

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 394**

51 Int. Cl.:

A61K 39/36 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2012 PCT/EP2012/064944**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO2013017591**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2012 E 12747993 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2739308**

54 Título: **Variantes hipoalergénicas de Mal d 1, el alérgeno principal de Malus domestica**

30 Prioridad:

03.08.2011 IT MI20111489

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

24.05.2017

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:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 613 394 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 hipoalérgicas de Mal d 1, el alérgeno principal de *Malus domestica*

5 La presente invención se refiere a variantes de secuencias hipoalérgicas de la proteína Mal d 1, moléculas de ácido nucleico que las codifican, composiciones farmacéuticas que las contienen y su uso en la inmunoterapia de enfermedades alérgicas causadas por la especie *Malus domestica*.

Antecedentes de la invención

10

Las alergias son causadas por una disfunción en el sistema inmunológico, que reacciona con proteínas inofensivas, principalmente contenidas en el polen, ácaros, epitelios y alimentos, produciendo anticuerpos de la clase IgE.

15

Estimaciones recientes indican que más del 25% de la población de los países industrializados sufren estas enfermedades que, si persisten, pueden conducir a un deterioro de los síntomas (por ejemplo, aparición de asma) y sensibilización a otros alérgenos, complicando así la elección del tratamiento más adecuado.

20

Aproximadamente un tercio de todos los sujetos alérgicos en el mundo son alérgicos al polen de los árboles. En las regiones templadas, el polen de los árboles pertenecientes al orden *Fagales* (abedul, aliso, avellano, roble y hojarazo) es una de las causas principales del asma y de la rinitis alérgica. Aproximadamente el 95% de los pacientes alérgicos al polen de abedul producen anticuerpos IgE contra Bet v 1, y el 60% de estos pacientes sólo reaccionan a Bet v 1 (ADNC depositado en GenBank núm. de acc. X15877), alérgeno principal del polen de abedul (1).

25

Un alto porcentaje de los individuos alérgicos al polen de abedul (50%-93%) desarrollan reacciones alérgicas después de comer ciertos alimentos (manzanas, zanahorias, avellanas y apio). Este tipo de hipersensibilidad en los pacientes con alergia al polen de abedul, caracterizada por la alergia a frutas, nueces y verduras, se describe como "síndrome polen-alimento" (PFS). Los síntomas van desde reacciones de la mucosa del tracto digestivo superior (síndrome de alergia oral) y el tracto gastroentérico hasta urticaria y asma, y en algunos casos pueden causar shock anafiláctico. Las reacciones adversas a la fruta ocurren con mayor frecuencia con la manzana. En el caso de la polinosis causada por el polen de abedul, este síndrome está mediado principalmente por la reacción cruzada de los anticuerpos IgE originalmente inducidos por Bet v 1 (2).

35

El tratamiento de estos pacientes se basa principalmente en evitar los alérgenos alimentarios de la dieta. Para el tratamiento de la alergia a los pólenes, animales y ácaros, la inmunoterapia específica de hiposensibilización (SIT), a diferencia del tratamiento farmacológico, ha demostrado ser una forma efectiva de tratamiento etiológico que afecta positivamente a algunos parámetros inmunológicos que son la base de la enfermedad. La SIT implica administrar dosis crecientes de extractos estandarizados (vacunas) obtenidas de la sustancia que causa la enfermedad (3). De esta manera se induce gradualmente en el paciente una especie de "tolerancia inmunológica" contra esa sustancia, acompañada de una reducción, si no de la desaparición, de los síntomas alérgicos. Por el contrario, la inmunoterapia específica no se usa comúnmente para tratar las alergias alimentarias en vista del alto riesgo de inducir efectos secundarios graves, que incluyen el shock anafiláctico.

40

Aunque la reactividad cruzada entre Bet v 1 y las proteínas alimentarias homólogas subyace a las reacciones inducidas por el PFS, se ha encontrado que la SIT con polen de abedul no induce ninguna mejora en los síntomas de alergia alimentaria.

45

Esta ineficacia se ha observado en el caso de la alergia a la zanahoria, causada principalmente por el alérgeno Dau c 1, un homólogo de Bet v 1, en el que surge sensibilización primaria hacia el alérgeno de abedul y posterior sensibilización, después de comer zanahoria, hacia nuevos epítomos de Dau c 1 que no reaccionan de forma cruzada con Bet v 1 (4).

50

En el tratamiento de la alergia a la manzana, la SIT con el extracto de polen de abedul dio lugar a resultados controvertidos, a veces favorables, probablemente debido a la mayor identidad de secuencia entre Bet v 1 y Mal d 1 (60% de la secuencia de aminoácidos, frente a 40 % para Dau c 1).

55

En un estudio de 1998, en 84% de los pacientes alérgicos a abedul y manzana quienes se trataron con SIT a base de extracto de polen de abedul, una reducción significativa (50-95%) o desaparición total de los síntomas de OAS (síndrome de alergia oral) después de comer manzana ya había desaparecido después del primer año de tratamiento (5). En un estudio más reciente, publicado en 2004, la SIT con el extracto de polen de abedul condujo a una reducción significativa en la reactividad de SPT a Bet v 1 y Mal d 1 después de sólo tres meses de tratamiento. Los anticuerpos IgG4 fuertemente inducidos contra Bet v 1 exhibieron reactividad cruzada a Mal d 1, apoyando así la hipótesis de que la SIT contra la alergia al polen de abedul puede reducir además la alergia a los alimentos que contienen alérgenos homólogos de Bet v 1 (6). Otro estudio publicado en el mismo año (2004) mostró, que en los pacientes alérgicos al abedul y manzana, la SIT basada en el extracto de polen de abedul mejoró significativamente los síntomas alérgicos causados por el polen, pero no redujo la gravedad de la alergia a la manzana (7).

60

Sobre la base de los conocimientos actuales, por lo tanto no puede afirmarse con certeza que la inmunoterapia con

alérgenos de polen de abedul proporciona beneficios importantes en el caso de la alergia a los alimentos que contienen los homólogos de Bet v 1, lo cual por lo tanto debe tratarse como una enfermedad separada.

5 Uno de los alérgenos más frecuentemente implicados en la reactividad cruzada del PFS con Bet v 1 es Mal d 1, el principal alérgeno de la manzana, una fruta perteneciente a la familia Rosaceae. Mal d 1 comparte aproximadamente 60% de su secuencia de aminoácidos con Bet v 1 (identidad), y los experimentos de reactividad cruzada han demostrado la presencia de epítomos IgE y T comunes (8,9).

10 Mal d 1 (núm. de acceso Q9SYW3 o núm. AJ417551) es una proteína de 159 aminoácidos con un peso molecular de 17,7 kDa. (10). Este alérgeno pertenece a la familia PR-10 de "proteínas relacionadas con la patogénesis", es decir, proteínas ubicuas producidas por las plantas en respuesta a estreses ambientales o patológicos, cuya función se cree que se conecta con el transporte de esteroides. Mal d 1 se encuentra tanto en la cáscara como la pulpa de las manzanas. La medición del contenido de Mal d 1 en extractos proteicos de numerosas variedades de manzanas demuestra que este alérgeno está presente en concentraciones considerablemente diferentes en las diferentes variedades; la variabilidad en el contenido de Mal d 1 se encontró además en la misma variedad cultivada en diferentes lugares. Además, incluso en variedades con un bajo contenido de Mal d 1, se ha observado que la concentración de alérgenos aumenta significativamente durante la maduración y almacenamiento del fruto.

20 Mal d 1 se representa por una familia de genes con al menos dieciocho miembros, caracterizada por la presencia o ausencia de intrones en el gen. Algunos miembros se conservan altamente en las diferentes variedades de manzana (Mal d 1,01, Mal d 1,02), mientras que otros presentan mayor variabilidad (Mal d 1,04, Mal d 1,05, Mal d 1,06 A, B, C) (11). Cuando se condujo el análisis de SPT en pacientes con síndrome polen-alimento, se observó una asociación entre las variantes de proteínas codificadas por los genes Mal d 1,04 y Mal d 1,06A y una mayor alergenicidad de las variedades de manzana. Los resultados de este tipo de estudio pueden tener aplicaciones en la identificación y cultivo de variedades de manzana con menor alergenicidad para su uso como alimento o como materia prima para la inmunoterapia convencional.

30 El desarrollo de alérgenos alimentarios hipoalérgicos para su uso en la inmunoterapia específica puede representar una buena alternativa para evitar alérgenos alimentarios y permitir el tratamiento de una enfermedad que, además de implicar altos riesgos para la salud del paciente, tiene un impacto negativo significativo en la calidad de vida y puede causar desequilibrios nutricionales incapacitantes.

35 En los últimos años, se ha dedicado gran atención a desarrollar vacunas más seguras y efectivas, que consisten en proteínas recombinantes mutagenizadas a nivel de aminoácidos importantes para la unión a IgE, a saber, variantes hipoalérgicas que influyen favorablemente en la progresión natural de la enfermedad sin causar efectos adversos (12).

40 Algunos estudios de variantes hipoalérgicas de Mal d 1 o proteínas homólogas de otros frutos pertenecientes a la familia Rosaceae están disponibles en la literatura.

45 En base a la reactividad cruzada entre Bet v 1 y Mal d 1, se produjo un mutante de Mal d 1, el alérgeno principal de la manzana, por mutagénesis de sitio dirigido de cinco residuos de aminoácidos sobre la isoforma Mal d 1,0108 (T10P, I30V, T57N, T112C e I113V) seleccionados por analogía con un mutante hipoalérgico del alérgeno Bet v 1 (9). La sustitución de dichos aminoácidos redujo la actividad alérgica de Mal d 1 en 90%, como se demostró mediante el análisis SPT y DBPCFC (ensayo doble ciego controlado con placebo). El mismo mutante con cinco sustituciones de aminoácidos se probó en paralelo con el mutante análogo de Bet v 1 y con las correspondientes moléculas silvestre (13). Aunque los sueros de los pacientes alérgicos al abedul y a la manzana exhibieron mayor reactividad de IgE contra Bet v 1 en pruebas de inmunoelectrotransferencia, se observó una reducción en la unión a ambos mutantes probados. En los ensayos ELISA, en la mayoría de los sueros probados (10/14), se observó una reducción de 30 a 88% en la unión a IgE del mutante Mal d 1 en comparación con el alérgeno silvestre. Sin embargo, la mutagénesis de los cinco aminoácidos seleccionados no parece perjudicar la reactividad IgE de los epítomos principales de Mal d 1, ya que no se observó variación en la unión específica de IgE en algunos de los sueros analizados (3/14).

55 En Pru av 1, el alérgeno principal de la cereza homóloga a Mal d 1, la sustitución puntiforme de la serina 112 demostró ser crítica para el reconocimiento de la molécula por las IgE. La mutagénesis del mismo aminoácido en la prolina en el homólogo Bet v 1 confirmó la importancia de la serina 112 en la preservación de la estructura del epítomo de IgE con reactiva cruzada. La sustitución de Glu45 por triptófano en la secuencia del bucle P de Pru av 1 demostró que esta región es un epítomo IgE con reactividad cruzada a Bet v 1 (14). Se obtuvieron otras tres variantes de Pru av 1 por mutagénesis de aminoácidos en la posición 28 (Asn28Lys), 108 (Pro108Ala), o ambos. Se observó la unión de IgE reducida en hasta 80% de sueros de pacientes alérgicos a abedul y cerezo para el mutante único (Asn28Lys) y el mutante doble (Asn28Lys, Pro108Ala), mientras que se obtuvo una reducción en sólo el 12% para el mutante único sobre Pro 108, lo que sugiere que el aminoácido Asn28 en Pru av 1 se implica en un epítomo IgE. Esta asparagina está expuesta al solvente y es parte de una de las áreas propuestas como sitios principales del antígeno en la proteína homóloga Bet v 1 (15).

