contenidas en los sueros de 10 pacientes, en promedio, un 71,7% cuando se trata previamente el suero con extracto de polen de Phleum pratense, en un 51% cuando se incuba

previamente con una mezcla de los alérgenos individuales de tipo silvestre, en un 35,1% cuando se incuba previamente con una mezcla de los dos componentes que experimentaron mutagénesis, en un 54,3% cuando se trata previamente con la SEQ ID NO: 3, y en un 44,5% cuando se incuba previamente el suero con la SEQ ID NO: 4 (Tabla 2 y Fig. 9). La capacidad del híbrido mutante de la SEQ ID NO: 4 para competir en el enlazamiento de Phleum pratense-IgE disminuye significativamente en comparación tanto con la SEQ ID NO: 3 ($p<0,0001$) como con el extracto de polen de Phleum pratense.

Con la misma cantidad (6,25 pmol/ml) de inhibidor, el enlazamiento entre una mezcla de los alérgenos individuales de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5) adsorbida en pozos y las IgE específicas contenidas en una combinación de sueros de los pacientes es inhibida en un promedio de 91,4% cuando se trata previamente el suero con el híbrido de tipo silvestre (SEQ ID NO: 3), y 43,4% cuando se incuba previamente con híbrido sometido a mutagénesis de la SEQ ID NO: 4 (Fig. 10).

También se observó que la variante hipoalergénica de la SEQ ID NO: 4, que se utiliza para inmunizar ratones Balb/c, induce la producción de IgG específicas capaces de reconocer los componentes presentes en el extracto de polen de Phleum pratense (Fig. 11). La molécula híbrida de la SEQ ID NO: 4 induce una respuesta específica de IgG similar a la inducida en ratones por la SEQ ID NO: 3, o por una mezcla de los respectivos alérgenos de tipo silvestre o sometidos a mutagénesis. Por otra parte, la inmunización con el extracto de polen de Phleum pratense induce una menor producción de IgG específicas porque, después de dos semanas de tratamiento, la respuesta de IgG se reduce en 4,5 veces en comparación con la respuesta obtenida con la SEQ ID NO: 4.

El análisis de la reactividad de IgG inducida por la inmunización de ratones con extracto de polen de Phleum pratense muestra que la respuesta de IgG a los dos alérgenos principales es muy tardía: la respuesta hacia Phl p 5 (SEQ ID NO: 1) se observa desde la segunda semana de tratamiento (Fig. 12), mientras que, hacia Phl p 1 (SEQ ID NO: 5), es más tardía y detectable por el ensayo de ELISA en la séptima semana después de la primera inmunización (Fig. 13). Por el contrario, la SEQ ID NO: 4 induce fuertemente la producción de IgG capaces de reconocer los dos alérgenos principales Phl p 1 y Phl p 5. Para apoyar la especificidad de la respuesta descrita anteriormente, los anticuerpos presentes en el suero de animales inmunizados con un antígeno no relacionado son incapaces de reconocer extracto de polen de Phleum pratense, SEQ ID NO: 3 y 4 y las mezclas de variantes de tipo silvestre y sometidas a mutagénesis.

En cuanto a la inducción de anticuerpos protectores capaces de competir en el enlazamiento entre el alérgeno e IgE, se ha observado que los anticuerpos IgG producidos contra la SEQ ID NO: 4 inhiben el enlazamiento del extracto de polen de Phleum pratense a las IgE de los pacientes alérgicos a Phleum pratense con más eficacia que la mezcla de las dos variantes sometidas a mutagénesis (mezcla sometida a mutagénesis) ($p <0,001$) (Fig. 14). Los experimentos de inhibición de ELISA han demostrado que las IgG de ratones inmunizados con SEQ ID NO: 4 inhiben la reactividad de IgE de los sueros de siete pacientes en un promedio de 51,9% (con valores que van desde 36,3 hasta 70,8%), y aquellos producidos contra la mezcla de las dos variantes sometidas a mutagénesis (mezcla e tipo silvestre) en un 35,8% (14,6-52,3%); los anticuerpos IgG inducidos contra la mezcla de proteínas de tipo silvestre (mezcla de tipo silvestre) inhibe el enlazamiento en un promedio de 52,2% (42,2-67,6%), aquellos producidos contra la SEQ ID NO: 3 híbrida de tipo silvestre en un 28,4% (1,2-49,1%), y aquellas inducidas por la inmunización con extracto de polen de Phleum pratense en un 45,9% (11,3-64,8%). El suero de los animales no inmunizados utilizados como control no da lugar a ningún tipo de inhibición de enlazamiento específico del polen de IgE-Phleum pratense.

Las variantes de sustitución de acuerdo con la invención pueden ser fácilmente preparadas por mutagénesis de la secuencia de ADNc de Phl p 5 (SEQ ID NO: 7), Phl p 1 (SEQ ID NO: 11), sus isoformas o variantes naturales, o de la secuencia de ADNc del híbrido de tipo silvestre (SEQ ID NO: 9), usando técnicas conocidas por el experto en la materia (19).

Las SEQ ID NOs: 8 y 10 reportan las secuencias de ADNc que codifican para la variante de una sola sustitución (monomérica) o la variante híbrida identificada como las SEQ ID NOs: 2 y 4, respectivamente.

Otros aspectos de la invención, por tanto, se refieren a una molécula de ácido nucleico que codifica para una variante del alérgeno Phl p 5 descrita en el presente documento, para un péptido derivado de la misma o para la proteína híbrida Phl p 1- Phl p 5, y un vector de expresión que contiene dicha molécula junto con elementos de control de la expresión en células eucariotas o procariotas, tales como promotores o reforzadores de la transcripción, secuencias señal u otras secuencias de regulación de la transcripción. El vector puede ser un plásmido, virus, fago o cualquier otro vector usado comúnmente en ingeniería genética.

La invención también incluye una célula huésped procariota o eucariota transformada o transfectada con el vector de acuerdo con la invención. Las células procariotas tales como Escherichia coli y Bacillus subtilis, o células eucariotas tales como Saccharomyces cerevisiae, se utilizan generalmente para la clonación del vector y expresión de ADNc.

Las variantes hipoalergénicas de acuerdo con la invención también pueden ser producidas como proteínas de fusión.

En vista de su reducida reactividad de IgE, las variantes Phl p 5 de acuerdo con la presente invención pueden ser convenientemente empleadas para preparar composiciones farmacéuticas (por ejemplo comprimidos) para su uso en inmunoterapia de los pacientes alérgicos al polen de Phleum pratense.

Un aspecto adicional de la invención se refiere por tanto a una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de la variante hipoalergénica de Phl p 5, o de la proteína híbrida Phl p 1/Phl p 5, opcionalmente en combinación con otros alérgenos de Phleum pratense, junto con vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes o adyuvantes. En una realización preferida, dicha composición farmacéutica es en forma de una vacuna adecuada para el tratamiento preventivo o terapéutico de enfermedades alérgicas, tales como asma bronquial, rinitis, conjuntivitis alérgica y el síndrome alérgico oral (5, 21). Las formas de administración sublingual, intranasal, subcutánea y transdérmica son las más preferidas.

Los principios y métodos de vacunación son conocidos por el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en (20).

Los ejemplos siguientes ilustran la invención con mayor detalle.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Análisis de ELISA de la reactividad de IgE para el alérgeno Phl p 5 y su variante hipoalergénica de la SEQ ID NO: 2

Fig. 2: Inhibición del enlazamiento de IgE con el alérgeno Phl p 5

Fig. 3: Respuesta de IgG de murino a las respectivas proteínas inmunogénicas

Fig. 4: Respuesta de IgG en ratones inmunizados con la SEQ ID NO: 2

Fig. 5: Respuesta de IgG de murino al extracto de polen de Phl p

Fig. 6: Inhibición del enlazamiento de IgE a la SEQ ID NO: 1 por anticuerpos IgG de murino

Fig. 7: Representación esquemática de la proteína híbrida de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4

Fig. 8: Análisis de ELISA de la reactividad de IgE con la variante híbrida de la SEQ ID NO: 4

Fig. 9: Inhibición del enlazamiento de IgE con el extracto de polen de Phl p

Fig. 10: Inhibición del enlazamiento de IgE a (mezcla de tipo silvestre)

Fig. 11: Respuesta de IgG de murino a Phl p

Fig. 12: Respuesta de IgG de murino a la SEQ ID NO: 1

Fig. 13: Respuesta de IgG de murino a Phl p 1

Fig. 14: Inhibición del enlazamiento de IgE a Phl p por anticuerpos IgG de murino

Ejemplos

A menos que se indique lo contrario, los métodos usados en los siguientes ejemplos se describen en Sambrook, Fritsch y Maniatis "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" II Ed. Vol. 1-2-3 CSH Lab Press 1989.

Ejemplo 1 - mutagénesis específica de sitio del ADNc que codifica para el alérgeno Phl p 5

La mutagénesis específica del sitio del ADNc que codifica para el alérgeno Phl p 5 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 7, precedido en 5' mediante una secuencia que codifica seis histidinas) se llevó a cabo por clonación de ADNc en un vector procariota (pBluescript, GenBank acceso número X52327) seguido de la amplificación por PCR. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la reacción de PCR (Tabla 1) portan las sustituciones de bases apropiadas. Para cada mutagénesis, se utilizó un oligonucleótido complementario que se enlaza a una región correspondiente de la cadena de ADN (19). Después de la amplificación, se degradó selectivamente el molde original sin alteraciones con la digestión enzimática catalizada por la enzima de restricción Dpn I. Se transformaron luego células de Escherichia coli con las moléculas sometidas a mutagénesis. Los clones obtenidos a partir de colonias

bacterianas individuales se secuenciaron de acuerdo con Sanger para determinar la modificación de bases correcta y la ausencia de mutaciones no específicas en el ADNc.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la mutagénesis específica del sitio. Las bases mutadas están en caracteres en negrita.

Oligonucleótido	Secuencia
Phl p5 P158L	Caa ggt tat cct tgc cgg cga gct g (SEQ ID NO: 13)

Ejemplo 2 - Construcción de un plásmido que codifica para la molécula híbrida Phl p 1-Phl p 5 de tipo silvestre (molécula híbrida de tipo silvestre)

La molécula híbrida que contiene la información genética para el híbrido Phl p 1 -Phl p 5 de tipo silvestre se obtuvo mediante fusión de los ADNc que codifican para los alérgenos individuales.