65 El estudio de la estructura tridimensional de Bet v 1 mediante análisis NMR y difracción de rayos X llevó a la

identificación de tres zonas con un área superior a 600 Å que pueden estar implicadas en la unión a IgE (16). Estas tres zonas expuestas en la superficie consisten en aminoácidos altamente conservados en los alérgenos homólogos expresados en especies pertenecientes al orden Fagales, y se han propuesto como epítopos potenciales de IgE responsables de la reactividad cruzada entre Bet v 1 y las proteínas homólogas de polen de las plantas. La mutagénesis de sitio dirigido de aminoácidos en estas áreas confirmó su participación en la unión a IgE. Las mutaciones en Bet v 1 que caracterizan a los dos mutantes múltiples (T28, Q32, S45, G108) y (V5, S42, S45, K78, V103, I123, E134, H156, N160), por ejemplo, modifican hasta cinco áreas diferentes distribuidas en la superficie molecular, que incluyen las tres zonas descritas anteriormente, y causan una reducción en la alergenicidad (17). Las secuencias de aminoácidos que constituyen los tres epítopos de IgE propuestos por Gajhede además se conservan en los alérgenos alimentarios homólogos a Bet v 1. Para reducir la similitud superficial con Bet v 1, los aminoácidos conservados Thr 28, Gln 32 y Ser 45 de Mal d 1, encontrados en una de las áreas descritas anteriormente, se sustituyeron con aminoácidos no presentes en Bet v 1 en las posiciones correspondientes. La sustitución de estos residuos no varió la capacidad del mutante Mal d 1 de inhibir la unión de IgE-Bet v 1 en comparación con la contraparte wt, mientras que la liberación de histamina se abolió en los basófilos de la sangre de los mismos pacientes alérgicos al abedul en un solo caso de los cinco probados (24).

Para identificar los epítopos de IgE implicados en los síntomas clínicos del síndrome de polen-alimento, se generó una proteína quimérica injertando cuatro extensiones peptídicas cortas de Mal d 1 sobre la secuencia de Bet v 1 (18). Las regiones trasplantadas incluyeron los residuos de aminoácidos previamente demostrados cruciales para la unión de IgE de los pacientes a ambos alérgenos, Bet v 1 y Mal d 1: T10, F30, S57, S112, 1113 y D125. La reactividad de IgE de la proteína quimérica se probó usando sueros de dos grupos de pacientes con alergia al abedul, sin PFS o mostrando síntomas de PFS después de la ingestión de manzana. La molécula quimérica se reconoció por las IgE de ambos grupos, pero la unión fue significativamente menor en el grupo sin PFS en comparación con los pacientes con alergia a la manzana, lo que sugiere que las secuencias injertadas en Bet v 1 se implicaron en la reactividad cruzada Bet v 1/Mal d 1 IgE.

La alergia al polen de abedul caracterizada por PFS representa un excelente modelo de estudio para identificar epítopos de IgE de reacción cruzada y que permite la producción de alérgenos recombinantes con una capacidad de unión a IgE reducida.

La posibilidad de usar moléculas multiméricas modificadas que consisten en diferentes alérgenos del mismo organismo o de diferentes organismos para la terapia específica hiposensibilizante se ha considerado fascinante desde hace tiempo. Este enfoque permite que se entregue una serie de alérgenos en una molécula única con la ventaja de producir una única preparación que contiene los alérgenos en una relación molar precisa. La asociación de Bet v 1 y Mal d 1 en una única molécula híbrida debe representar el repertorio de epítopo T de ambas moléculas, y puede inducir una fuerte respuesta protectora de IgG (17) contra ambos alérgenos. La inducción de anticuerpos IgG específicos para el alérgeno sensibilizante es uno de los factores correlacionados con el beneficio inducido por la SIT. Tales anticuerpos (protectores) pueden inhibir la unión de IgE al antígeno, alterando la conformación tridimensional de la molécula.

Algunos estudios se han realizado para investigar los efectos clínicos sobre la alergia al polen de abedul de la SIT con derivados triméricos del alérgeno Bet v 1 (19). El tratamiento indujo fuerte respuesta de anticuerpos alérgicos IgG1 e IgG4 específicos y redujo la reactividad nasal y cutánea, pero no produjo una mejora significativa en los síntomas clínicos.

Se observó además una respuesta significativa del anticuerpo IgG en los experimentos en ratones tratados con la forma wt o mutante dimérica en la posición 112 del alérgeno Dau c 1 de la zanahoria, homólogo al alérgeno Bet v 1 (20). Ambas variantes diméricas demostraron ser más antigénicas que la mezcla de las formas monoméricas correspondientes. Además, todos los sueros murinos producidos contra Dau c 1 (en forma monomérica, dimérica, wt y mutante) contuvieron anticuerpos específicos que reaccionan de forma cruzada con los epítopos reconocidos por IgE humana, lo que indica que los antígenos estructuralmente alterados como los dímeros son capaces de inducir la producción de anticuerpos específicos para los epítopos conformacionales.

El uso de una variante híbrida hipoalérgica como Bet v 1-Mal d 1 puede eliminar las dificultades causadas por las reacciones adversas graves a los alérgenos alimentarios y mejoran una respuesta tolerogénica no sólo a Bet v 1, como ocurre cuando se usa SIT con extracto de polen de abedul, sino además al alérgeno principal de la manzana.

Descripción la invención

Se ha descubierto ahora que la unión del alérgeno Mal d 1 a IgE puede reducirse modificando su secuencia mediante la sustitución de residuos de aminoácidos específicos.

De conformidad con un primer aspecto de esta, la invención proporciona una variante de la secuencia de Mal d 1 obtenida a partir del alérgeno principal de *Malus domestica*, Mal d 1 (secuencia wt sec. con núm. de ident.:1), o una isoforma de esta que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:1, preferentemente al menos 97%, dicha variante caracterizada por:

- a) reactividad reducida a IgE en comparación con la sec. con núm. de ident.:1 de Mald 1 silvestre;
 b) una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la sec. con núm. de ident.: 1, presenta al menos una, y preferentemente dos sustituciones en los residuos Asp y/o Asn en las posiciones 25 y 78 de sec. con núm. de ident.: 1 o en las posiciones correspondientes de dichas isoformas de Mal d 1.

5

Las isoformas de Mal d 1 que tienen al menos 95% de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:1 incluyen las secuencias naturales depositadas en los números de acceso Mal d 1.0201 (Uniprot Q40280) y Mal d 1.0204 (Uniprot Q9SYV4).

10

Las variantes preferidas del alérgeno Mal d 1 son aquellas en donde el residuo Asp 25 se sustituye con un aminoácido neutro, polar o básico, que se selecciona preferentemente de Ala, Thr, Gly, Pro, Leu, Ile, Ser, Phe, Lys y Arg, y con mayor preferencia de Ala, Thr, Ser, Gly, Lys y Arg, mientras que el residuo Asn 78 se sustituye con un aminoácido neutro, ácido o básico, que se selecciona preferentemente de Ala, Gly, Pro, Leu, Ile, Phe, Lys, Arg, Asp y Glu, y con mayor preferencia Ala, Gly, Lys, Arg, Asp y Glu.

15

En una modalidad preferida, la variante de conformidad con la invención que porta 2 sustituciones tiene la secuencia identificada en la sec. con núm. de ident.: 2.

20

La variante de sustitución del alérgeno Mal d 1 de conformidad con la presente invención muestra una reducción de la reactividad de IgE de al menos 10% en comparación con la molécula silvestre, preferentemente de al menos 50% y con mayor preferencia de al menos 80%, con el suero de pacientes alérgicos al polen de *Betula verrucosa*.

25

La reactividad de IgE de la variante de sec. con núm. de ident.: 2 se analizó en una mezcla de sueros de individuos alérgicos mediante ensayo ELISA (Figura 1). Cuando se incubó con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos al polen de abedul y manzana, dicha variante presentó una reducción de la reactividad de IgE (a 1 µg/ml), en comparación con el alérgeno wt Mal d 1, (sec. con núm. de ident.: 1), de 89% (sec. con núm. de ident.: 2). Otro ejemplo de una variante del alérgeno Mal d 1 con una sustitución, Asn 78 en Ala (sec. con núm. de ident.:11), exhibió una reducción del 70,9% en la unión a IgE bajo las mismas condiciones (Figura 1).

30

Estos resultados se confirmaron por experimentos de inhibición ELISA, que permiten evaluar la reactividad de epítomos homólogos de diferentes proteínas. Se encontró que con 0,3125 µg/ml de inhibidor, la unión de la proteína Mal d 1 wt (sec. con núm. de ident.: 1) a las IgE de una mezcla de sueros se inhibe en 93,3% cuando el suero se pretrata con la misma proteína, y en 25,4% cuando se preincuba con la variante de sec. con núm. de ident.: 2 (Figura 2). Bajo las mismas condiciones, la variante con sustitución única en Asn78 inhibe la unión de la sec. con núm. de ident.:1-IgE en 19,7% (Figura 2, sec. con núm. de ident.: 11).

35

Estos resultados indican claramente que la sustitución de los aminoácidos en la posición 25 y/o 78 de la sec. con núm. de ident.: 1 interfiere con el reconocimiento del alérgeno Mal d 1 por las IgE.

40

Se ha observado además que el alérgeno Mal d 1 wt de sec. con núm. de ident.: 1 y la variante hipoadérgica de sec. con núm. de ident.: 2, usada a la concentración de 0,625 µg/ml, inhiben la unión de Bet v 1 wt a las IgE de una mezcla de sueros positivos a abedul y manzana por diferentes grados de eficacia. La inhibición asciende a 94% cuando el suero se pretrata con la misma proteína Bet v 1 wt, 46% cuando se preincuba con la proteína de sec. con núm. de ident.: 1, 4,2% con la sec. con núm. de ident.: 2, y 32,1 % cuando el suero se pretrata con la variante de sustitución única de sec. con núm. de ident.: 11 (Figura 3).

45

El alérgeno Mal d 1 wt de sec. con núm. de ident.: 1 y la variante hipoadérgica de sec. con núm. de ident.: 2, usada para inmunizar ratones Balb/c, inducen una respuesta específica de IgG (Figura 4). Particularmente, los anticuerpos producidos contra la sec. con núm. de ident.: 2 reconocen además la contraparte wt de sec. con núm. de ident.: 1 (Figura 5), demostrando que la modificación de los residuos en las posiciones 25 y 78 no provocan una alteración significativa en los epítomos IgG de la molécula. Además, la inmunización con la variante de sec. con núm. de ident.: 2 induce una respuesta inmune más alta y más rápida que la obtenida con la contraparte wt de sec. con núm. de ident.:1. Por el contrario, los anticuerpos presentes en el suero de los animales inmunizados con un antígeno no relacionado no pueden reconocer los valores de Mal d 1 wt y la sec. con núm. de ident.: 2.

50

La reactividad al extracto de manzana por los anticuerpos inducidos por ratones inmunizantes con la sec. con núm. de ident.: 2 es detectable a partir de la quinta semana, y los picos en la séptima semana, cuando se produjo el reconocimiento muy débil por los anticuerpos mediante inmunización con la sec. con núm. de ident.: 1 aunque el título de anticuerpos hacia Mal d 1 wt a las siete semanas es comparable con el obtenido en los ratones inmunizados con la sec. con núm. de ident.: 2 (Figura 6).

55

En lo que respecta a la inducción de anticuerpos protectores capaces de competir en la unión entre el alérgeno y la IgE, se ha observado que los anticuerpos IgG producidos contra la sec. con núm. de ident.: 2 inhiben la unión de Mal d 1 (sec. con núm. de ident.: 1) a las IgE de pacientes alérgicos a abedul y manzana más efectivamente que la proteína wt (sec. con núm. de ident.: 1) ($p < 0,001$) (Figura 7). Experimentos de inhibición ELISA han demostrado que las IgG de ratones inmunizados con la sec. con núm. de ident.: 2 inhiben la reactividad de IgE de suero de siete pacientes en un

60

65

promedio de 66% (con valores en el intervalo de 49,6 a 82,2%), y los producidos contra la sec. con núm. de ident.: 1 en 32,3% (11,5-53%). El suero de los animales no inmunizados usados como control no causa ninguna inhibición de la unión específica IgE-Mal d 1.

5 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un péptido activo inmunológicamente correspondiente a un fragmento Mal d 1 que contiene al menos una de las sustituciones descritas anteriormente. Dicho péptido preferentemente contiene 15 a 35, y con mayor preferencia 15 a 20, residuos de aminoácidos. Como se usa en la presente descripción, la expresión "inmunológicamente activo" significa que el péptido debe ser capaz de estimular una respuesta inmune independiente a IgE.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a una proteína híbrida que contiene una variante de la secuencia del alérgeno principal de *Malus domestica* como se describe en la presente descripción y una variante hipoadérgica del alérgeno principal Bet v 1 del polen de *Betula verrucosa*, posiblemente separado por un enlazador.

15 En la proteína híbrida de conformidad con la invención, dichas variantes hipoadérgicas de Mal d 1 y Bet v 1 se sitúan indistintamente en el amino o carboxi terminal con orientación cabeza a tallo; en otras palabras, cuando el amino terminal de la proteína híbrida coincide con el amino terminal de Bet v 1 o Mal d 1, el carboxi terminal de la proteína híbrida coincide con el carboxi terminal de la proteína Mal d 1 o Bet v 1 respectivamente. De conformidad con una modalidad preferida, el amino terminal de la proteína híbrida se ocupa por Bet v 1, y el carboxi terminal por Mal d 1 (Figura 8).

20 El enlazador que separa las secuencias mutadas de Bet v 1 y Mal d 1 preferentemente consiste de una cadena de 8 aminoácidos, con mayor preferencia una cadena de dos aminoácidos, y aun con mayor preferencia de dipéptido EF (Glu-Phe).

25 En una modalidad preferida de la invención, la proteína híbrida contiene la variante hipoadérgica de Bet v 1 descrita en la solicitud de patente internacional WO2007/073907 y la solicitud de patente europea EP2172215, presentada por el mismo solicitante. Particularmente, la variante hipoadérgica de Bet v 1 contenida en la proteína híbrida de conformidad con la invención se obtiene a partir de una proteína de secuencia sec. con núm. de ident.:5 o una isoforma de esta que es al menos 94%, y preferentemente al menos 97% idéntica a dicha secuencia sec. con núm. de ident.:5, sustituyendo los residuos de Lys en la posición 54, 115 y/o 123 (en el caso de sec. con núm. de ident.:5), o en las posiciones correspondientes de dicha isoforma, con aminoácidos neutro o polar seleccionados de Ala, Thr, Gly, Pro, Leu, Ile, Phe y Ser. En una modalidad preferida, dicha variante hipoadérgica de Bet v1 es la sec. con núm. de ident.:6. Las variantes hipoadérgicas de Bet v 1 referidas aquí se describen en las dos solicitudes de patente citadas anteriormente.

30 Las isoformas de Bet v 1 que tienen más de 94% de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:5 incluyen las moléculas naturales depositadas bajo los números de acceso Bet v 1-a (Uniprot P15494), Bet v 1-j (Uniprot P43184) y Bet v 1-f (Uniprot P43179).

35 La proteína híbrida de la secuencia sec. con núm. de ident.:4 en donde la variante hipoadérgica de Bet v 1 (sec. con núm. de ident.: 6) se une a la variante hipoadérgica de Mal d 1 (sec. con núm. de ident.:2) con orientación cabeza a cola Bet v 1 (Bet v 1 → Mal d 1) a través del enlazador dipéptido EF, se prefiere particularmente.

40 La variante híbrida de conformidad con la presente invención muestra una reducción de la unión a IgE en al menos 10%, preferentemente 50%, y con mayor preferencia 70% en comparación con el híbrido wt.

45 La reactividad de IgE de la variante de sec. con núm. de ident.: 4 se analizó en una mezcla de sueros de individuos alérgicos al polen de abedul y manzana por ensayo ELISA (Figura 9). Cuando se incubó con los sueros, dicha variante exhibió una reducción media de 55,1% en la reactividad de IgE en comparación con el híbrido wt (sec. con núm. de ident.: 3).

50 Estos resultados se confirmaron por experimentos de inhibición ELISA. Se ha observado que a concentraciones iguales (1,25 µg/ml) de inhibidor, la unión entre el alérgeno con Bet v 1 (sec. con núm. de ident.: 5) adsorbido en los pocillos y la IgE específica contenida en el suero de 7 pacientes se inhibe por un promedio de 79,9% cuando el suero se pretrata con una mezcla de los alérgenos wt únicos, 53,3% cuando se preincuba con una mezcla de los dos componentes mutagenizados, 63,3% cuando se pretrata con la sec. con núm. de ident.: 3 y 32,1% cuando el suero se preincuba con la sec. con núm. de ident.: 4 (Tabla 2 y Figura 10A). La capacidad del híbrido mutante de sec. con núm. de ident.: 4 para competir en la unión Bet v 1-IgE disminuye significativamente ($p < 0,05$) en comparación con tanto la sec. con núm. de ident.: 3 como la mezcla de los dos alérgenos mutagenizados (Bet v 1 mut - sec. con núm. de ident.:6 y nnit Mal d 1 - sec. con núm. de ident.:2).

55 En la misma cantidad (1,25 µg/ml) de inhibidor, la unión entre el alérgeno Mal d 1 wt (sec. con núm. de ident.:1) adsorbido en los pocillos y la IgE específica contenida en el suero de los 7 pacientes se inhibe por un promedio de 82,8% cuando el suero se pretrata con una mezcla de los alérgenos wt únicos, 51,6% cuando se preincuba con una mezcla de los dos componentes mutagenizados, 74,6% cuando se pretrata con la sec. con núm. de ident.: 3, y 63,6% cuando el suero se preincuba con la sec. con núm. de ident.: 4 (Tabla 3 y Figura 10B). Los resultados obtenidos para

Mal d 1 son comparables con los medidos para Bet v 1, con la excepción de la sec. con núm. de ident.:4, que demostró ser más reactiva contra Mal d 1.

Se observó además que la variante hipoadérgica sec. con núm. de ident.:4, usada para inmunizar ratones Balb/c, induce la producción de las IgG específicas capaces de reconocer el alérgeno Bet v 1 presente en el extracto de *Betula verrucosa*(Figura 11). La molécula híbrida de sec. con núm. de ident.:4 induce una respuesta IgG específica similar a la inducida en ratones por el extracto de abedul, por la sec. con núm. de ident.: 3, o por una mezcla de los respectivos alérgenos wt o mutagenizados. Por el contrario, los anticuerpos presentes en los sueros de animales inmunizados con un antígeno no relacionado no pueden reconocer las sec. con núms. de ident.: 3 y 4 y mezclas de los alérgenos wt y mutante.

La variante híbrida hipoadérgica de sec. con núm. de ident.: 4 es capaz además de inducir una respuesta específica de IgG a los componentes del extracto de la pulpa de *Malus domestica*(Figura 12). Cinco semanas después de la primera inmunización, la respuesta de IgG inducida por la inmunización con la sec. con núm. de ident.: 4 es 30 veces mayor que la obtenida mediante la inmunización con cantidades equimolares de una mezcla de las dos variantes mutagenizadas únicas (mezcla mut) y 3,2 veces mayor que el alérgeno híbrido wt de sec. con núm. de ident.: 3. La inmunización con el extracto de abedul induce la producción de las IgG capaces de reconocer el Mal d 1 contenido en el extracto de manzana a partir de la quinta semana.

Además, la inmunogenicidad de la variante hipoadérgica de sec. con núm. de ident.: 2 aumenta cuando forma parte de la molécula hipoadérgica híbrida de sec. con núm. de ident.: 4. La inducción de anticuerpos IgG específicos para Mal d 1 wt (sec. con núm. de ident.: 1) Mal d 1 mutante (sec. con núm. de ident.: 2) es mucho mayor y más temprano en ratones inmunizados con la variante híbrida de sec. con núm. de ident.: 4 que en ratones inmunizados con el único alérgeno de sec. con núm. de ident.: 2. Un aumento sustancial en la inducción con la sec. con núm. de ident.: 4 ya se observa en la cuarta semana de tratamiento, mientras que se tarda al menos siete semanas en obtener la misma respuesta inmunizando a los animales con la proteína de sec. con núm. de ident.: 2 (Figuras 13-A,B).

En cuanto a la inducción de anticuerpos protectores capaces de inhibir la unión entre el alérgeno y las IgE, se ha observado que los anticuerpos IgG producidos contra la sec. con núm. de ident.: 4 inhiben la unión de Bet v 1 a (sec. con núm. de ident.:5) a las IgE de pacientes alérgicos a abedul y a manzana más efectivamente que aquellos inducidos por la mezcla de las dos variantes mutadas únicas (mezcla mut) ($p < 0,05$) (Figura 14). Los experimentos de inhibición ELISA han demostrado que las IgG producidas en ratones inmunizados con la sec. con núm. de ident.: 4 inhiben la reactividad de IgE de siete sueros de pacientes en un promedio del 87,7% (con valores en el intervalo de 77,4 a 94,7%) y los producidos contra una mezcla de las dos variantes mutagenizadas (mezcla mut) en un 82% (63,5-92,3%); los anticuerpos IgG producidos contra la mezcla de proteínas wt (mezcla en peso) inhiben la unión en un promedio del 54,7% (32,4-68,6%), y los obtenidos mediante inmunización con híbrido wt sec.con núm. de ident.: 3 en 82,2% (51,9-93,5%).

Los anticuerpos IgG inducidos en ratones inmunizados con la sec. con núm. de ident.: 4 además inhiben la unión entre Mal d 1 (sec. con núm. de ident.: 1) y las IgE de los sueros de pacientes alérgicos a abedul y manzana en un promedio de 47,5%, 9,9% si se inmunizan con una mezcla de proteínas wt, 53,5 % con una mezcla de variantes mutadas, y 59,4% con el inmunógeno de sec. con núm.: 3 (Figura 15).

El suero de los animales no inmunizados usados como control no causa ninguna inhibición de la unión específica de IgE a Bet v 1 y Mal d 1.

Las variantes de sustitución de conformidad con la invención pueden prepararse fácilmente por mutagénesis de la secuencia de ADNc de Mal d 1 (sec. con núm. de ident.:7), Bet v 1 (sec. con núm. de ident.: 8), sus isoformas o variantes naturales, o de la secuencia de ADNc del híbrido wt (sec. con núm. de ident.:9), usando técnicas conocidas por el experto (21).

Las sec. con núms. de ident.: 10 y 19 reportan las secuencias de ADNc que codifican para la variante (monomérica) de doble sustitución o la variante híbrida identificada como sec. con núms. de ident.: 2 y 4 respectivamente.

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

La invención incluye además una célula huésped procariótica o eucariótica transformada o transfectada con el vector de conformidad con la invención. Las células procariotas tales como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, o células eucarióticas tales como *Saccharomyces cerevisiae*, se usan generalmente para la clonación de vectores y la expresión de ADNc.

Las variantes hipoadérgicas de conformidad con la invención pueden producirse además como proteínas de fusión.

5 En vista de su reactividad reducida con IgE, las variantes de Mal d 1 de conformidad con la presente invención podrían emplearse convenientemente para preparar composiciones farmacéuticas (por ejemplo tabletas) para uso en la inmunoterapia de pacientes alérgicos al polen de manzana y/o *Betula verrucosa*.

10 Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una cantidad efectiva de la variante hipoadérgica de Mal d 1, opcionalmente en combinación con otros alérgenos de *Betula verrucosa*, junto con portadores, excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En una modalidad preferida, dicha composición farmacéutica está en forma de una vacuna adecuada para el tratamiento preventivo o terapéutico de enfermedades alérgicas, tales como asma bronquial y rinitis, conjuntivitis y síndrome de alergia oral. Las formas de administración sublingual, subcutánea y transdérmica son las más preferidas.

15 Los principios y métodos de vacunación son conocidos por el experto y se describen, por ejemplo, en (22).

Los ejemplos más abajo ilustran la invención en mayor detalle.

20 EJEMPLOS

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

25 Ejemplo 1 - Mutagénesis de sitio específico del ADNc que codifica para el alérgeno Mal d 1.

La mutagénesis de sitio específico del ADNc que codifica para el alérgeno Mal d 1 (sec. con núm. de ident.: 7, precedida en 5' por una secuencia que codifica seis histidinas) se llevó a cabo mediante clonación de ADNc en un vector procariótico (pBluescript, GenBank acc X52327) seguido por amplificación por PCR. Los oligonucleótidos usados como iniciadores en la reacción de PCR (Tabla 1) llevaron las sustituciones de bases adecuadas. Para cada mutagénesis, se usó un oligonucleótido complementario que se une a una región correspondiente de la cadena de ADN (21). Después de la amplificación, el molde original inalterado se degrad selectivamente con digestión enzimática catalizada por la enzima de restricción *Dpn*I. Las células de *Escherichia coli* se transformaron después con las moléculas mutagenizadas. Los clones obtenidos de colonias bacterianas únicas se secuenciaron de conformidad con Sanger para determinar la modificación de base correcta y la ausencia de mutaciones no específicas en el ADNc.

35 Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos usados como iniciadores en la mutagénesis de sitio específico. Las bases mutadas estn en negra.

Oligonucleótido	Secuencia
Mald1D25	Gcc ttt gtc ctt gct gct gac aac ctc (sec. con núm. de ident.: 12)
Mald1N78	Gtt gac gag gca gcc tac tca tac gcc (sec. con núm. de ident.: 13)

45 Ejemplo 2 - Construcción de un plásmido que codifica para la molécula híbrida silvestre Bet v 1-Mal d 1 (wtHybrid)

La molécula híbrida que contiene la información genética del híbrido silvestre Bet v 1-Mal d 1 se obtuvo por la fusión de ADNc que codifican los alérgenos únicos.