Los ADNc que codifican proteínas Phl p 1 y Phl p 5 maduras se obtuvieron por separado mediante PCR utilizando Php1 DIM Kpn FW (Cgc ggt acc atc ccc aag gtt ccg gg - SEQ ID NO: 14) y cebadores oligonucleótidos Php1 DIM Eco RV (Gc gaa ttc ctt gga cga gta gct ggt - SEQ ID NO: 15) para Phl p 1 y Php5 DIM Eco FW (cgc gaa ttc gcc gat cta ggt tac ggc cc - SEQ ID NO: 16) y cebadores oligonucleótidos Php5 DIM Bam RV (Gcg gga tcc tca gac ttt gta gcc acc - SEQ ID NO: 17) para Phl p 5. Phl p 1 SEQ ID NO: 11 y se utilizaron como moldes los ADNc de Phl p 5 SEQ ID NO: 7.

El producto de amplificación obtenido a partir de Phl p 1 fue amplificado nuevamente mediante el reemplazo de Php1 DIM Kpn FW con Phl p 1 DIM His FW (gcg ggt acc cat atg cat cac cat cac cat cac atc ccc aag gtt ccc ccg - SEQ ID NO: 18), mediante el cual se insertó una secuencia que codifica para seis histidinas secuencia arriba de secuencia de Phl p 1. Se insertaron un sitio Kpn I y un sitio Nde I (que contiene el ATG) en 5' del producto de amplificación de Phl p 1, y se insertó un sitio Eco RI en su extremo 3' en lugar del codón de parada. Se insertó un sitio Eco R I en lugar del ATG en el extremo 5' de Phl p 5, y se insertó un sitio Bam HI en su extremo 3' después del codón de parada. Los productos amplificados se purificaron y se digirieron con las enzimas de restricción Kpn I y Eco RI (Phl p 1) o Eco RI y Bam HI (Phl p 5) (los sitios de restricción están subrayados en los cebadores), y posteriormente se insertan en los sitios Kpn I/Bam HI del vector pEt 3c (Stratagene, la Jolla, CA) para obtener un constructo capaz de expresar una proteína de fusión Phl p 1-Phl p 5 precedida por una secuencia de seis histidinas. La introducción del sitio de restricción Eco RI, que es necesario para la clonación de fragmentos, permitió la inserción de dos aminoácidos (ácido glutámico y fenilalanina) en la unión de las dos proteínas sin alterar el marco de lectura (Fig. 8).

Los clones obtenidos a partir de colonias bacterianas individuales se secuenciaron por el método de Sanger para verificar que el cambio de base era el correcto, y la ausencia de mutaciones no específicas en el ADNc.

Ejemplo 3 - Construcción de un plásmido que codifica para la molécula híbrida Phl p 1-Phl p 5 mutante (molécula híbrida mutante)

Se obtuvo la molécula híbrida que codifica para el híbrido Phl p 1 -Phl p 5 mutante siguiendo el método descrito en el Ejemplo 2 para la variante híbrida de tipo silvestre.

Los pares de oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR eran idénticos, mientras que los ADNc utilizados como moldes codificaron para dos variantes hipoalergénicas cuyas secuencias se identifican en este documento como la SEQ ID NO: 12 (para el mutante Phl p 1) y la SEQ ID NO: 8 (mutante Phl p 5).

Ejemplo 4 - Producción de proteínas Phl p 5, mutantes respectivos, híbrido de tipo silvestre e híbrido mutante

Los ADNc de Phl p 1 (SEQ ID NO: 11) y de Phl p 5 (SEQ ID NO: 7) de tipo silvestre, los ADNc sometidos a mutagénesis (SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 8), y los ADNc híbridos mutantes y de tipo silvestre modificados genéticamente (SEQ ID NO: 9 e 10), precedidos por la secuencia que codifica para seis histidinas, se clonaron en un vector de expresión y se expresaron en células de Escherichia coli de acuerdo con protocolos estándar. Se recolectaron las células por centrifugación y se resuspendieron en regulador de NaH2PO4 100 mM, pH 8 y se lisaron por sonicación. Se separaron las proteínas recombinantes por centrifugación. Se purificó la proteína Phl p 5 soluble (SEQ ID NO: 1) a partir del sobrenadante por cromatografía de afinidad utilizando columnas de agarosa Ni-NTA enlazadas al ácido nitrilotriacético (Qiagen, Milán, Italia) que quela los iones de níquel que interactúan con la porción de la histidina seis fusionada al alérgeno. Phl p 5 sometida a mutagénesis (SEQ ID NO: 2) y el híbrido de tipo silvestre y mutante (SEQ ID NO: 3 y 4),

separados como agregados en el sedimento, se resuspendieron en regulador desnaturalizante urea 8 M, NaH2PO4 100 mM, Tris 10 mM pH 8 y se agitó durante 60 min a 20° C. Las proteínas recombinantes solubilizadas se separaron de los restos insolubles por centrifugación y se purificaron a partir del sobrenadante bajo condiciones de desnaturalización por cromatografía de afinidad utilizando columnas de agarosa Ni-NTA. Las proteínas purificadas se replegaron por diálisis en una solución de (NH4)HCO3 5 mM durante 18 horas a 4° C.

Ejemplo 5 - Características de los sueros de sujetos alérgicos

Se recogieron los sueros de sujetos con una historia clínica de alergia estacional al polen de Phleum pratense y alta reactividad ESTE específica para alérgenos Phl p 1 y Phl p 5 y se utilizaron en forma individual o combinada. Se utilizó una combinación de sueros de sujetos no alérgicos como control negativo.

Ejemplo 6 - Análisis por ELISA de la reactividad de las variantes de Phl p 5 a las IgE de una combinación de sueros

Se adsorbieron cantidades equivalentes (25 pmol) en regulador de carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6 de alérgeno de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), variante sometida a mutagénesis (SEQ ID NO: 2) y el antígeno no relacionado (BSA) en pozos de placas de poliestireno para ensayo de ELISA mediante incubación a 4° C durante 16 horas. Se lavaron los pozos con solución de lavado (regulador de fosfato 60 mM, pH 6,5, que contiene 0,05% de Tween-20), y se bloquearon con solución de dilución (2% de BSA en PBS 1X). Se añadieron alícuotas de 100 µl, se diluyeron 1:5 en regulador de dilución, de una combinación de once sueros humanos de sujetos positivos para EAST o no alérgicos (datos no mostrados) a cada muestra y se incubaron a 25° C durante 2 horas. Después de tres lavados, se añadió suero anti-IgE humano conjugado con peroxidasa (1:4000 en regulador de dilución), seguido de incubación a 25° C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, se desarrolló la reacción colorimétrica mediante la adición de 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e incubación durante 15 minutos a 25° C. Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de HCl 1 N y se leyó a 450 nm usando un espectrofotómetro lector de microplacas. Los resultados se confirmaron mediante tres experimentos independientes.

Se aplicó el mismo protocolo con algunas modificaciones para probar la reactividad de IgE de los híbridos mutantes y de tipo silvestre modificados genéticamente. Se prepararon diluciones en serie de los alérgenos híbridos (SEQ ID NO: 3 y 4) en una proporción de 1:2, partiendo de 0,4 nmol/ml y adsorbido en pozos de placas de poliestireno. Se diluyó una combinación de sueros positivos para polen de Phleum pratense 1:8 en solución diluyente.

Ejemplo 7 - Ensayo de inhibición ELISA - capacidad de la SEQ ID NO: 2 de la variante monomérica para inhibir el enlazamiento de Phl p 5 a las IgE en suero

Se adsorbieron cantidades iguales (1,25 pmol) de Phl p 5 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), en regulador de carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, en pozos de placas de poliestireno para el ensayo de ELISA mediante incubación a 4° C durante 16 horas. A continuación, se lavaron los pozos con solución de lavado (regulador de fosfato 60 mM, pH 6,5, que contiene 0,05% de Tween-20), y se bloquearon los sitios libres con solución de dilución (2% de BSA, PBS 1X). Se incubaron previamente alícuotas (100 µl) de una dilución 1:10 de sueros humanos combinados positivos para Phl p 5 con diluciones seriales de dos veces de alérgenos de tipo silvestre o sometidos a mutagénesis partiendo de 25 pmol/ml a 25° C durante 2 horas. Se añadieron luego las mezclas a cada pozo, y se incubaron a 4° C durante 16 horas. Después de tres lavados, se añadió suero conjugado con peroxidasa anti-IgE humana diluido 1:4000 en regulador de dilución, y se incubó a 25° C durante 1,5 horas. Se obtuvo el desarrollo de una reacción colorimétrica mediante la adición de 100 µl de reactivo TMB e incubando durante 15 minutos a 25° C. Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de HCl 1 N, y se evaluó mediante lectura a 450 nm con un espectrofotómetro. Se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la siguiente fórmula: 100 x [(A-B)/A], donde A es la absorbancia a 450 nm en ausencia de inhibidor, y B es la absorbancia en presencia de inhibidor. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Ejemplo 8 - Ensayo de inhibición ELISA - Capacidad de la SEQ ID NO; 3 y la SEQ ID NO: 4 para inhibir el enlazamiento de las IgE de suero humano a extracto de polen de Phl p o mezcla de Phl p 1 y Phl p 5

Se adsorbieron cantidades iguales (0,05 µg) de Phleum pratense, en regulador de carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, en pozos de placas de poliestireno para el ensayo de ELISA mediante incubación a 4° C durante 16 horas. A continuación, se lavaron los pozos con solución de lavado (regulador de fosfato 60 mM, pH 6,5, que contiene 0,05% de Tween-20), y se bloquearon los sitios libres con solución de dilución (BSA al 2% en PBS 1X). Se incubaron previamente alícuotas (70 µl) de una dilución 1:10 de sueros humanos combinados positivos para polen de Phleum pratense con cantidades equimolares (150 nmol/ml) de alérgenos de tipo silvestre, o sometidos a mutagénesis partiendo de 25 pmol/ml a 25° C durante 2 horas. Se añadieron luego las mezclas a cada pozo, y se incubaron a 4° C durante 16 horas. Después de tres lavados, se añadió suero conjugado con peroxidasa anti-IgE humana diluido 1:4000 en regulador de dilución, y se incubó a 25° C durante 1,5 horas. Se obtuvo el desarrollo de una reacción colorimétrica mediante la adición de 100 µl de reactivo TMB e incubando durante 15 minutos a 25° C. Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de HCl 1 N, y se evaluó mediante lectura a 450 nm con un espectrofotómetro. Se calculó el porcentaje de

inhibición utilizando la siguiente fórmula: 100 x [(A-B)/A], donde A es la absorbancia a 450 nm en ausencia de inhibidor, y B es la absorbancia en presencia de inhibidor.

Para probar la capacidad de las proteínas híbridas de tipo silvestre y sometidas a mutagénesis, SEQ ID NO: 3 y 4, para inhibir la mezcla de Phl p 1 y Phl p 5, se aplicó el mismo protocolo con las siguientes modificaciones: la cantidad de proteína adsorbida en los pozos fue 12,5 pmol de Phl p 1 y Phl p 5, la concentración de inhibidor comenzó a partir de 0,1 nmol/ml (dilución en serie de dos veces), la dilución de la combinación de sueros positivos para Phleum pratense fue de 1:10.