50 Los ADNc que codifican las proteínas maduras Bet v 1 y Mal d 1 se obtuvieron por separado mediante PCR usando iniciadores de oligonucleótidos **Bet v 1 DIM FW** (ggt gtt ttc aat tac gaa act g- sec. con núm. de ident.: 14) y **Bet v 1 DIM Eco RV** (Gc gaa ttc gtt gta ggc atc gga g- sec. con núm. de ident.: 15) para Bet v 1 e iniciadores de oligonucleótidos **Mal d 1 DIM Eco FW** (cgc gaa ttc ggt gtc tac aca ttt gag aac g - sec. con núm. de ident.:16) y **Ma d 1 DIM Bam RV** (Gcg gga tcc tta gtt gta tgc gtc ggg gtg - sec. con núm. de ident.: 17) para Mal d 1. Los clones de Bet v 1 de sec. con núm. de ident.: 8 y Mal d 1 de sec. con núm. de ident.: 7 se usaron como moldes.

60 El producto de amplificación obtenido a partir de Bet v 1 se reamplific sustituyendo el iniciador **Bet v 1 DIM FW** con **Bet v 1 DIM Kpn FW** (gcg ggt acc cat atg cat cac cat cac cat cac ggt gtt ttc aat tac gaa act g - sec. con núm. de ident.: 18), por lo que se insert una secuencia que codifica para seis histidinas corriente arriba de la secuencia de Bet v 1. Se insertaron un sitio Kpn I y un sitio Nde I (que contiene el ATG) en 5' del producto de amplificación Bet v 1, y se insert un sitio Eco R I en su posición 3' en lugar del codón de parada. Se insert un sitio Eco R I en lugar del ATG en el 5' de Mal d 1, y se insert un sitio Bam H I en su 3' después del codón de parada. Se purificaron los productos amplificados, se digirieron con enzimas de restricción Kpn I y Eco RI (Bet v 1), o Eco RI y Bam HI (Mal d 1) (los sitios de restricción se subrayan en los iniciadores) y posteriormente se insertaron 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 Bet v 1-Mal d 1 precedido por una

secuencia de seis histidinas. La introducción del sitio de restricción Eco R I, que es necesario para la clonación de los fragmentos, permitió la inserción de dos aminoácidos (ácido glutámico y fenilalanina) en la unión de las dos proteínas sin alterar el marco de lectura (Figura 8).

5 Los clones obtenidos a partir de las colonias bacterianas únicas se secuenciaron por el método de Sanger para verificar que el cambio de base fue correcto y la ausencia de mutaciones inespecíficas en el ADNc.

Ejemplo 3 - Construcción de un plásmido que codifica para la molécula híbrida mutante Bet v 1-Mal d 1 (MutHybrid).

10 La molécula híbrida que codifica el híbrido mutante Bet v 1-Mal d 1 se obtuvo siguiendo el método descrito en el Ejemplo 2 para la variante híbrida silvestre.

15 Los pares de oligonucleótidos usados en la reacción de PCR fueron idénticos, mientras que los ADNc usados como moldes codificaron para dos variantes hipoalergénicas cuyas secuencias se identifican en la presente descripción como sec. con núm. de ident.: 20 (para mutante Bet v 1) y sec. con núm. de ident.: 10 (mutante Mal d 1).

Los clones obtenidos a partir de las colonias bacterianas únicas se secuenciaron por el método de Sanger para verificar que el cambio de base fue correcto y la ausencia de mutaciones inespecíficas en el ADNc.

20 Ejemplo 4 - Producción de proteínas Mal d 1 y Bet v 1, mutantes respectivos, wtHybrid y MutHybrid

25 Los ADNc de Bet v 1 silvestre (sec. con núm. de ident.:8) y Mal d 1 (sec. con núm. de ident.:7), ADNc mutagenizados (sec. con núm. de ident.:20 y sec. con núm. de ident.:10), y los ADNc wt modificados y Mut Hybrid (sec. con núm. de ident.: 9 e 19), 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 conformidad con los protocolos estándar (23). Las células se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón 100 mM de NaH₂PO₄, pH 8 y lisaron mediante sonicación. Las proteínas recombinantes se separaron mediante centrifugación. El sedimento que contiene un agregado de proteína insoluble se resuspendió en tampón desnaturizante de 6 M de urea, 100 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de Tris pH 8 y se agitó durante 60 min a 20°C. Las proteínas recombinantes solubilizadas se separaron de los restos insolubles mediante centrifugación y se purificaron del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad usando columnas de agarosa a las que se unió ácido nitrilotriacético quelante de iones de níquel que interaccionan con la porción de seis histidina fusionada al alérgeno. Las proteínas purificadas se renaturalizaron mediante diálisis durante 18 horas a 4°C en una solución 5 mM de (NH₄)HCO₃.

35 Ejemplo 5 - Características de los sueros de sujetos alérgicos

Se recolectaron sueros de sujetos con una historia clínica de alergia estacional al polen de *Betula verrucosa* y reactividad RAST 3+ específica para los alérgenos Bet v 1 y Mal d 1 y se usaron en forma individual o mezclado. Se usó una mezcla de sueros de sujetos no alérgicos como control negativo.

40 Ejemplo 6 - Análisis de ELISA de reactividad de variantes de Mal d 1 a las IgE de una mezcla de suero

45 Se adsorbieron alícuotas diluidas en serie tres veces en tampón 50 mM de carbonato/bicarbonato, pH 9,6 de alérgeno wt (sec. con núm. de ident.: 1) y variantes mutagenizadas (sec. con núm. de ident.:2, sec. con núm. de ident.: 11) se absorbieron en pocillos de placas de poliestireno para el ensayo ELISA mediante incubación a 4°C durante 16 horas. Los pocillos se lavaron con solución de lavado (tampón 60 mM de fosfato, pH 6,5, que contiene Tween-20 al 0,05%) y se bloquearon con solución de dilución (suero de carnero al 25%, 1 mM de EDTA, Tween 20 al 0,05%, tiomersal al 0,01% en 150 mM de tampón fosfato, pH 7,4). Se añadieron alícuotas de 60 µl en tampón de dilución de una mezcla de sueros humanos de sujetos RAST 3+ o no alérgicos a cada muestra y se incubaron a 25°C durante 2 horas. Después de tres lavados, se añadió suero anti-IgE humana conjugada con peroxidasa (1:4000 en tampón de dilución), seguido de incubación a 25°C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, se desarrolló la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e incubó durante 15 minutos a 25°C. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de 1 N de HCl y se leyó a 450 nm usando un espectrofotómetro lector de microplacas. Los resultados se confirmaron por tres experimentos independientes. Se aplicó el mismo protocolo con algunas modificaciones para probar la reactividad de IgE de los híbridos modificados wt y Mut.

55 Se prepararon diluciones en serie de los alérgenos híbridos (sec. con núm. de ident.:3 y 4) en una relación 1:2 en tampón 50 mM de carbonato/bicarbonato, pH 9,6, a partir de 150 nM y se adsorbieron en pocillos de placas de poliestireno. Una mezcla de sueros positivos a Bet v 1 y Mal d 1 o de sujetos no alérgicos como control negativo se diluyeron 1:2,5 en solución de dilución, se añadieron (70 µl) a cada pocillo y se incubaron a 25°C durante 3 horas.

Ejemplo 7 - Ensayo de inhibición ELISA - Variantes monoméricas de Mal d 1 inhiben la unión de Mal d 1 a las IgE en el suero.

65 Se adsorbieron cantidades iguales (0,1 µg) de Mal d 1 silvestre en tampón 50 mM de carbonato/bicarbonato, pH 9,6, en pocillos de placas de poliestireno para el ensayo ELISA incubando a 4°C durante 16 horas. Se lavaron después los

5 pocillos con solución de lavado (tampón 60 mM de fosfato, pH 6,5, que contiene Tween-20 al 0,05%), y los sitios libres se bloquearon con solución de dilución (suero carnero al 15%, 1 mM de EDTA, Tween-20 al 0,05%, en tampón 150 mM de fosfato, pH 7,4). Alícuotas (100 µl) de una dilución 1:3 de suero humano mezclado positivo a Bet v 1 y Mal d 1 se preincubaron con diluciones en serie de cuatro veces de alérgenos wt o mutagenizados a partir de 5 µg/ml a 25°C durante 2 horas. Después se añadieron las mezclas a cada pocillo, y se incubaron a 4°C durante 16 horas. Después de tres lavados con tampón 0,06 M de fosfato, pH 6,5, Tween-20 al 0,05%, se añadió suero con anti-IgE humana conjugada con peroxidasa diluida 1:4000 en tampón de dilución y se incubó a 25°C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, se obtuvo el desarrollo de la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y se incubó durante 15 minutos a 25°C. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de 1 N de HCl y se evaluó leyendo a 450 nm con un espectrofotómetro. El porcentaje de inhibición se calculó usando la siguiente fórmula: $100 \times [(A-B)/A]$, 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.

15 Ejemplo 8 - Ensayo de inhibición ELISA - Variantes monoméricas de Mal d 1 inhiben la unión de Bet v 1 a las IgE en el suero.

20 Se adsorbieron cantidades iguales (0,1 µg) de Bet v 1 silvestre en tampón 50 mM de carbonato/bicarbonato, pH 9,6, en pocillos de placas de poliestireno para el ensayo ELISA incubando a 4°C durante 16 horas. Los pocillos se lavaron con solución de lavado (tampón 60 mM de fosfato, pH 6,5, que contiene Tween-20 al 0,05%) y se bloquearon los sitios libres con solución de dilución (suero de carnero al 15%, 1 mM de EDTA, Tween 20 al 0,05%, en 150 mM de tampón fosfato, pH 7,4). Se preincubaron alícuotas (100 µl) de una dilución 1:3 de sueros humanos mezclados positivos a Bet v 1 y Mal d 1 con diluciones en serie de cuatro veces de wt Bet v 1, con Mal d 1 o variantes mutagenizadas a partir de 10 µg/ml a 25°C durante 2 horas. Después se añadieron las mezclas a cada pocillo, y se incubaron a 4°C durante 16 horas. Después de tres lavados con tampón 0,06 M de fosfato, pH 6,5, Tween-20 al 0,05%, se añadió suero con anti-IgE humana conjugada con peroxidasa diluida 1:4000 en tampón de dilución y se incubó a 25°C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, se obtuvo el desarrollo de la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y se incubó durante 15 minutos a 25°C. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de 1 N de HCl y se evaluó leyendo a 450 nm con un espectrofotómetro. El porcentaje de inhibición se calculó usando la siguiente fórmula: $100 \times [(A-B)/A]$, donde A es la absorbancia a 450 nm en ausencia de inhibidor, y B es la absorbancia en presencia de inhibidor. Los valores se confirmaron por tres experimentos independientes.

30 Ejemplo 9 - Ensayo de inhibición ELISA - sec. con núm. de ident.: 3 y sec. con núm. de ident.: 4 inhiben la unión de Bet v 1 o Mal d 1 a las IgE en el suero

35 Se adsorbieron cantidades iguales (0,1 µg) de Bet v 1 o Mal d 1 silvestre en tampón 50 mM de carbonato/bicarbonato, pH 9,6, en pocillos de placas de poliestireno para el ensayo ELISA incubando a 4°C durante 16 horas. Se lavaron después los pocillos con solución de lavado (tampón 60 mM de fosfato, pH 6,5, que contiene Tween-20 al 0,05%), y los sitios libres se bloquearon con solución de dilución (suero carnero al 15%, 1 mM de EDTA, Tween-20 al 0,05%, en tampón 150 mM de fosfato, pH 7,4). Alícuotas (70 µl) de una dilución 1:3 de una mezcla de sueros humanos positivos a Bet v 1 y Mal d 1 se preincubaron con cantidades iguales (1,25 µg/ml) de variantes alérgicas silvestre, mutagenizadas o modificadas (híbridos) a 25°C durante 2 horas. Después se añadieron las mezclas a cada pocillo, y se incubaron a 4°C durante 16 horas. Después de tres lavados con tampón 0,06 M de fosfato, pH 6,5, Tween-20 al 0,05%, se añadió suero con anti-IgE humana conjugada con peroxidasa diluida 1:4000 en tampón de dilución y se incubó a 25°C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, se obtuvo el desarrollo de la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y se incubó durante 15 minutos a 25°C. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de 1 N de HCl y se evaluó leyendo a 450 nm con un espectrofotómetro. El porcentaje de inhibición se calculó usando la siguiente fórmula: $100 \times [(A-B)/A]$, donde A es la absorbancia a 450 nm en ausencia de inhibidor, y B es la absorbancia en presencia de inhibidor.

50 Tabla 2. Las moléculas híbridas silvestres y mutagenizadas inhiben la unión de Bet v 1-IgE

55

60

65

Suero	Mezcla wt	Mezcla Mut	Sec, con núm, de ident.: 3	Sec, con núm, de ident.: 4
1	97,1	88,4	93,6	90,2
2	96,6	72,8	85,1	36,4
3	90,9	52,3	76,2	35,9
4	81,2	56,5	61,7	35,9
5	91,6	41,0	50,8	7,8
6	65,2	41,8	56,6	0
7	36,8	20,6	15,9	18,2
% de inhibición medio				
	79,9	53,3	63,3	32,1
Desviación Estándar	22,02	22,2	25,77	29,53

Tabla. 3. Las moléculas híbridas silvestres y mutagenizadas inhiben la unión de Mal d 1-IgE

suero	Mezcla wt	Mezcla Mut	Sec, con núm de ident.: 3	Sec, con núm de ident.: 4
1	95,5	76,7	92,0	91,0
2	93,9	42,4	84,5	41,9
3	80,5	49,0	75,1	66,3
4	77,3	46,0	71,3	64,3
5	88,3	27,6	68,0	50,8
6	73,7	53,9	70,5	70,8
7	70,3	65,6	60,6	60,4
% de inhibición medio				
	82,8	51,6	74,6	63,6
Desviación Estándar				
	9,9	16,0	10,6	15,6

Ejemplo 10 - Inmunización de ratones Balb/c

Se inmunizaron subcutáneamente diez grupos de ratones compuestos por cinco animales hembras de cepas Balb/c (Charles River) con 150 pmol de alérgeno wt, mutagenizado o modificado (híbrido) o 10 µg de extracto de polen de *Betula verrucosa* o *Malus domestica* mezclada con 2 mg de Al(OH₃) en 200 µl de solución salina. Otros dos estímulos se realizaron después de 21 y 42 días. Como control, cinco ratones recibieron el mismo tratamiento con un antígeno no relacionado (datos no mostrados). Dos, cuatro, cinco y siete semanas después de la primera inmunización, se realizó la recogida de sangre a partir de la vena yugular de los ratones, y la respuesta de anticuerpos al respectivo inmunógeno se verificó mediante ELISA. En ratones inmunizados con la sec. con núm. de ident.: 2 y 4, además se analizó la capacidad de reconocer la proteína silvestre o extractos de polen de *Betula verrucosa* y *Malus domestica*. Se mezclaron los sueros de ratones basados en el tipo inmunogénico y el tiempo transcurrido desde la primera inmunización.

Ejemplo 11 - Análisis de la respuesta específica de IgG en ratones inmunizados mediante ensayo ELISA

Cantidades iguales de extracto de polen de *Betula verrucosa* y *Malus domestica* (20 µg/ml) o wt Bet v 1 o Mal d 1 o sec. con núm. de ident.: 2 (2 µg/ml), en tampón 50 mM de carbonato/bicarbonato, pH 9,6, se adsorbieron en pocillos de placas de poliestireno para el ensayo ELISA incubando a 4°C durante 16 horas. Los pocillos se lavaron después con solución de lavado (tampón 60 mM de fosfato, pH 6,5, que contiene Tween-20 al 0,05%) y se bloquearon los sitios libres con solución de dilución (suero de carnero al 15%, 1 mM de EDTA, Tween 20 al 0,05%, en 150 mM de tampón fosfato, pH 7,4). Se añadieron alícuotas iguales (100 µl) de cada suero de ratón o sueros mezclados a cada pocillo a una dilución 1:1000 en tampón de dilución, y se incubaron a 25°C durante 2 horas. Después de tres lavados se añadió suero

con anti-IgE humana conjugada con peroxidasa diluida 1:2000 en tampón de dilución y se incubó a 25°C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, se obtuvo el desarrollo de la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e incubando durante 20 minutos a 25°C. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de 1 N de HCl y se leyó a 450 nm con un espectrofotómetro. Los datos muestran la reactividad media obtenida mediante el análisis de los sueros de 5 ratones de cada grupo.

Ejemplo 12 - Ensayo de inhibición ELISA. Las IgG contra la sec. con núm. de ident.: 2 y sec. con núm de ident.: 4 inhiben la unión entre el Bet v 1 o Mal d 1 silvestre y las IgE en los sueros de pacientes alérgicos positivos a Bet v 1 y Mal d 1

Se adsorbieron cantidades iguales de Bet v 1 (0,1 µg) o Mal d 1 (0,2 µg) en tampón 50 mM de carbonato/bicarbonato, pH 9,6, en pocillos de placas de poliestireno para el ensayo ELISA incubando a 4°C durante 16 horas. Los pocillos se lavaron después con solución de lavado (tampón 60 mM de fosfato, pH 6,5, que contiene Tween-20 al 0,05%) y se bloquearon los sitios libres con solución de dilución (suero de carnero al 15%, 1 mM de EDTA, Tween 20 al 0,05%, en 150 mM de tampón fosfato, pH 7,4). Se incubaron a 4°C durante 16 horas alícuotas (100 µl) de mezclas diluidas 1:10 de sueros de ratón recogidos después de siete semanas desde la primera inmunización. Después de tres lavados con tampón 0,06 M de fosfato, pH 6,5, Tween-20 al 0,05%, siete sueros humanos diluidos 1:3 positivos a Bet v 1 y Mal d 1 se añadieron a 25°C durante 3 horas. Después de tres lavados con tampón 0,06 M de fosfato, pH 6,5, Tween-20 al 0,05%, se añadió suero con anti-IgE humana conjugada con peroxidasa diluida 1:4000 en tampón de dilución y se incubó a 25°C durante 1,5 horas. Después de tres lavados, se obtuvo el desarrollo de la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de reactivo TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e incubando durante 20 minutos a 25°C. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de 1 N de HCl y se leyó a 450 nm con un espectrofotómetro. El porcentaje de inhibición se calculó usando la siguiente fórmula: $100 \times [(A-B)/A]$, donde A es la absorbancia a 450 nm en ausencia de suero humano inhibidor, y B es la absorbancia en presencia de suero humano inhibidor.

Ejemplo 13 - Análisis estadístico

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

El software UNISTAT 5.5 Light de Excel se usó para los análisis estadísticos. Los datos se analizaron mediante prueba t pareada.

Referencias

- 1) Batard T., Didierlaurent A., Chabre H., y otros, (2005). "Characterization of wild-type recombinant Bet v 1 a as a candidate vaccine against birch pollen allergy". *Int Arch Allergy Immunol.* 136: 239-249.
- 2) Vieths S., Scheurer S., Ballmer-Weber B. (2002). "Current understanding of cross-reactivity of food allergen and pollen". *Ann N Y Acad Sci*, 964:47-68.
- 3) Mailing H. J., (1998) "Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment". *Allergy*, 53: 461.
- 4) Ballmer-Weber BK, Wutrich B, Wangorsch A, Fotisch K, Altmann F, Vieths S. (2001) "Carrot allergy: double-blind, placebo-controlled food challenge and identification of allergens". *J Allergy Clin Immunol* 108: 301-307.
- 5) Asero R. (1998). "Effects of birch pollen-specific immunotherapy on apple allergy in birch pollen-hypersensitive patients". *Clin Exp Allergy.*; 28(11):1368-73.
- 6) Bolhaar ST, Tiemessen MM, Zuidmeer L, van Leeuwen A, Hoffmann-Sommergruber K, Buijnzeel-Koomen CA, Taams LS, Knol EF, van Hoffen E, van Ree R, Knulst AC. (2004). "Efficacy of birch-pollen immunotherapy on cross-reactive food allergy confirmed by skin tests and double-blind food challenges". *Clin Exp Allergy.* 34(5):761-9.
- 7) Hansen KS, Khinchi MS, Skov PS, Bindslev-Jensen C, Poulsen LK, Mailing HJ (2004) "Food allergy to apple and specific immunotherapy with birch pollen". *Mol Nutr Food Res.* 48(6):441-8.
- 8) Klinglmayr E, Hauser M., Zimmermann F, Dissertori O., Lackner P, Wopfner N., Ferreira FS., Wallner M. (2009). "Identification of B-cell epitopes of Bet v 1 involved in cross-reactivity with food allergens". *Allergy*; 64:647-651.
- 9) Bolhaar STHP, Zuidmeer L, Ma Y, Ferreira F, Buijnzeel-Koomen CAFM, Hoffmann-Sommergruber K, van Ree R, Knulst AC. (2005). "A mutant of the major apple allergen, Mal d 1, demonstrating hypo-allergenicity in the target organ by double-blind placebo-controlled food challenge". *Clin Exp Allergy* 35:1638-1644.
- 10) Vanek-Krebitz M., Hoffmann-Sommergruber K., Laimer da Camara Machado M., Susani M., Ebner C., Kraft D., Scheiner O., Breiteneder H. (1995). "Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen". *BBRC* 214 (2):538-551.
- 11) Gao Z, van de Weg EW, Matos CI, Arens P, Bolhaar ST, Knulst AC, Li Y, Hoffmann-Sommergruber K, Gilissen LJ. "Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity". (2008). *Plant Biol.* 8:116.
- 12) Cromwell O, Hafner D, Nandy A. (2011). "Recombinant allergens for specific immunotherapy" *J Allergy Clin Immunol.* 127(4):865-872
- 13) Ma Y, Gademayer G, Bohle B, Bolhaar S, Knulst A, Markovic-Housley Z, Breiteneder H, Briza P, Hoffmann-Sommergruber K, Ferreira F. (2006). "Mutational analysis of amino acid positions crucial for IgE-binding epitope of the major apple (*Malus domestica*) allergen, Mal d 1". *Int Arch Allergy Immunol* 139:53-62.

- 14) Neudecker P, Lehmann K, Nerkamp J, Haase T, Wangorsch A, Fotish K, Hoffmann S, Rosch P, Vieths S, Scheurer S. (2003) "Mutational epitope analysis of Pru av 1 and Api g 1, the major allergens of cherry (prunes avium) and celery (Apium graveolens): correlating IgE reactivity with three-dimensional structure". *Biochem J.* 376:97-107.
- 5 15) Wiche R, Gubesch M, König H, Fötisch K, Hoffmann A, Wangorsch A, Scheurer S, Vieths S. (2005) "Molecular basis of pollen-related food allergy: identification of a second cross-reactive IgE epitope on Prua v 1, the major (Prunes avium) allergen". *Biochem J.* 385:319-327.
- 16) Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, Joost van Neerven RJ, Schou C, Lowenstein H, y Spangfort MD. (1996). "X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy". *Nat Struct. Biol.* 3:1040-1045.
- 10 17) Holm J, Gajhede M, Ferreras M, Henriksen A, Ipsen H, Larsen JN, Lund L, Jacobi H, Millner A, Wurtzen PA, Spangfort MD. (2004). "Allergy vaccine engineering: epitope modulation of recombinant Bet v 1 reduces IgE binding but retains protein folding pattern for induction of protective blocking-antibody responses". *The journal of Immunology.* 173:5258-5267.
- 18) Klingmayr E, Hauser M, Zimmermann F, Dissertori O, Lackner P, Wopfner N, Ferreira F, Wallner M. (2009). "Identification of B-cell epitope of Bet v 1 involved in cross-reactivity with food allergens" *Allergy*; 64:647-651
- 15 19) Purohit A, Niederberger V, Kronqvist M, Horak F, Grönneberg R, Suck R, Weber B, Fiebig H, van Hage M, Pauli G, Valenta R, Cromwell O. (2008). "Clinical effects of immunotherapy with genetically modified recombinant birch pollen Bet v 1 derivatives". *Clin Exp Allergy.* 38(9): 1514-25.
- 20 20) Reese G, Ballmer-Weber B, Wangorsch A, Randow S, Vieths S. (2007) "Allergenicity and antigenicity of wild-type and mutant, monomeric, and dimeric carrot major allergen Dau c 1: destruction of conformation, not oligomerization, is the roadmap to save allergen vaccines". *J allergy Clin Immunology* 119:944-951.
- 21) 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.
- 22) Cryz, S. J. (1991), "Immunotherapy and Vaccines", VCH Verlagsgesellschaft.
- 25 23) Asturias JA, Ibarrola I, Eseverri JL, Arilla MC, Gonzales-Rioja R, Martinez A. (2004). "PCR-based cloning and immunological characterization of Parietaria judaica pollen profilin". *J Investig Allergol Clin Immunol*, 14: 43-48.
- 24) Holm J, Ferreras M, Ipsen H, Wurtzen PA, Gajhede M, Larsen JN, Lund L, Spangfort MD. (2011). "Epitope grafting, re-creating a conformational Bet v 1 antibody epitope on the surface of the homologous apple allergen Mal d 1". *J Biol Chem.* 286:17569-78.