Tabla. 2. Moléculas híbridas sometidas a mutagénesis y de tipo silvestre inhiben el enlazamiento de IgE con extracto de polen de Phleum pratense

Suero	Phleum pratense	Mezcla de tipo silvestre	Mezcla sometida a mutagénesis	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
1	74.7	57.6	53	67.7	49.9
2	74.5	13.7	6.3	16.9	13.2
3	82.2	43.3	25	50.9	41.2
4	78.8	16.7	10	18.9	12.5
5	79.1	59.2	56.6	68.1	54.5
6	87.5	81.1	60.4	87.9	75.8
7	91.3	52.4	30.3	53.4	39
8	78.9	67.8	53.8	69.6	63.7
9	28	62.9	39.6	60.4	51.6
10	41.6	54.9	16.3	49.3	43.2
Media del % de inhibición	71.7	51.0	35.1	54.3	44.5
Desviación estándar	20.4	21.3	20.4	22.3	19.9

Ejemplo 9 - Inmunización de ratones Balb/c

Se inmunizaron en forma subcutánea siete grupos de ratones cada uno compuesto de cinco ratones hembra de la cepa Balb/c (Charles River) con 150 pmol de alérgeno de tipo silvestre, sometido a mutagénesis o modificado genéticamente (híbrido) o 10 µg de extracto de polen de Phleum pratense mezclado con 2 mg de Al(OH3) en 200 µl de solución salina. Se realizaron otros dos refuerzos después de 21 y 42 días. Como control, cinco ratones recibieron el mismo tratamiento con un antígeno no relacionado. Dos, cinco y siete semanas después de la primera inmunización, se realizó una extracción de sangre a partir de la vena yugular de los ratones, y se controló por ELISA la respuesta de anticuerpos al inmunógeno respectivo, las moléculas de tipo silvestre y el extracto de polen de Phleum pratense. Los sueros de los ratones fueron probados individualmente o combinados con base en el tipo inmunogénico y el tiempo transcurrido desde la primera inmunización.

Ejemplo 10 - Análisis de ELISA de la respuesta específica de IgG de murino

Se adsorbieron cantidades iguales de extracto de polen de Phleum pratense (20 mg/ml), Phl p 5 o Phl p 1 de tipo silvestre, variantes de la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4 (2 µg/ml), en regulador de carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, en pozos de placas de poliestireno para el ensayo de ELISA mediante incubación a 4° C durante 16 horas. A continuación, se lavaron los pozos con solución de lavado (regulador de fosfato 60 mM, pH 6,5, que contiene 0,05% de Tween-20), y se bloquearon los sitios libres con solución de dilución (BSA al 2% en PBS 1X). Se añadieron alícuotas iguales (100 µl) de cada suero de ratón o combinación de sueros a cada pozo a una dilución de 1:1000 (Figura 5) o de 1:5000 en regulador de dilución, y se incubaron a 25° C durante 2 horas. Después de tres lavados, se añadió suero

diluido 1:8000 conjugado con peroxidasa de IgG total antirratón en regulador de dilución y se incubó a 25° C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, se obtuvo el desarrollo reacción colorimétrica mediante la adición de 100 µl de reactivo TMB e incubando durante 20 minutos a 25° C. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de HCl 1 N y se leyó a 450 nm con un espectrofotómetro. Los datos muestran la reactividad media obtenida por el análisis de los sueros de 5 ratones para cada grupo.

Ejemplo 11 - Ensayo de inhibición de ELISA. IgG contra el enlazamiento de inhibición de la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4 entre extracto de polen de Phleum pratense y las IgE en los sueros de pacientes alérgicos positivos para Phleum pratense

Se adsorbieron cantidades iguales de extracto de polen de Phleum pratense (1 µg), en regulador de carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, en pozos de placas de poliestireno para el ensayo de ELISA mediante incubación a 4° C durante 16 horas. A continuación, se lavaron los pozos con solución de lavado (regulador de fosfato 60 mM, pH 6,5, que contiene 0,05% de Tween-20), y se bloquearon los sitios libres con solución de dilución (BSA al 2% en PBS 1X). Se incubaron previamente alícuotas (100 µl) de combinaciones diluidas 1:15 de sueros de ratón recolectados después de siete semanas desde la primera inmunización a 4° C durante 16 horas. Después de tres lavados, se añadieron siete sueros humanos diluidos 1:10 positivos para Phleum pratense a 4º C durante 16 horas. Después de tres lavados se añadió suero conjugado con peroxidasa anti-IgE humana diluido 1:4000 en regulador de dilución, y se incubó a 25° C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, se obtuvo el desarrollo de una reacción colorimétrica mediante la adición de 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD), e incubando durante 20 minutos a 25° C. Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de HCl 1 N, y se leyó a 450 nm con un espectrofotómetro. Se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la siguiente fórmula: 100 x [(A-B)/A], donde A es la absorbancia a 450 nm cuando se incuba previamente el antígeno con suero de ratones no inmunizados, y B es la absorbancia en presencia de suero de ratones inmunizados.

Ejemplo 12 - Análisis estadístico

En las figuras, los resultados se expresan como los valores medios más las desviaciones estándar correspondientes.

Se usó UNISTAT 5.5 Light para el software Excel para los análisis estadísticos. Los datos fueron analizados mediante la prueba t apareada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vrtala S, (2008) "From allergen genes to new forms of allergy diagnosis and treatment". Allergy; 63(3): 299-309.

2. Toubi E., Kessel A., Blant A., Golan T.D., (1999) "Follow-up after systemic adverse reactions of immunotherapy". Allergy; 54(6): 617-620.

3. Vrtala S, Ball T, Spitzauer s, Pandjaitan B, Suphioglu C, Knox B, Sperr WR, Valent P, Kraft D, Valenta R. (1998). "Immunization with purified natural and recombinant allergens induces mouse IgG1 antibodies that recognize similar epitopes as human IgE and inhibit the human IgE-allergen interaction and allergen-induced basophil degranulation". J Immunol; 160: 6137.

4. Andersson K, Lidholm J. (2003). "Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens". Int Arch Allergy Immunol; 130: 87-107.

5. Dahl R, Stender A, Rak S. (2006). "Specific immunotherapy with SQ standardized grass allergen tablets in asthmatics with rhinoconjunctivitis". Allergy;61: 185-190.

6. Hejl C, Wurtzen PA, Kleine-Tebbe J, Johansen N, Broge L, Ipsen H. (2009) "Phleum pratense alone is sufficient for allergen-specific immunotherapy against allergy to Poideae grass pollens". Clin Exp Allergy; 39(5): 752-759.

7. Becker WM, Bufe A, Petersen A, Schlaak M. (1995). "Molecular characterization of timothy grass pollen Group V allergens" Int Arch Allergy Immunol. 107(1-3): 242-4.

8. Bufe A, Becker WM, Schramm G, Petersen A, Mamat U, Schlaak M. (1994) "Major allergen Phl p Va (Timothy grass) bears at least two different IgE-reactive epitome". J Allergy Clin Immunol; 94: 173-181.

9. Cromwell O, Hafner D, Nandy A. (2011). "Recombinant allergens for specific immunotherapy" J Allergy Clin Immunol; 127(4): 865-872.

10. Gehlar K, Rajashankar KR, Hofmann E, Betzel C, Weber W, Werner S, Bufe A. (2006) "Lysine as a critical amino

acid for IgE binding in Phl p 5b C terminus". Int Arch Allergy Immunol; 140: 285-294.

11. Schramm G, Kahlert H, Suck R, Weber B, Stuwe HT, Muller WD, Bufe A, Becker WM, Schlaak MW, Jager L, Cromwell O, Fiebig H. (1999). "Allergen engineering: variants of the Timothy grass pollen allergen Phl p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity". The Journal of Immunology; 162: 2406-2414.

12. Wald M, Kahlert H, Weber B, Jankovic M, Keller W, Cromwell O, Nandy A, Fiebig H. (2007). "Generation of a low immunoglobulin E-binding mutant of the timothy grass pollen major allergen Phl p 5a". Clin Exp Allergy; 37(3): 441-50.

13. Maglio O, Saldanha JW, Vrtala S, Spitzauer S, Valenta R, Pastore A. (2002) "A major IgE epitope-containing grass pollen allergen domain from Phl p 5 folds as a four-helix bundle" Protein Engineering; 15: 635-642.

14. Swoboda I, De Weerd N, Bhalla PL, Niederberger V, Sperr WR, Valent P, Kahlert H, Fiebig H, Verdino P, Keller W, Ebner C, Spitzauer S, Valenta R, Singh MB. (2002) "Mutants of the major ryegrass pollen allergen, Lol p 5, with reduced IgE-binding capacity: candidates for grass pollen-specific immunotherapy". Eur J Immunol; 32(1): 270-80.

15. Linhart B, Mothes-Luksch N, Vrtala S, Kneidinger M, Valent P, Valenta R. (2008). "A hypoallergenic hybrid molecule with increased immunogenicity consisting of derivatives of the major grass pollen allergens, Phl p 2 and Phl p 6". Biol Chem; 389(7): 925-33.

16. Linhart B, Hartl A, Jahn-Schmid B, Verdino P, Keller W, Krauth MT, Valent P, Horak F, Wiedermann U, Thalhamer J, Ebner C, Kraft D, Valenta R. (2005). "A hybrid molecule resembling the epitope spectrum of grass pollen for allergy vaccination" J Allergy Clin Immunol.; 115(5): 1010-6.

17. Metz-Favre C, Linhart B, Focke-Tejkl M, Purohit A, de Blay F, Valenta R, Pauli G. (2007) "Skin test diagnosis of grass pollen allergy with a recombinant hybrid molecule"; . J Allergy Clin Immunol; 120(2): 315-21.

18. Wild C, Wallner M, Hufnagl K, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H, Scheiner O, Ferreira F, Wiedermann U. (2007) "A recombinant allergen chimera as novel mucosal vaccine candidate for prevention of multisensitivities". Allergy; 62: 33-41.

19. Wang W., Malcolm BA. (2002). "Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis". Methods Mol Biol.;182: 37-43.

20. Paul. (1989), "Fundamental Immunology", Raven press, New York.Sostituire Cryz, 21. Anhoj C., Backer V., Nolte H. (2001). "Diagnostic evaluation of grass- and birch-allergic patients with oral allergy syndrome". Allergy; 56(6): 548-552.

21. Anhoj C., Backer V., Nolte H. (2001). "Diagnostic evaluation of grass- and birch-allergic patients with oral allergy

syndrome". Allergy; 56(6):548-552.

Listado de secuencias

<110> LOFARMA S.P.A.

<120> VARIANTI IPOALLERGENICHE DELL'ALLERGENE MAGGIORE PHL P 5 DI PHLEUM PRATENSE

<130> 9539MEUR

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 287

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 1

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Val Ala Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly
35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
115 120 125

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

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly
145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Phe Ser Asn Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala
245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ser Ala Val Gly
260 265 270

Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
275 280 285

<210> 2

<211> 287

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> mutante Phl p 5

<400> 2

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Val Ala Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly
20 25 30

Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly
35 40 45

Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys
50 55 60

Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe
65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser
85 90 95

Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr
100 105 110

Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val
115 120 125

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

His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Leu Ala Gly
145 150 155 160

Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
165 170 175

Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Phe Ser Asn Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu
195 200 205

Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
210 215 220

Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu
225 230 235 240

Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala
245 250 255

Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ser Ala Val Gly
260 265 270

Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
275 280 285

<210> 3

<211> 529

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> híbrido de tipo silvestre Phl p 1 - Phl p 5

<400> 3

Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
1 5 10 15

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala
20 25 30

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
35 40 45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
50 55 60

Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
65 70 75 80

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

Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala Phe
100 105 110

Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
115 120 125

Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly
130 135 140

Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
145 150 155 160

Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
165 170 175

Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu Lys Glu Ser
180 185 190

Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu Thr Gly Pro
195 200 205

Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu
210 215 220

Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Ser Ser Lys
225 230 235 240

Glu Phe Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Val
245 250 255

Ala Gly Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro
260 265 270

Ala Gly Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn
275 280 285

Ala Gly Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala
290 295 300

Asp Lys Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys
305 310 315 320

Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser
325 330 335

Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu
340 345 350

Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala
355 360 365

Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu
370 375 380

Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro
385 390 395 400

Ala Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val
405 410 415

Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val
420 425 430

Phe Glu Ala Ala Phe Ser Asn Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala
435 440 445

Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln
450 455 460

Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val
465 470 475 480

Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln
485 490 495

Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ser Ala
500 505 510

Val Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys
515 520 525

Val

<210> 4

<211> 529

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> mutante híbrido Phl p 1 - Phl p 5

<400> 4

Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
1 5 10 15

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Ala Pro Thr Gly Ala
20 25 30

Gly Pro Ala Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Ala Asp Val Asp Ala
35 40 45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
50 55 60

Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
65 70 75 80

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

Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala Phe
100 105 110

Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
115 120 125

Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly
130 135 140

Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
145 150 155 160

Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
165 170 175

Asp Ile Ala Glu Ala Gly Ala Asp Ala Trp Ile Glu Leu Lys Glu Ser
180 185 190

Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu Thr Gly Pro
195 200 205

Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu
210 215 220

Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Ser Ser Lys
225 230 235 240

Glu Phe Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Val
245 250 255

Ala Gly Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro
260 265 270

Ala Gly Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn
275 280 285

Ala Gly Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala
290 295 300

Asp Lys Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys
305 310 315 320

Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser
325 330 335

Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu
340 345 350

Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala
355 360 365

Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu
370 375 380

Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Leu
385 390 395 400

Ala Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val
405 410 415

Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val
420 425 430

Phe Glu Ala Ala Phe Ser Asn Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala
435 440 445

Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln
450 455 460

Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val
465 470 475 480

Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln
485 490 495

Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ser Ala
500 505 510

Val Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys
515 520 525

Val

<210> 5

<211> 240

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 5

Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
1 5 10 15

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala
20 25 30

Gly Pro Lys Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys
35 40 45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
50 55 60

Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
65 70 75 80

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

Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala Phe
100 105 110

Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
115 120 125

Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly
130 135 140

Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
145 150 155 160

Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
165 170 175

Asp Ile Lys Glu Lys Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu Lys Glu Ser
180 185 190

Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu Thr Gly Pro
195 200 205

Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu
210 215 220

Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Ser Ser Lys
225 230 235 240

<210> 6

<211> 240

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> mutante Phl p 1

<400> 6

```
Ile Pro Lys Val Pro Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asp
1               5                   10                  15

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Ala Pro Thr Gly Ala
            20                  25                  30

Gly Pro Ala Asp Asn Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Ala Asp Val Asp Ala
        35                  40                  45

Pro Pro Phe Ser Gly Met Thr Gly Cys Gly Asn Thr Pro Ile Phe Lys
    50                  55                  60

Ser Gly Arg Gly Cys Gly Ser Cys Phe Glu Ile Lys Cys Thr Lys Pro
65                  70                  75                  80

Glu Ala Cys Ser Gly Glu Pro Val Val Val His Ile Thr Asp Asp Asn
                85                  90                  95
```

Glu Glu Pro Ile Ala Pro Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala Phe
100 105 110

Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly
115 120 125

Glu Leu Glu Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Glu Gly
130 135 140

Thr Lys Val Thr Phe His Val Glu Lys Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu
145 150 155 160

Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly Asp Val Val Ala Val
165 170 175

Asp Ile Ala Glu Ala Gly Ala Asp Ala Trp Ile Glu Leu Lys Glu Ser
180 185 190

Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu Thr Gly Pro
195 200 205

Phe Thr Val Arg Tyr Thr Thr Glu Gly Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu
210 215 220

Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Ser Ser Lys
225 230 235 240

<210> 7

<211> 864

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 7

gccgatctag gttacggccc cgccacccca gctgccccgg tcgccggcta cacccccgcc 60

acccccgccg ccccggccgg agcggagcca gcaggtaagg cgacgaccga ggagcagaag 120

ctgatcgaga agatcaacgc cggcttcaag gcggccttgg ccgctgccgc cggcgtcccg 180

ccagcggaca agtacaggac gttcgtcgca accttcggcg cggcctccaa caaggccttc 240

gcggagggcc tctcgggcga gcccaagggc gccgccgaat ccagctccaa ggccgcgctc 300

acctccaagc tcgacgccgc ctacaagctc gcctacaaga cagccgaggg cgcgacgcct 360

gaggccaagt acgacgccta cgtcgccacc ctaagcgagg cgctccgcat catcgccggc 420

accctcgagg tccacgccgt caagcccgcg gccgaggagg tcaaggttat ccctgccggc 480

gagctgcagg tcatcgagaa ggtcgacgcc gccttcaagg tcgctgccac cgccgccaac 540

gccgcgcccg ccaacgacaa gttcaccgtc ttcgaggccg ccttcagcaa cgccatcaag 600

gcgagcacgg gcggcgccta cgagagctac aagttcatcc ccgccctgga ggccgccgtc 660

aagcaggcct acgccgccac cgtcgccacc gcgccggagg tcaagtacac cgtctttgag 720

accgcgctga aaaaggccat caccgccatg tccgaggccc agaaggctgc caagcccgct 780

gccgctgcca ccgccaccgc aacctccgcc gttggcgcgg ccgccggcgc cgccaccgcc 840

gctactggtg gctacaaagt ctga 864

<210> 8

<211> 864

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> mutante Phl p 5

<400> 8

gccgatctag gttacggccc cgccacccca gctgccccgg tcgccggcta cacccccgcc 60

acccccgccg ccccggccgg agcggagcca gcaggtaagg cgacgaccga ggagcagaag 120

ctgatcgaga agatcaacgc cggcttcaag gcggccttgg ccgctgccgc cggcgtcccg 180

ccagcggaca agtacaggac gttcgtcgca accttcggcg cggcctccaa caaggccttc 240

gcggagggcc tctcgggcga gcccaagggc gccgccgaat ccagctccaa ggccgcgctc 300

acctccaagc tcgacgccgc ctacaagctc gcctacaaga cagccgaggg cgcgacgcct 360

gaggccaagt acgacgccta cgtcgccacc ctaagcgagg cgctccgcat catcgccggc 420

accctcgagg tccacgccgt caagcccgcg gccgaggagg tcaaggttat ccttgccggc 480

gagctgcagg tcatcgagaa ggtcgacgcc gccttcaagg tcgctgccac cgccgccaac 540

gccgcgcccg ccaacgacaa gttcaccgtc ttcgaggccg ccttcagcaa cgccatcaag 600

gcgagcacgg gcggcgccta cgagagctac aagttcatcc ccgccctgga ggccgccgtc 660

aagcaggcct acgccgccac cgtcgccacc gcgccggagg tcaagtacac cgtctttgag 720

accgcgctga aaaaggccat caccgccatg tccgaggccc agaaggctgc caagcccgct 780

gccgctgcca ccgccaccgc aacctccgcc gttggcgcgg ccgccggcgc cgccaccgcc 840

gctactggtg gctacaaagt ctga 864

<210> 9

<211> 1590

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> híbrido de tipo silvestre Phl p 1 - Phl p 5

<400> 9

atccccaagg ttcccccggg tccgaacatc acggcgacct acggcgacaa gtggctcgac 60

gcgaagagca catggtacgg caagccgacg ggcgccggtc ccaaggacaa cggcggcgct 120

tgcgggtaca aggacgtgga caagcccccg ttcagcggca tgaccggctg cggcaacacc 180

cctatcttca agtccggccg cggctgcggc tcctgctttg agatcaagtg caccaagccc 240

gaggcctgct ccggcgagcc cgtggtagtc cacatcaccg acgacaacga ggagcccatc 300

gccccctacc acttcgacct ctccggccac gcgttcgggg cgatggccaa gaagggcgat 360

gagcagaagc tgcgcagcgc cggcgagctg gagctccagt tccggcgcgt caagtgcaag 420

tacccggagg gcaccaaggt gaccttccac gtggagaagg ggtccaaccc caactacctg 480

gcgctgcttg tgaagtacgt taacggcgac ggagacgtgg tggcggtgga catcaaggag 540

aagggcaagg acaagtggat cgagctcaag gagtcgtggg gagccatctg gaggatcgac 600

actcccgata agctcacggg ccccttcacc gtccggtaca ccaccgaggg cggcaccaag 660

accgaagccg aggacgtcat ccctgagggc tggaaggccg acaccagcta ctcgtccaag 720

gaattcgccg atctaggtta cggccccgcc accccagctg ccccggtcgc cggctacacc 780

cccgccaccc ccgccgcccc ggccggagcg gagccagcag gtaaggcgac gaccgaggag 840

cagaagctga tcgagaagat caacgccggc ttcaaggcgg ccttggccgc tgccgccggc 900

gtcccgccag cggacaagta caggacgttc gtcgcaacct tcggcgcggc ctccaacaag 960

gccttcgcgg agggcctctc gggcgagccc aagggcgccg ccgaatccag ctccaaggcc 1020

gcgctcacct ccaagctcga cgccgcctac aagctcgcct acaagacagc cgagggcgcg 1080

acgcctgagg ccaagtacga cgcctacgtc gccaccctaa gcgaggcgct ccgcatcatc 1140

gccggcaccc tcgaggtcca cgccgtcaag cccgcggccg aggaggtcaa ggttatccct 1200

gccggcgagc tgcaggtcat cgagaaggtc gacgccgcct tcaaggtcgc tgccaccgcc 1260

gccaacgccg cgcccgccaa cgacaagttc accgtcttcg aggccgcctt cagcaacgcc 1320

atcaaggcga gcacgggcgg cgcctacgag agctacaagt tcatccccgc cctggaggcc 1380

gccgtcaagc aggcctacgc cgccaccgtc gccaccgcgc cggaggtcaa gtacaccgtc 1440

tttgagaccg cgctgaaaaa ggccatcacc gccatgtccg aggcccagaa ggctgccaag 1500

cccgctgccg ctgccaccgc caccgcaacc tccgccgttg gcgcggccgc cggcgccgcc 1560

accgccgcta ctggtggcta caaagtctga 1590

<210> 10

<211> 1590

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> mutante híbrido Phl p 1 - Phl p 5