30 Lista de Secuencias

<110> LOFARMA S.P.A.

35 <120> Variantes hipoalergénicas de mal d 1, el alérgeno principal de malus domestica

<130> 1437PCT

<160> 20

40 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 158

45 <212> PRT

<213> Malus domestica

<400> 1

50

55

60

65

ES 2 613 394 T3

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe
 50 55 60

5

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
 65 70 75 80

10

Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
 85 90 95

15

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

20

Ile Leu Lys Ile Asn Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val
 115 120 125

25

Lys Ala Glu Gln Ile Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
 130 135 140

30

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn Glu
 145 150 155 160

35

Phe Gly Val Tyr Thr Phe Glu Asn Glu Phe Thr Ser Glu Ile Pro Pro
 165 170 175

40

Ser Arg Leu Phe Lys Ala Phe Val Leu Asp Ala Asp Asn Leu Ile Pro
 180 185 190

45

Lys Ile Ala Pro Gln Ala Ile Lys Gln Ala Glu Ile Leu Glu Gly Asp
 195 200 205

50

Gly Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Thr Phe Gly Glu Gly Ser Gln
 210 215 220

55

Tyr Gly Tyr Val Lys His Lys Ile Asp Ser Val Asp Glu Ala Asn Tyr
 225 230 235 240

60

Ser Tyr Ala Tyr Thr Leu Ile Glu Gly Asp Ala Leu Thr Asp Thr Ile
 245 250 255

65

Glu Lys Val Ser Tyr Glu Thr Lys Leu Val Ala Ser Gly Ser Gly Ser
 260 265 270

Ile Ile Lys Ser Ile Ser His Tyr His Thr Lys Gly Asp Val Glu Ile
 275 280 285

Lys Glu Glu His Val Lys Ala Gly Lys Glu Lys Ala His Gly Leu Phe
 290 295 300

ES 2 613 394 T3

5 Lys Leu Ile Glu Ser Tyr Leu Lys Gly His Pro Asp Ala Tyr Asn
 305 310 315

<210> 4
 <211> 319
 10 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> mutante híbrido betula verrucosa - malus domestica

15 <400> 4

20 Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
 1 5 10 15

25 Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys
 20 25 30

30 Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
 35 40 45

35 Gly Pro Gly Thr Ile Ala Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe
 50 55 60

40 Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
 65 70 75 80

45 Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
 85 90 95

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

55 Ile Leu Ala Ile Asn Asn Lys Tyr His Thr Ala Gly Asp His Glu Val
 115 120 125

60 Lys Ala Glu Gln Ile Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
 130 135 140

65 Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn Glu
 145 150 155 160

70 Phe Gly Val Tyr Thr Phe Glu Asn Glu Phe Thr Ser Glu Ile Pro Pro
 165 170 175

75 Ser Arg Leu Phe Lys Ala Phe Val Leu Ala Ala Asp Asn Leu Ile Pro
 180 185 190

80 Lys Ile Ala Pro Gln Ala Ile Lys Gln Ala Glu Ile Leu Glu Gly Asp
 195 200 205

ES 2 613 394 T3

Gly Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Thr Phe Gly Glu Gly Ser Gln
 210 215 220
 5
 Tyr Gly Tyr Val Lys His Lys Ile Asp Ser Val Asp Glu Ala Ala Tyr
 225 230 235 240
 10
 Ser Tyr Ala Tyr Thr Leu Ile Glu Gly Asp Ala Leu Thr Asp Thr Ile
 245 250 255
 15
 Glu Lys Val Ser Tyr Glu Thr Lys Leu Val Ala Ser Gly Ser Gly Ser
 260 265 270
 20
 Ile Ile Lys Ser Ile Ser His Tyr His Thr Lys Gly Asp Val Glu Ile
 275 280 285
 25
 Lys Glu Glu His Val Lys Ala Gly Lys Glu Lys Ala His Gly Leu Phe
 290 295 300
 30
 Lys Leu Ile Glu Ser Tyr Leu Lys Gly His Pro Asp Ala Tyr Asn
 305 310 315
 35
 <210> 5
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> betula verrucosa
 40
 Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
 1 5 10 15
 45
 Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys
 20 25 30
 50
 Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
 35 40 45
 55
 Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe
 50 55 60
 60
 Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
 65 70 75 80
 65

ES 2 613 394 T3

5 Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

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

15 Ile Leu Lys Ile Asn Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val
115 120 125

20 Lys Ala Glu Gln Ile Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

25 Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
145 150 155

30 <210> 6
<211> 159
<212> PRT
<213> Desconocida

35 Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
1 5 10 15

40 Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys
20 25 30

45 Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
35 40 45

50 Gly Pro Gly Thr Ile Ala Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe
50 55 60

55 Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
65 70 75 80

60 Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

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

ES 2 613 394 T3

5 Ile Leu Ala Ile Asn Asn Lys Tyr His Thr Ala Gly Asp His Glu Val
115 120 125

10 Lys Ala Glu Gln Ile Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
130 135 140

15 Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
145 150 155

<210> 7
<211> 477
20 <212> ADN
<213> Malus domestica

<400>7
25 ggtgtctaca catttgagaa cgagttcacc tctgagattc caccatcaag attggtcaag 60
gcctttgtcc ttgatgctga caacctcatc cccaagattg caccacaggc aatcaagcaa 120
30 gctgaaatcc ttgaaggaga cgggtggcctt ggaaccatca aaaagatcac ttttggtgaa 180
ggtagccagt acggctacgt gaagcacaag atcgactcgg ttgacgaggc aaactactca 240
tacgcctaca ctttgattga aggagatgct ttgacagaca ccattgagaa ggtctcttac 300
35 gagaccaagt tgggtggcatc tggaagtggg tccatcatca agagtatcag ccactaccac 360
accaaggggtg atggtgagat caaggaagag cacgtcaagg ctggcaaaga gaaggctcat 420
40 ggtttgttca agcttattga gagctacctt aagggccacc cgcacgcata caactaa 477

<210> 8
<211> 480
<212> ADN
45 <213> betula verrucosa

<400> 8
50 ggtgttttca attacgaaac tgagaccacc tctgttatcc cagcagctcg actggtcaag 60
gcctttatcc ttgatggcga taatctcttt ccaaagggtg caccccaagc cattagcagt 120
gttgaaaaca ttgaaggaaa tggagggcctt ggaaccatta agaagatcag ctttcccgaa 180
55 ggcttccctt tcaagtacgt gaaggacaga gttgatgagg tggaccacac aaacttcaaa 240
tacaattaca gcgtgatcga gggcgggtccc ataggcgaca cattggagaa gatctccaac 300
60 gagataaaga tagtggcaac ccctgatgga ggttccatct tgaagatcaa caacaagtac 360
cataccaaag gagaccatga ggtgaaggca gagcagatta aggcaagtaa agaaatggga 420
gagacacttt tgagggccgt tgagagctac ctcttggcac actccgatgc ctacaactaa 480
65

ES 2 613 394 T3

5 <210> 9
 <211> 960
 <212> ADN
 <213> Desconocido

10 <220>
 <223> híbrido betula verrucosa - malus domestica

<400>9

15 ggtgttttca attacgaaac tgagaccacc tctgttatcc cagcagctcg actgttcaag 60

gcctttatcc ttgatggcga taatctcttt ccaaagggtg cacccaagc cattagcagt 120

20 gttgaaaaca ttgaaggaaa tggagggcct ggaaccatta agaagatcag ctttcccgaa 180

ggcttccctt tcaagtacgt gaaggacaga gttgatgagg tggaccacac aaacttcaaa 240

tacaattaca gcgtgatcga gggcggtccc ataggcgaca cattggagaa gatctccaac 300

25 gagataaaga tagtggcaac ccctgatgga ggttccatct tgaagatcaa caacaagtac 360

cataccaaag gagacatga ggtgaaggca gagcagatta aggcaagtaa agaatggga 420

30 gagacacttt tgagggccgt tgagagctac ctcttggcac actccgatgc ctacaacgaa 480

ttcgggtgtct acacatttga gaacgagttc acctctgaga ttccaccatc aagattgttc 540

35 aaggcctttg tccttgatgc tgacaacctc atccccaaga ttgcaccca ggcaatcaag 600

caagctgaaa tccttgaagg agacggtggc cctggaacca tcaaaaagat cacttttggg 660

40 gaaggtagcc agtacggcta cgtgaagcac aagatcgact cggttgacga ggcaaactac 720

tcatacgcct acactttgat tgaaggagat gctttgacag acaccattga gaaggtctct 780

45 tacgagacca agttggtggc atctggaagt ggttccatca tcaagagtat cagccactac 840

cacaccaagg gtgatgttga gatcaaggaa gagcacgtca aggctggcaa agagaaggct 900

catggtttgt tcaagcttat tgagagctac ctttaagggcc accccgacgc atacaactaa 960

50 <210> 10
 <211> 477
 <212> ADN
 <213> Desconocido

55 <220>
 <223> malus domestica – mutante

<400> 10

60

65

ES 2 613 394 T3

5 Ile Lys Ser Ile Ser His Tyr His Thr Lys Gly Asp Val Glu Ile Lys
 115 120 125

10 Glu Glu His Val Lys Ala Gly Lys Glu Lys Ala His Gly Leu Phe Lys
 130 135 140

15 Leu Ile Glu Ser Tyr Leu Lys Gly His Pro Asp Ala Tyr Asn
 145 150 155

20 <210> 12
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Desconocido

25 <220>
 <223> oligonucleótido

30 <400>12

 gcctttgtcc ttgctgctga caacctc 27

35 <210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Desconocido

40 <220>
 <223> oligonucleótido

45 <400> 13
 ggtgacgagg cagcctactc atacgcc 27

50 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Desconocido

55 <220>
 <223> oligonucleótido

60 <400> 14
 ggtgtttca attacgaaac tg 22

65 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Desconocido

70 <220>
 <223> oligonucleótido

75 <400> 15
 gcgaattcgt tgtaggcacg ggag 24

80 <210> 16
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Desconocido

ES 2 613 394 T3

<220>
 <223> oligonucleótido

5 <400> 16
 cgccaattcg gtgtctacac attgagaac g 31

<210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Desconocido

15 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 17
 gcgggatcct tagttgatg cgtcggggtg 30

<210> 18
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Desconocido

25 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 18
 gcgggtacc atagatca ccatcacat cacgggttt tcaattaca aactg 55

30 <210> 19
 <211> 960
 <212> ADN
 <213> Desconocido

35 <220>
 <223> mutante híbrido betula verrucosa - malus domestica

<400>19

40 ggtgttttca attacgaaac tgagaccacc tctgttatcc cagcagctcg actgttcaag 60

gcctttatcc ttgatggcga taatctcttt ccaaagggtg cacccaagc cattagcagt 120

45 gttgaaaaca ttgaaggaaa tggagggcct ggaaccattg cgaagatcag ctttcccgaa 180

ggcttccctt tcaagtacgt gaaggacaga gttgatgagg tggaccacac aaacttcaaa 240

tacaattaca gcgtgatcga gggcgggtccc ataggcgaca cattggagaa gatctccaac 300

50 gagataaaga tagtggcaac ccctgatgga ggttccatct tggcgatcaa caacaagtac 360

cataccgag gagaccatga ggtgaaggca gagcagatta aggcaagtaa agaaatggga 420

55 gagacacttt tgagggccgt tgagagctac ctcttggcac actccgatgc ctacaacgaa 480

ttcgggtgtct acacatttga gaacgagttc acctctgaga ttccaccatc aagattgttc 540

60 aaggcctttg tccttgctgc tgacaacctc atccccaaga ttgcaccca ggcaatcaag 600

caagctgaaa tccttgaagg agacggtggc cctggaacca tcaaaaagat cacttttggg 660

gaaggtagcc agtacggcta cgtgaagcac aagatcgact cggttgacga ggcagcctac 720

65

ES 2 613 394 T3

5 tcatacgctt acactttgat tgaaggagat gctttgacag acaccattga gaaggtctct 780
 5 tacgagacca agttgggtggc atctggaagt ggttccatca tcaagagtat cagccactac 840
 cacaccaagg gtgatgttga gatcaaggaa gagcacgtca aggctggcaa agagaaggct 900
 10 catggtttgt tcaagcttat tgagagctac cttaagggcc accccgacgc atacaactaa 960