<400> 10

atccccaagg ttcccccggg tccgaacatc acggcgacct acggcgacaa gtggctcgac 60

gcgaagagca catggtacgg cgcgccgacg ggcgccggtc ccgcggacaa cggcggcgct 120

tgcgggtacg cagacgtgga cgcgcccccg ttcagcggca tgaccggctg cggcaacacc 180

cctatcttca agtccggccg cggctgcggc tcctgctttg agatcaagtg caccaagccc 240

gaggcctgct ccggcgagcc cgtggtagtc cacatcaccg acgacaacga ggagcccatc 300

gccccctacc acttcgacct ctccggccac gcgttcgggg cgatggccaa gaagggcgat 360

gagcagaagc tgcgcagcgc cggcgagctg gagctccagt tccggcgcgt caagtgcaag 420

tacccggagg gcaccaaggt gaccttccac gtggagaagg ggtccaaccc caactacctg 480

gcgctgcttg tgaagtacgt taacggcgac ggagacgtgg tggcggtgga catcgcggag 540

gcgggcgcgg acgcgtggat cgagctcaag gagtcgtggg gagccatctg gaggatcgac 600

actcccgata agctcacggg ccccttcacc gtccggtaca ccaccgaggg cggcaccaag 660

accgaagccg aggacgtcat ccctgagggc tggaaggccg acaccagcta ctcgtccaag 720

gaattcgccg atctaggtta cggccccgcc accccagctg ccccggtcgc cggctacacc 780

cccgccaccc ccgccgcccc ggccggagcg gagccagcag gtaaggcgac gaccgaggag 840

cagaagctga tcgagaagat caacgccggc ttcaaggcgg ccttggccgc tgccgccggc 900

gtcccgccag cggacaagta caggacgttc gtcgcaacct tcggcgcggc ctccaacaag 960

gccttcgcgg agggcctctc gggcgagccc aagggcgccg ccgaatccag ctccaaggcc 1020

gcgctcacct ccaagctcga cgccgcctac aagctcgcct acaagacagc cgagggcgcg 1080

acgcctgagg ccaagtacga cgcctacgtc gccaccctaa gcgaggcgct ccgcatcatc 1140

gccggcaccc tcgaggtcca cgccgtcaag cccgcggccg aggaggtcaa ggttatcctt 1200

gccggcgagc tgcaggtcat cgagaaggtc gacgccgcct tcaaggtcgc tgccaccgcc 1260

gccaacgccg cgcccgccaa cgacaagttc accgtcttcg aggccgcctt cagcaacgcc 1320

atcaaggcga gcacgggcgg cgcctacgag agctacaagt tcatccccgc cctggaggcc 1380

gccgtcaagc aggcctacgc cgccaccgtc gccaccgcgc cggaggtcaa gtacaccgtc 1440

tttgagaccg cgctgaaaaa ggccatcacc gccatgtccg aggcccagaa ggctgccaag 1500

cccgctgccg ctgccaccgc caccgcaacc tccgccgttg gcgcggccgc cggcgccgcc 1560

accgccgcta ctggtggcta caaagtctga 1590

<210> 11

<211> 723

<212> ADN

<213> Phleum pratense

<400> 11

atccccaagg ttcccccggg tccgaacatc acggcgacct acggcgacaa gtggctcgac 60
gcgaagagca catggtacgg caagccgacg ggcgccggtc ccaaggacaa cggcggcgct 120
tgcgggtaca aggacgtgga caagcccccg ttcagcggca tgaccggctg cggcaacacc 180
cctatcttca agtccggccg cggctgcggc tcctgctttg agatcaagtg caccaagccc 240
gaggcctgct ccggcgagcc cgtggtagtc cacatcaccg acgacaacga ggagcccatc 300
gccccctacc acttcgacct ctccggccac gcgttcgggg cgatggccaa gaagggcgat 360
gagcagaagc tgcgcagcgc cggcgagctg gagctccagt tccggcgcgt caagtgcaag 420
tacccggagg gcaccaaggt gaccttccac gtggagaagg ggtccaaccc caactacctg 480
gcgctgcttg tgaagtacgt taacggcgac ggagacgtgg tggcggtgga catcaaggag 540
aagggcaagg acaagtggat cgagctcaag gagtcgtggg gagccatctg gaggatcgac 600
actcccgata agctcacggg ccccttcacc gtccggtaca ccaccgaggg cggcaccaag 660
accgaagccg aggacgtcat ccctgagggc tggaaggccg acaccagcta ctcgtccaag 720
tga 723

<210> 12

<211> 723

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> mutante Phl p 1

<400> 12

atccccaagg ttcccccggg tccgaacatc acggcgacct acggcgacaa gtggctcgac 60
gcgaagagca catggtacgg cgcgccgacg ggcgccggtc ccgcggacaa cggcggcgct 120
tgcgggtacg cagacgtgga cgcgcccccg ttcagcggca tgaccggctg cggcaacacc 180
cctatcttca agtccggccg cggctgcggc tcctgctttg agatcaagtg caccaagccc 240
gaggcctgct ccggcgagcc cgtggtagtc cacatcaccg acgacaacga ggagcccatc 300
gccccctacc acttcgacct ctccggccac gcgttcgggg cgatggccaa gaagggcgat 360
gagcagaagc tgcgcagcgc cggcgagctg gagctccagt tccggcgcgt caagtgcaag 420
tacccggagg gcaccaaggt gaccttccac gtggagaagg ggtccaaccc caactacctg 480
gcgctgcttg tgaagtacgt taacggcgac ggagacgtgg tggcggtgga catcgcggag 540
gcgggcgcgg acgcgtggat cgagctcaag gagtcgtggg gagccatctg gaggatcgac 600
actcccgata agctcacggg ccccttcacc gtccggtaca ccaccgaggg cggcaccaag 660
accgaagccg aggacgtcat ccctgagggc tggaaggccg acaccagcta ctcgtccaag 720
tga 723

<210> 13

<211> 25

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 13

caaggttatc cttgccggcg agctg 25

<210> 14

<211> 29

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 14

cgcggtacca tccccaaggt tcccccggg 29

<210> 15

<211> 26

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 15

gcgaattcct tggacgagta gctggt 26

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Desconocido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 16

cgcgaattcg ccgatctagg ttacggccc 29

<210> 17

<211> 27

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 17

gcgggatcct cagactttgt agccacc 27

<210> 18

<211> 51

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 18

gcgggtaccc atatgcatca ccatcaccat cacatcccca aggttccccc g 51

Reivindicaciones

1. Una variante del alérgeno principal de Phleum pratense principal alérgeno Phl p 5 de tipo silvestre representada por la SEQ ID NO: 1 o de una isoforma de la misma idéntica a SEQ ID NO: 1 en al menos un 94%, preferiblemente al menos 96%, teniendo dicha variante las siguientes características:

a) reactividad reducida de IgE en comparación con dicho alérgeno Phl p 5 de la SEQ ID NO: 1;

b) una secuencia de aminoácidos que presenta una sustitución en el residuo Pro en la posición 158 de la SEQ ID NO: 1,

o, para una variante de la isoforma Phl p 5, una sustitución en la posición correspondiente de dicha isoforma, es decir, en la posición en que coincide el residuo 158 de la SEQ ID NO: 1 en una alineación de la secuencia de la isoforma Phl p 5 con la SEQ ID NO: 1.

2. La variante de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la reactividad de IgE en los sueros de pacientes alérgicos al polen de Phleum pratense se reduce en al menos 10% en comparación con el alérgeno Phl p 5 de la SEQ ID NO: 1.

3. La variante de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en donde el residuo Pro 158 se reemplaza con un aminoácido neutro, ácido o básico, que se selecciona preferiblemente de Leu, Ala, Thr, Gly, Ile, Ser, Phe, Lys, Arg, Glu, Asp, más preferiblemente de Ala, Thr, Ser, Gly, Lys, Arg, Glu, Asp.

4. La variante de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, que consiste de la SEQ ID NO: 2.

5. Una proteína híbrida que contiene una variante del alérgeno principal Phl p 5 del polen de Phleum pratense como se define en las reivindicaciones 1-4 y una variante hipoalergénica del alérgeno principal Phl p 1 de polen de Phleum pratense, opcionalmente separadas por un enlazador.

6. La proteína híbrida de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha variante hipoalergénica Phl p 1 se obtiene de la proteína de la SEQ ID NO: 5 o de una isoforma de la misma con al menos 85%, preferiblemente al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5, por sustitución de uno o más residuos de Lys en las posiciones 28, 35, 44, 48, 179, 181, 183 y/o 185 de la SEQ ID NO: 5, o en las posiciones correspondientes de dicha isoforma.

7. La proteína híbrida de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dichos residuos de Lys se reemplazan con aminoácidos neutros o polares seleccionados de Ala, Thr, Gly, Pro, Leu, Ile, Phe y Ser.

8. La proteína híbrida de acuerdo con las reivindicaciones 5-7, en donde dicha variante hipoalergénica Phl p 1 consiste en la SEQ ID NO: 6.

9. La proteína híbrida de acuerdo con las reivindicaciones 5-8, en donde dichas variantes hipoalergénicas Phl p 1 y Phl p 5 se encuentran ya sea en los extremos amino o carboxilo con una orientación de cabeza a cola.

10. La proteína híbrida de acuerdo con la reivindicación 9, en donde Phl p 1 y Phl p 5 se encuentran en el extremo amino y carboxilo, respectivamente.

11. La proteína híbrida de acuerdo con las reivindicaciones 5-10, en donde dicho enlazador se compone de una secuencia de aminoácidos que contiene de 1 a 8 aminoácidos y, preferiblemente, el dipéptido EF.

12. La proteína híbrida de acuerdo con la reivindicación 11, que consiste en la SEQ ID NO: 4.

13. Una molécula de ácido nucleico que codifica para una variante hipoalergénica Phl p 5 de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, o para una proteína híbrida de acuerdo con las reivindicaciones 5-12.

14. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13, cuya secuencia se selecciona de las SEQ ID NOs: 8 y 10.

15. Un vector de expresión que contiene la molécula de ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 13-14.

16. Una composición farmacéutica que contiene una cantidad efectiva de una variante hipoalergénica Phl p 5 de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 o de una proteína híbrida de acuerdo con las reivindicaciones 5-12, y vehículos, excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

17. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, que está en una forma adecuada para administración sublingual, intranasal, subcutánea o transdérmica.

18. La variante hipoalergénica Phl p 5 de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, o la proteína híbrida de acuerdo con las reivindicaciones 5-12 o la composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 16-17, para su uso en la inmunoterapia de sujetos alérgicos a Phleum pratense.

19. La variante hipoalergénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 o la proteína híbrida de acuerdo con las reivindicaciones 5-12, o la composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 16-17, para su uso en la inmunoterapia de sujetos alérgicos a Phleum pratense de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dichos sujetos se ven afectados por asma bronquial, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica o síndrome oral alérgico.

Figura 1

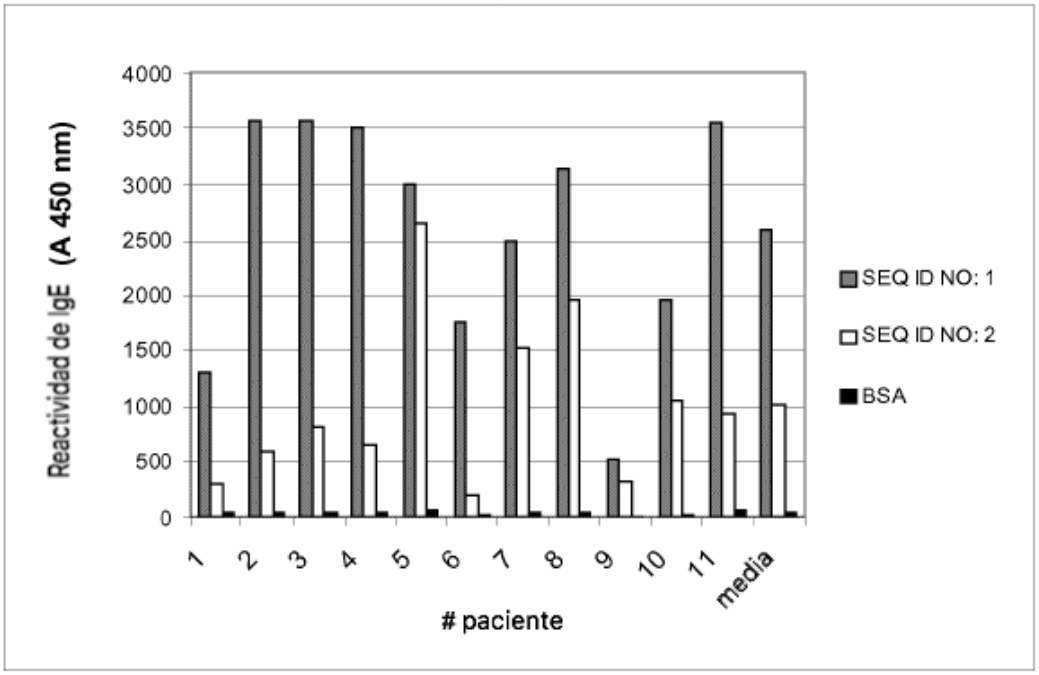


Figura 2

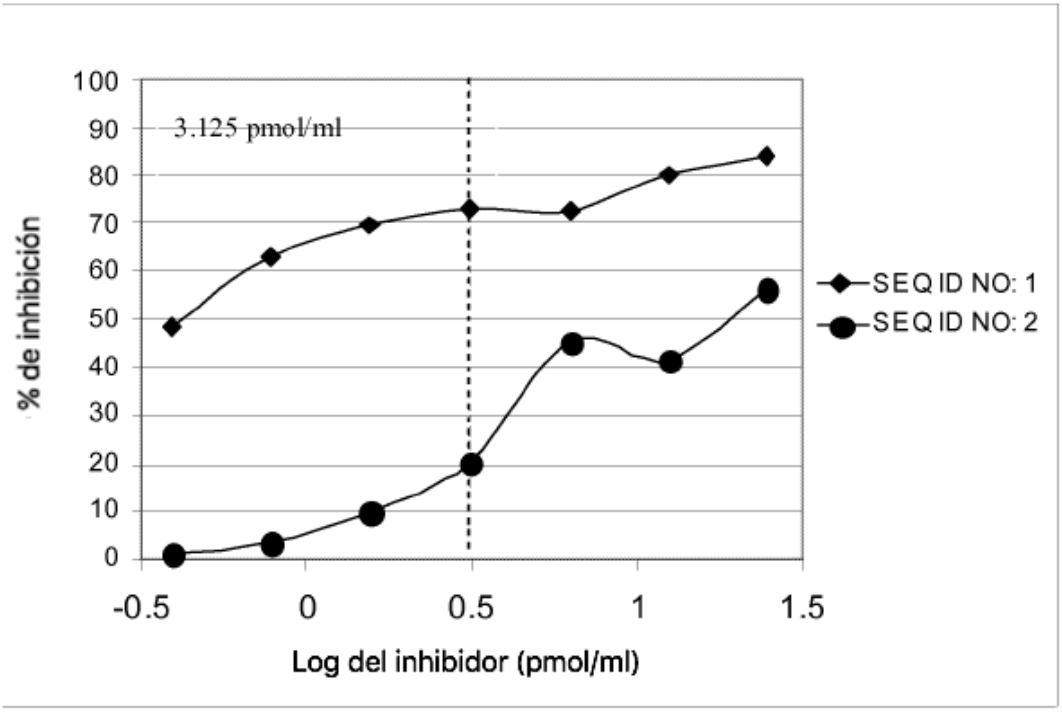


Figura 3

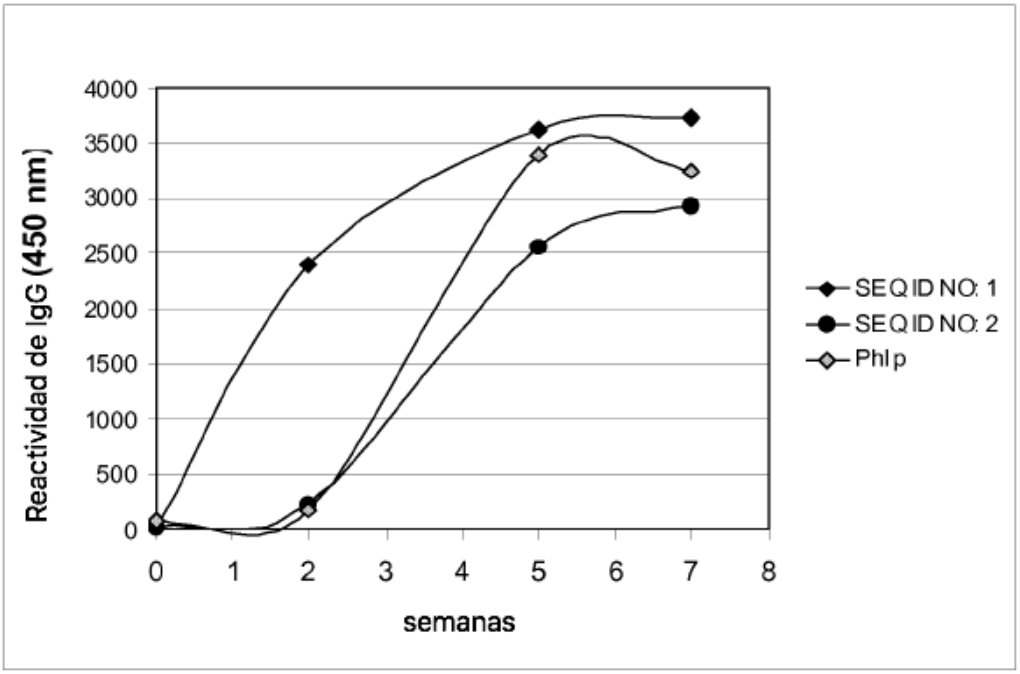


Figura 4

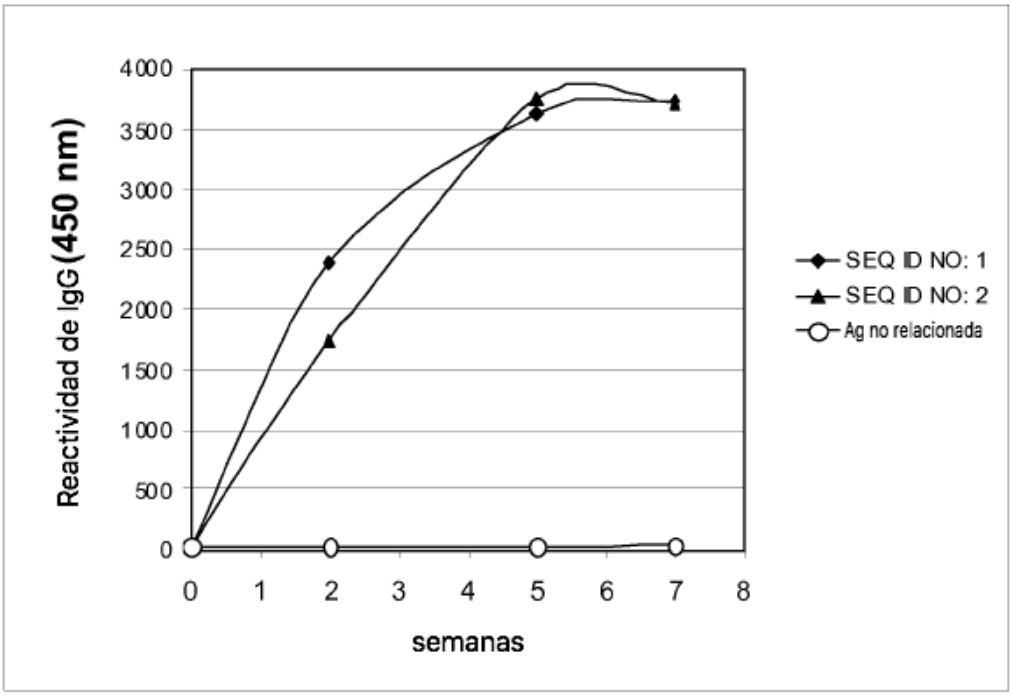


Figura 5

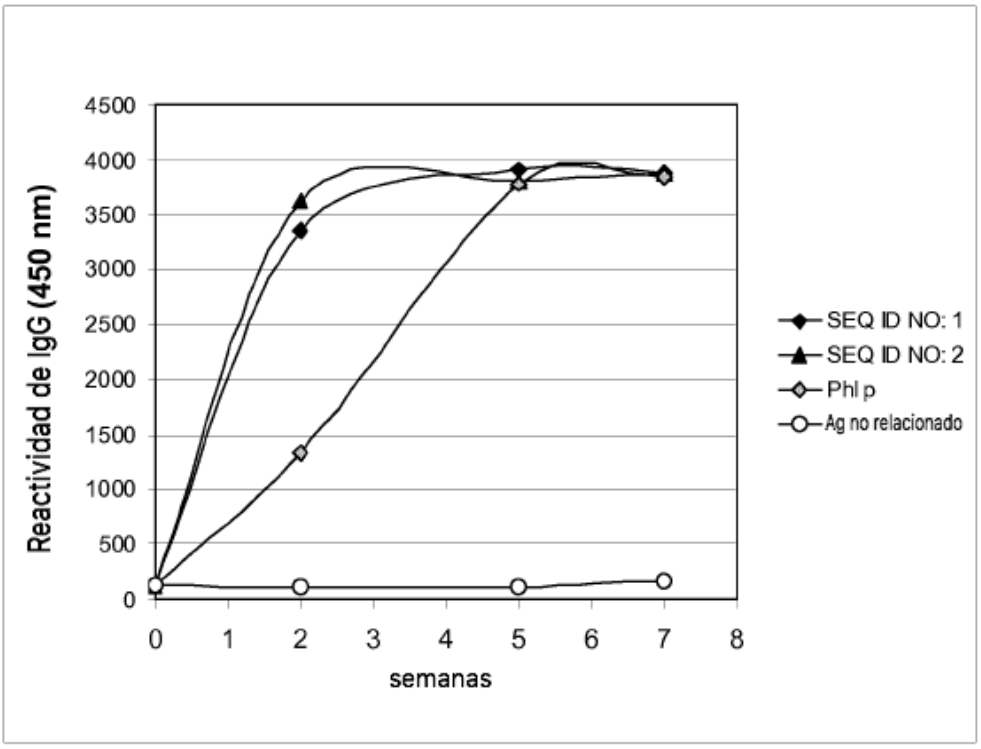


Figura 6

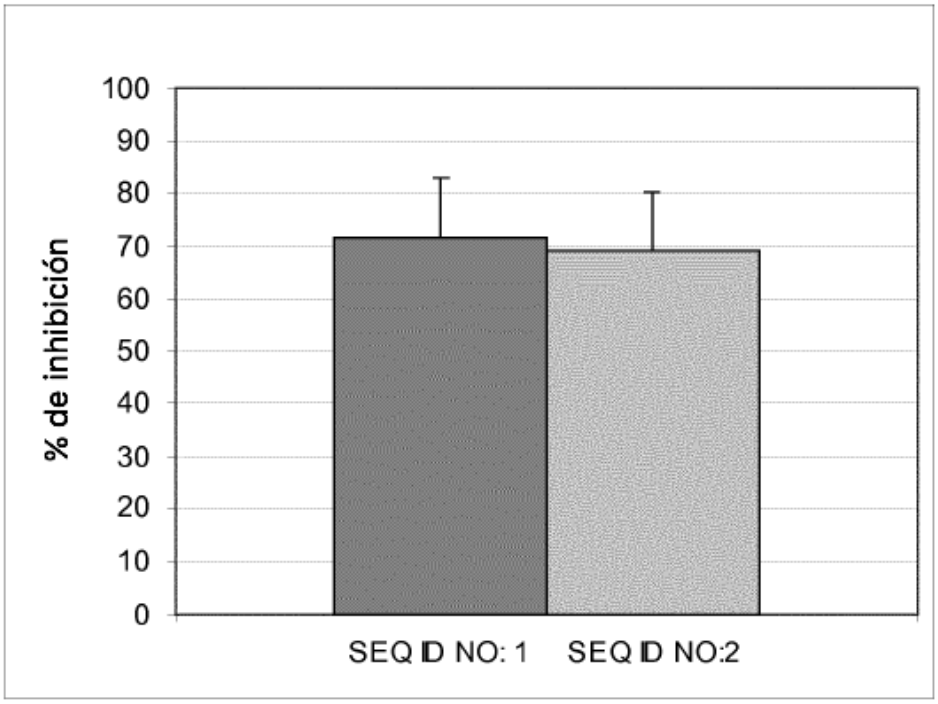


Figura 7

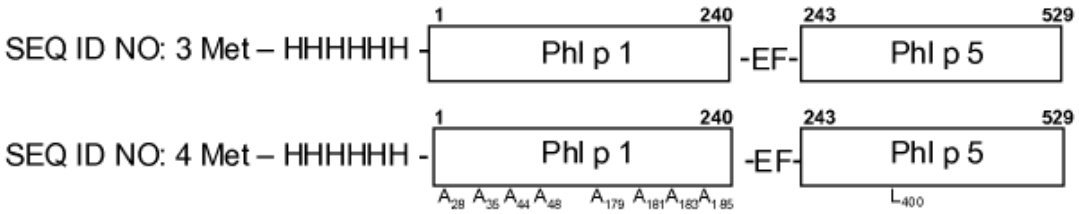


Figura 8

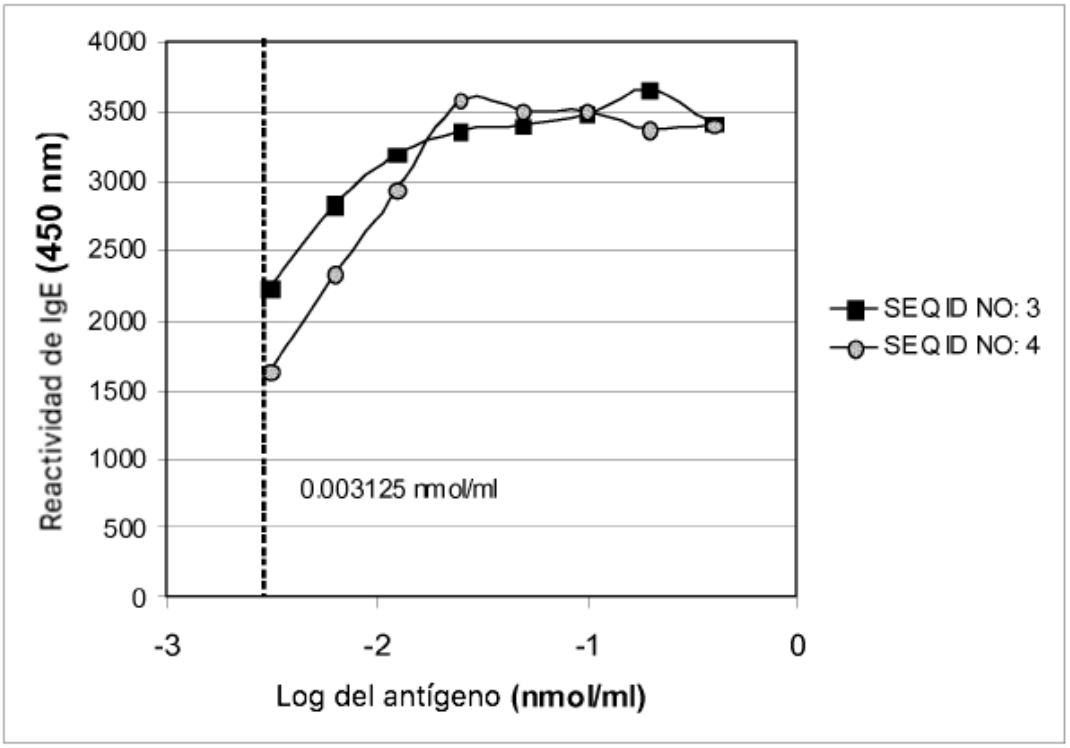


Figura 9

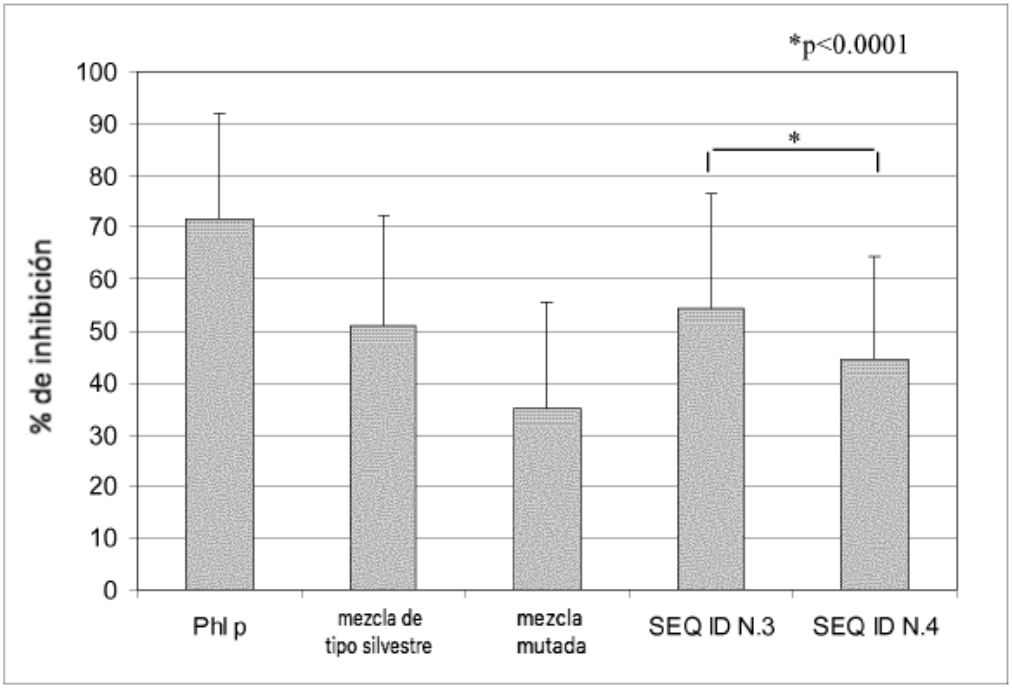


Figura 10

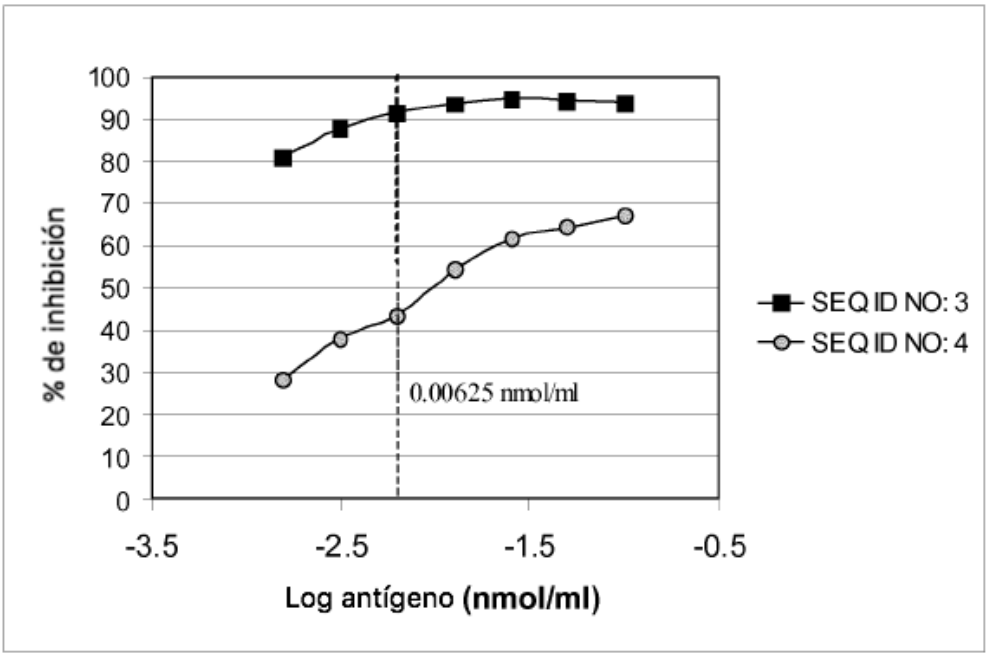