15 <210> 20
 <211> 480
 <212> ADN
 <213> Desconocido

20 <220>
 <223> mutante betula verrucosa
 <400> 20

gggtgttttca attacgaaac tgagaccacc tctgttatcc cagcagctcg actgttcaag 60
 gcctttatcc ttgatggcga taatctcttt ccaaagggtg caccccaagc cattagcagt 120
 gttgaaaaca ttgaaggaaa tggagggcct ggaaccattg cgaagatcag ctttcccga 180
 ggcttccctt tcaagtacgt gaaggacaga gttgatgagg tggaccacac aaacttcaaa 240
 tacaattaca gcgtgatcga gggcgggtccc ataggcgaca cattggagaa gatctccaac 300
 gagataaaga tagtggcaac ccctgatgga ggttccatct tggcgatcaa caacaagtac 360
 cataccgcag gagaccatga ggtgaaggca gagcagatta aggcaagtaa agaaatggga 420
 gagacacttt tgagggccgt tgagagctac ctcttggcac actccgatgc ctacaactaa 480

Reivindicaciones

1. Una variante de la secuencia del alérgeno principal de *Malus domestica* Mal d 1 wt de sec. con núm. de ident.:1 o de una isoforma de esta idéntica a la sec. con núm. de ident.:1 en al menos 95%, preferentemente al menos 97%, dicha variante caracterizada además porque:
 - a) muestra una reactividad de IgE reducida comparada con dicho alérgeno Mal d 1 de sec. con núm. de ident.:1;
 - b) tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la sec. con núm. de ident.: 1, presenta al menos una, preferentemente dos sustituciones en los residuos Asp y/o Asn correspondientes a las posiciones 25 y 78 de sec. con núm. de ident.: 1.
2. La variante de la secuencia de conformidad con la reivindicación 1, en donde la reactividad de IgE de los sueros de pacientes alérgicos a *Malus domestica* y/o *Betula verrucosase* reduce en al menos 10% en comparación con el alérgeno Mal d 1 de sec. con núm. de ident.: 1.
3. La variante de la secuencia de conformidad con las reivindicaciones 1-2, en donde se sustituyen tanto dichos residuos Asp como Asn.
4. La variante de la secuencia de conformidad con las reivindicaciones 1-3, en donde:
 - el residuo Asp 25 se sustituye con un aminoácido neutro, polar o básico, que se selecciona preferentemente de Ala, Thr, Gly, Pro, Leu, Ile, Ser, Phe, Lys y Arg, con mayor preferencia de Ala, Thr, Ser, Gly, Lys y Arg;
 - el residuo Asn 78 se sustituye con un aminoácido neutro, ácido o básico, que se selecciona preferentemente de Ala, Gly, Pro, Leu, Ile, Phe, Lys, Arg, Asp y Glu, con mayor preferencia de Ala, Gly, Lys, Arg, Asp y Glu.
5. La variante de la secuencia de conformidad con las reivindicaciones 1-4, que consiste en la sec. con núm. de ident.:2.
6. Una proteína híbrida que contiene una variante de la secuencia del alérgeno principal de *Malus domestica* como se define en las reivindicaciones 1-5 y una variante hipoalérgica del alérgeno principal de Bet v 1 del polen de *Betula verrucosa*, opcionalmente separada mediante un enlazador, en donde dicha variante hipoalérgica de Bet v 1 se obtiene a partir de la proteína de sec. con núm. de ident.:5 o a partir de una isoforma de esta con al menos 94%, preferentemente al menos 97% de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:5, mediante la sustitución de uno o más residuos Lys en las posiciones 54, 115 y/o 123 de la sec. con núm. de ident.:5, o en las posiciones correspondientes de dicha isoforma.
7. La proteína híbrida de conformidad con la reivindicación 6, en donde dichos residuos Lys se sustituyen con aminoácidos neutros o polares seleccionados a partir de Ala, Thr, Gly, Pro, Leu, Ile, Phe y Ser.
8. La proteína híbrida de conformidad con las reivindicaciones 6-7, en donde dicha variante hipoalérgica de Bet v 1 consiste en la sec. con núm. de ident.:6.
9. La proteína híbrida de conformidad con las reivindicaciones 6-8, en donde dichas variantes hipoalérgicas de Mal d 1 y Bet v 1 se encuentran ya sea en los extremos amino o carboxilo.
10. La proteína híbrida de conformidad con la reivindicación 9, en donde Bet v 1 y Mal d 1 se encuentran en el extremo amino y carboxilo respectivamente.
11. La proteína híbrida de conformidad con las reivindicaciones 6-10, en donde dicho enlazador consiste en una secuencia de aminoácidos que contiene de 1 a 8 aminoácidos.
12. La proteína híbrida de conformidad con la reivindicación 11, que consiste en la sec. con núm. de ident.:4.
13. Una molécula de ácido nucleico que codifica para una variante hipoalérgica Mal d 1 de conformidad con las reivindicaciones 1-5, o para una proteína híbrida de conformidad con las reivindicaciones 6-12.
14. Una molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 13, cuya secuencia se selecciona de las sec. con núms. de ident.:10 y 19.
15. Un vector de expresión que contiene la molécula de ácido nucleico de conformidad con las reivindicaciones 13-14.
16. Una composición farmacéutica que contiene una cantidad efectiva de una variante hipoalérgica de Mal d 1 de conformidad con las reivindicaciones 1-5 o una proteína híbrida de conformidad con las reivindicaciones 6-12, y portadores, excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

17. La composición de conformidad con la reivindicación 16, que está en una forma adecuada para la administración sublingual, subcutánea o transdérmica.
- 5 18. La variante hipoalergénica Mal d 1 de conformidad con las reivindicaciones 1-5, o la proteína híbrida de conformidad con las reivindicaciones 6-12 o la composición farmacéutica de conformidad con las reivindicaciones 16-17, para su uso en la inmunoterapia de los sujetos alérgicos al polen de *Malus domestica* y/o *Betula verrucosa*.
- 10 19. La variante hipoalergénica o proteína híbrida o composición farmacéutica para uso en la inmunoterapia de sujetos alérgicos al polen de *Malus domestica* y/o *Betula verrucosa* de conformidad con la reivindicación 18, en donde dichos sujetos sufren de asma bronquial, rinitis, conjuntivitis o síndrome de alergia oral.