Figura 11

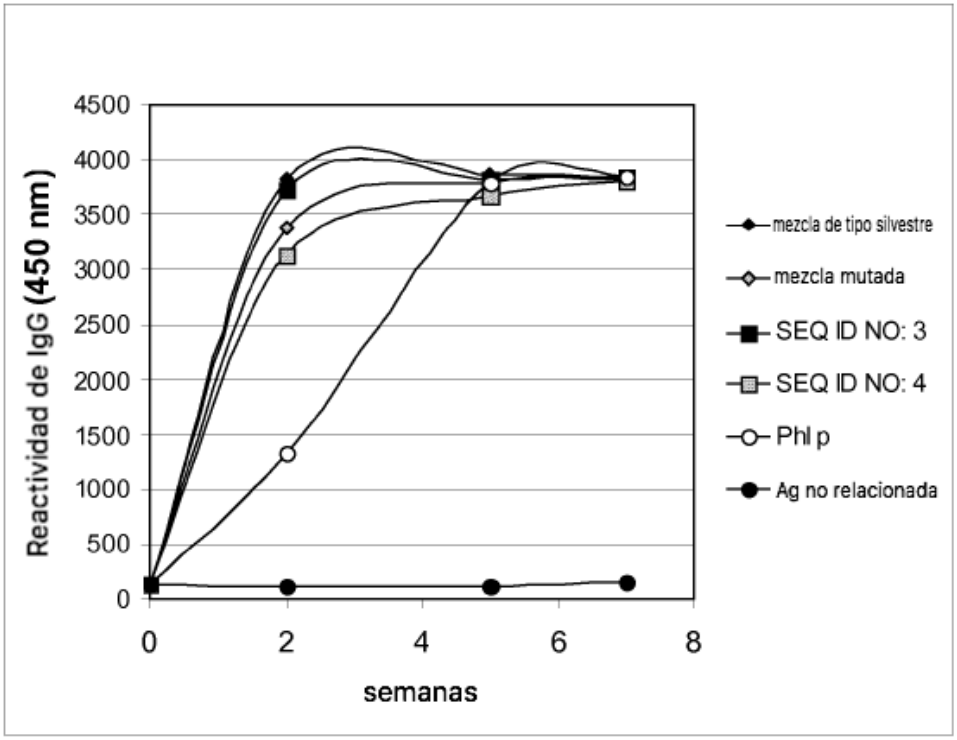

Reactividad de IgG (450 nm)
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
semanas
mezcla de tipo silvestre
mezcla mutada
SEQ ID NO: 3
SEQ ID NO: 4
Phl p
Ag no relacionada

Figura 12

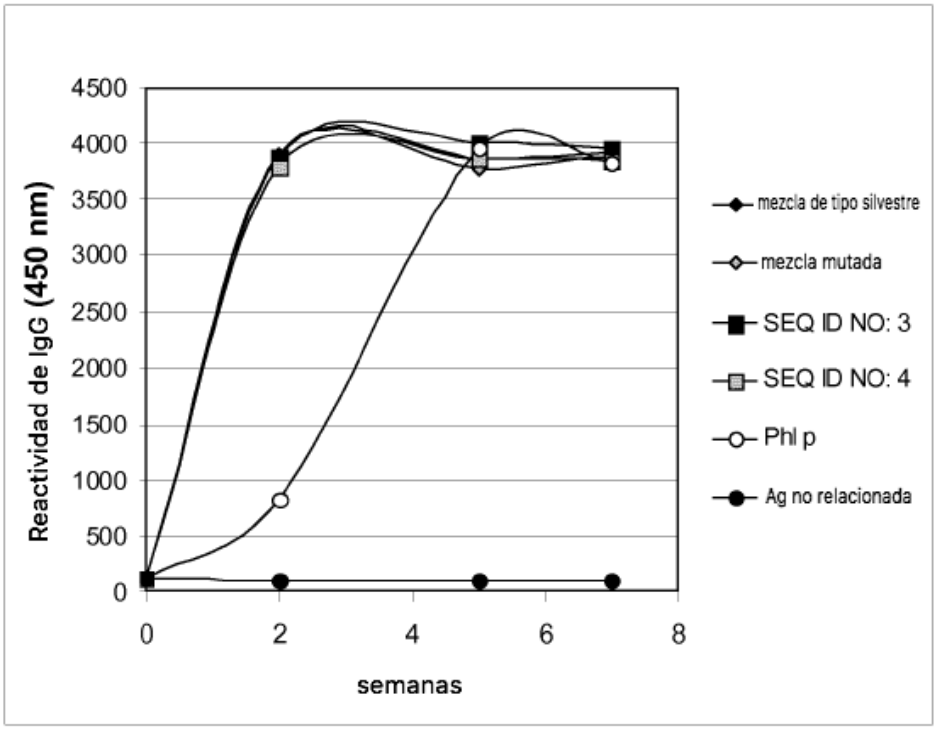

4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Reactividad de IgG (450 nm)
0
2
4
6
8
semanas
mezcla de tipo silvestre
mezcla mutada
SEQ ID NO: 3
SEQ ID NO: 4
Phl p
Ag no relacionada

Figura 13

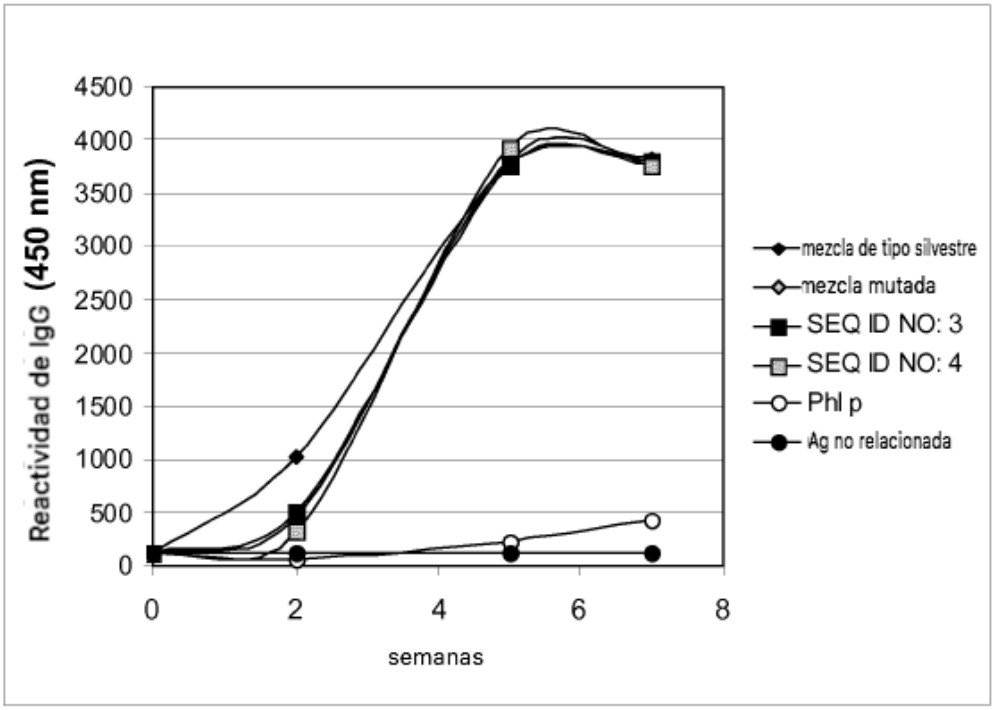
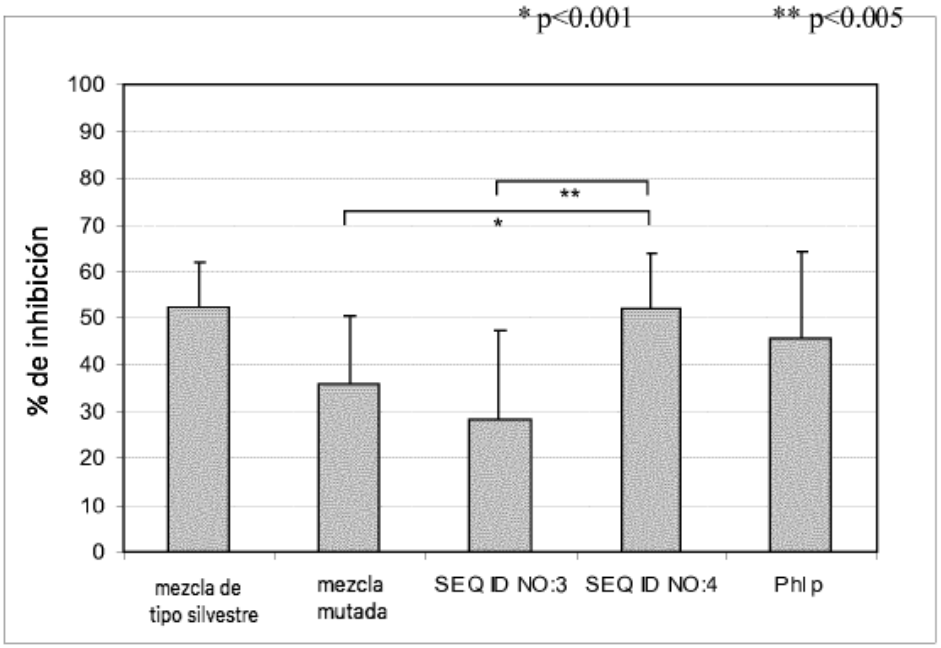

Reactividad de IgG (450 nm)
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
semanas
mezcla de tipo silvestre
mezcla mutada
SEQ ID NO: 3
SEQ ID NO: 4
Phl p
Ag no relacionada

Figura 14


* p<0.001
** p<0.005
% de inhibición
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
**
*
mezcla de tipo silvestre
mezcla mutada
SEQ ID NO:3
SEQ ID NO:4
Phl p