Figura 1

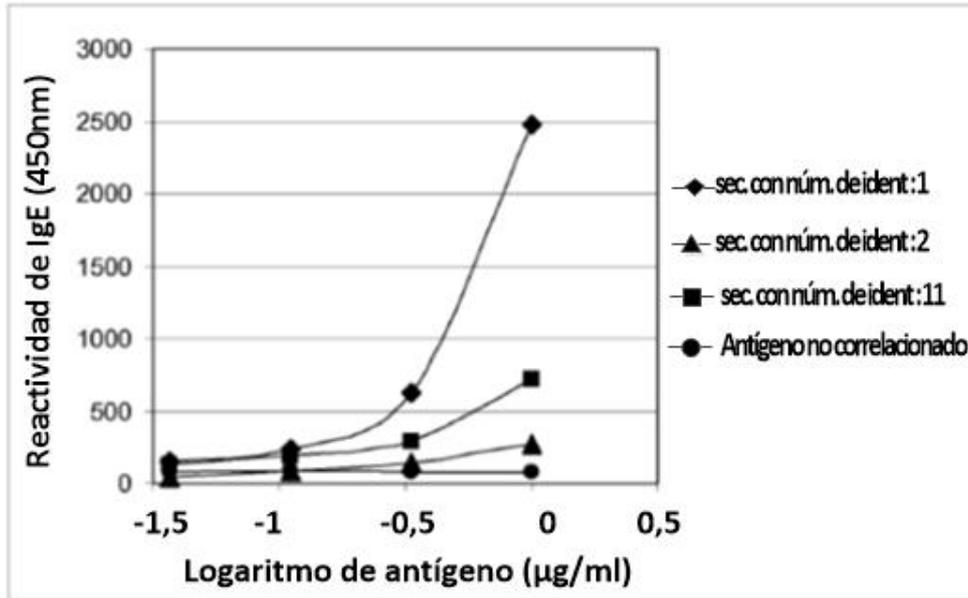


Figura 2

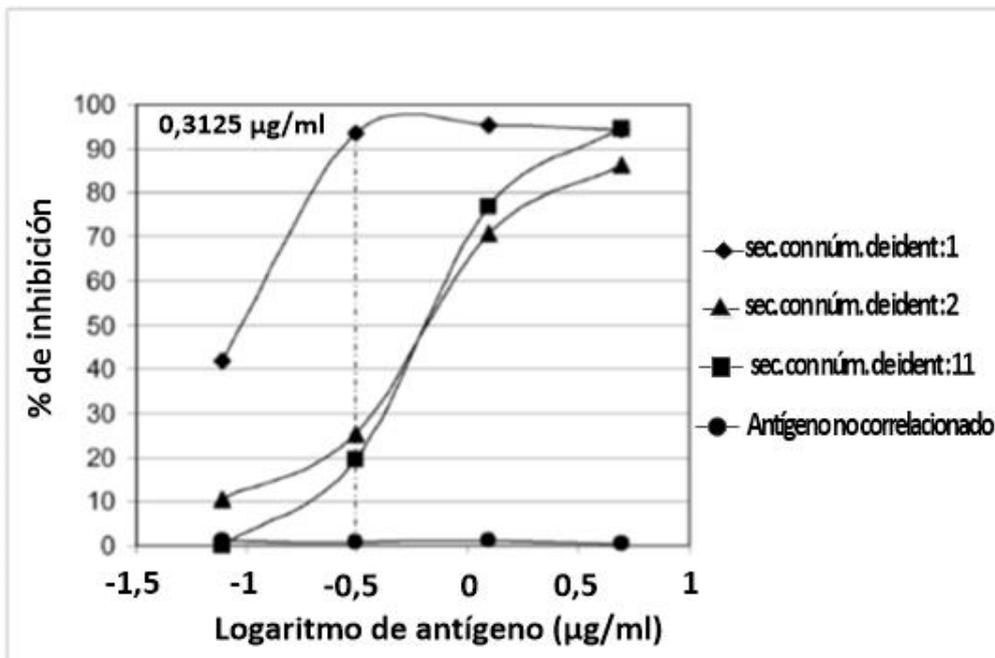


Figura 3

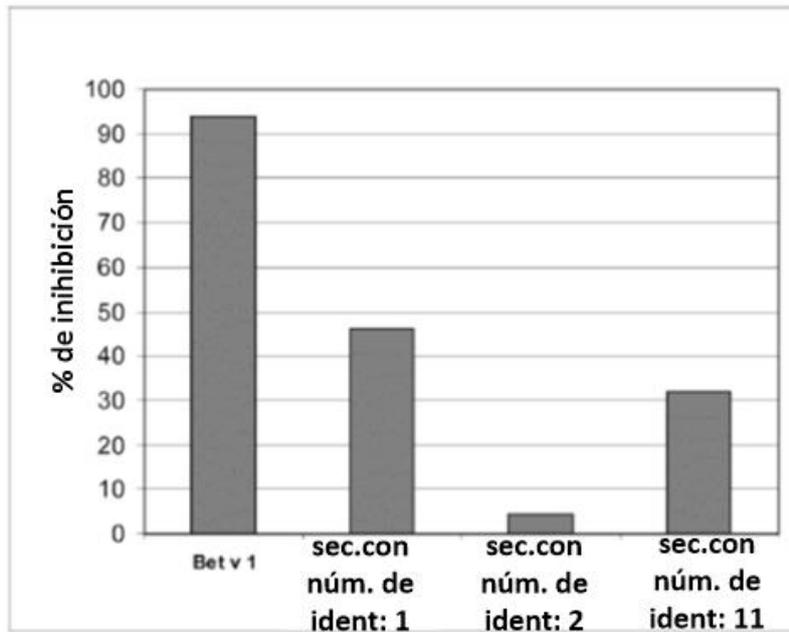


Figura 4

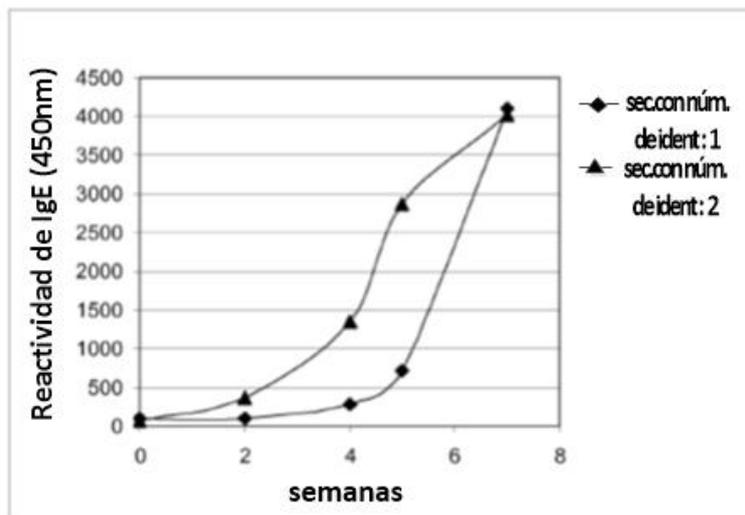


Figura 5

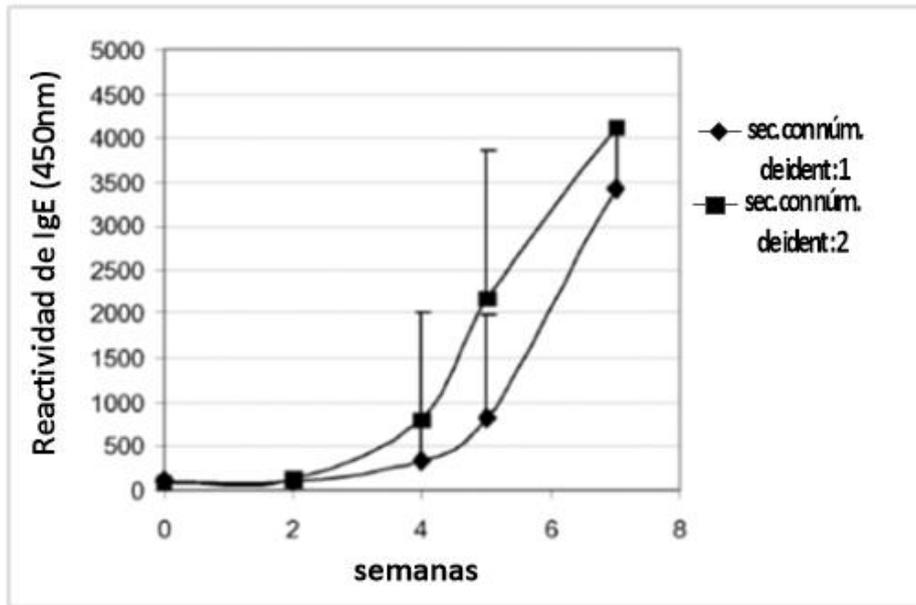


Figura 6

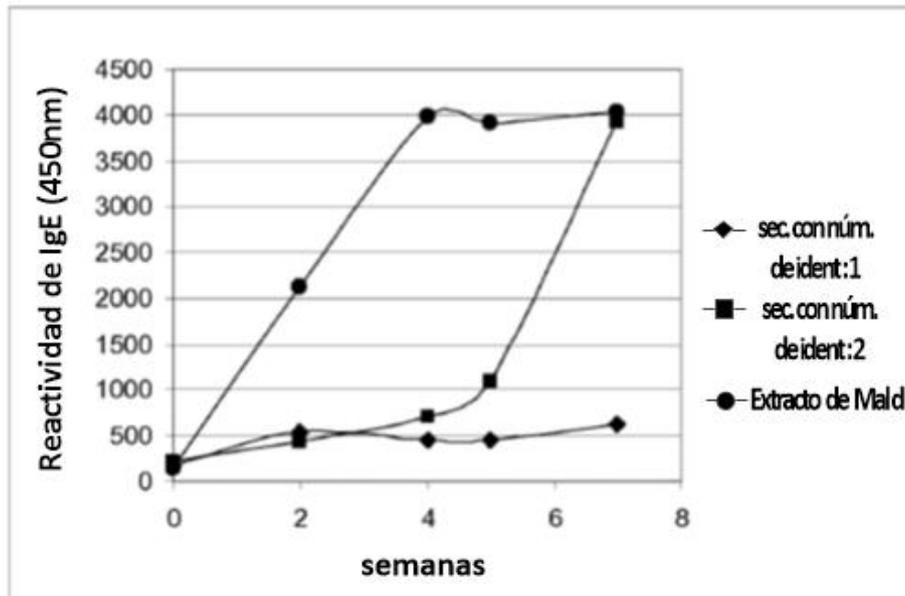


Figura 7

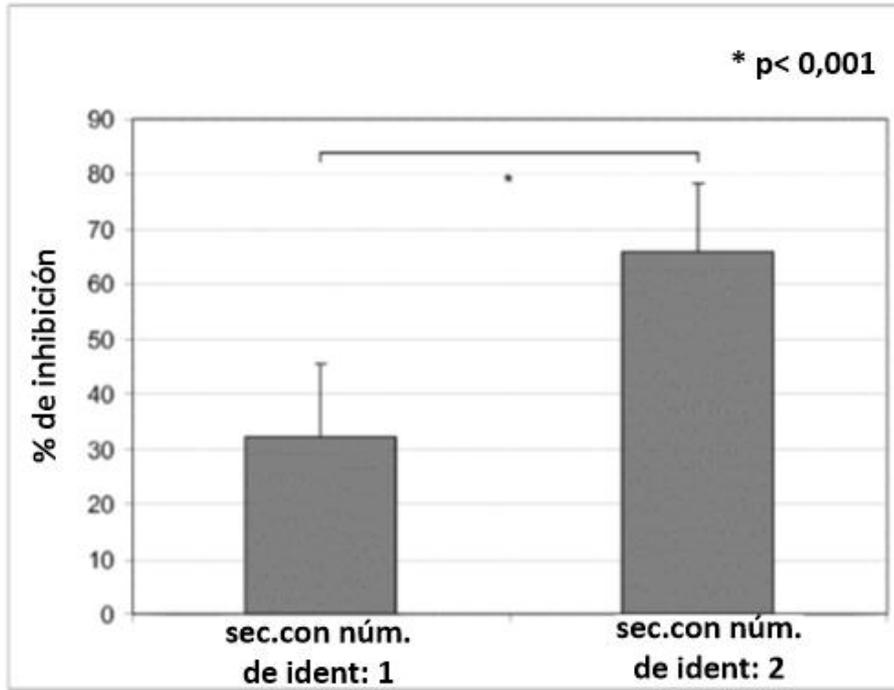


Figura 8

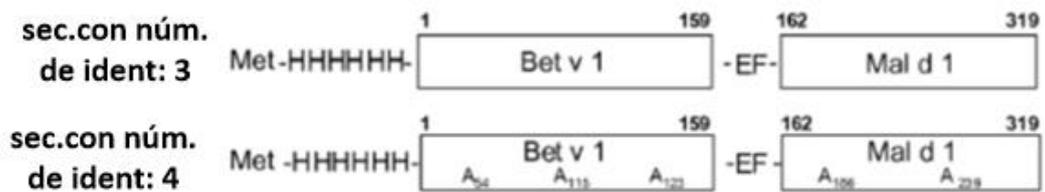


Figura 9

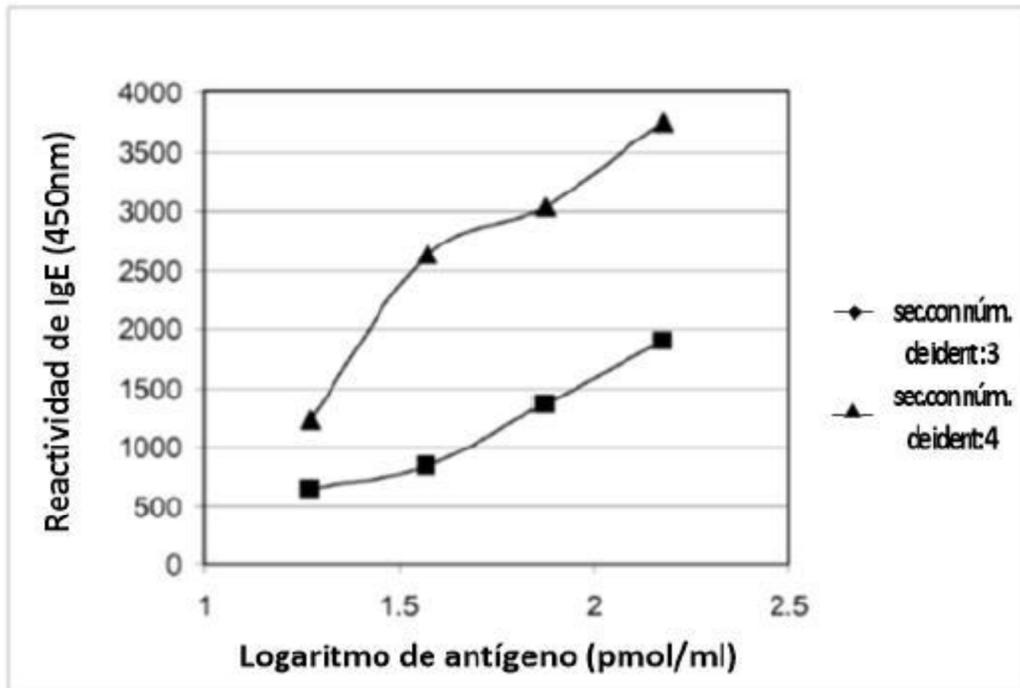
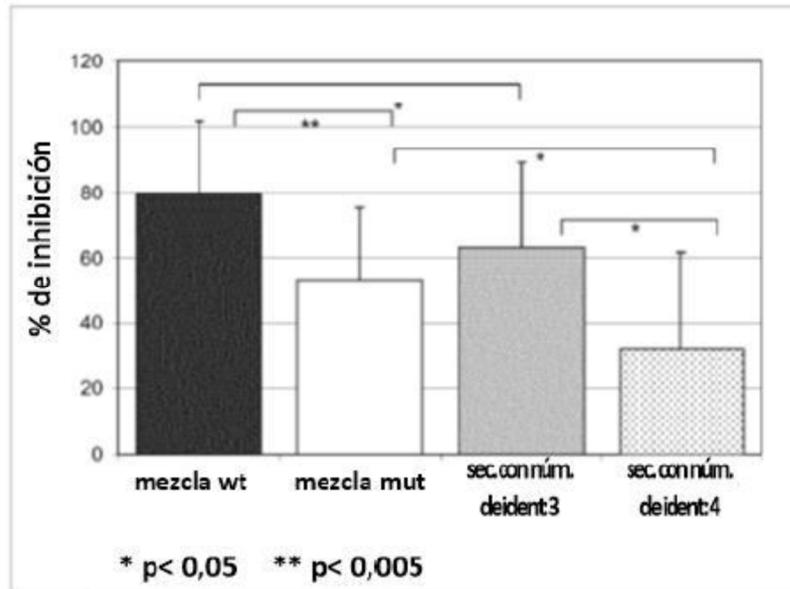


Figura 10

A



B

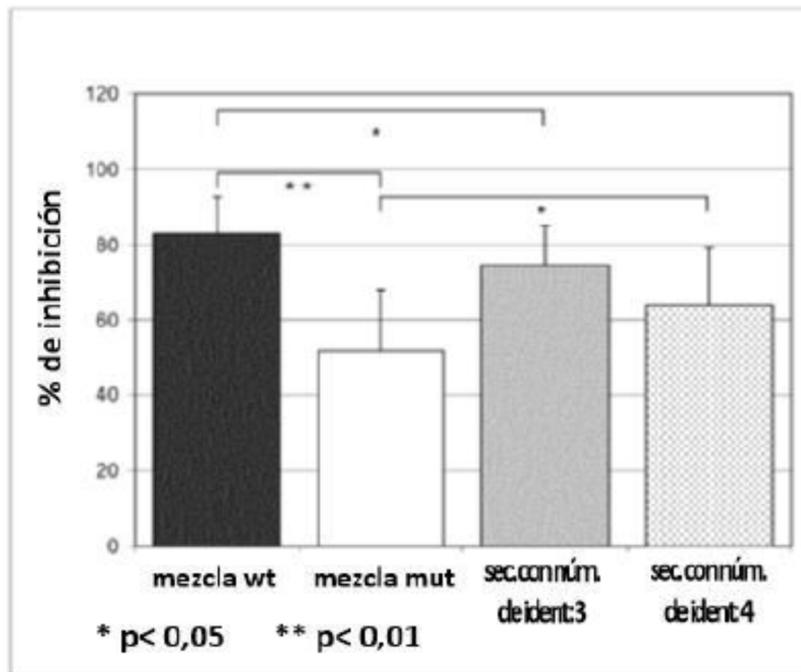


Figura 11

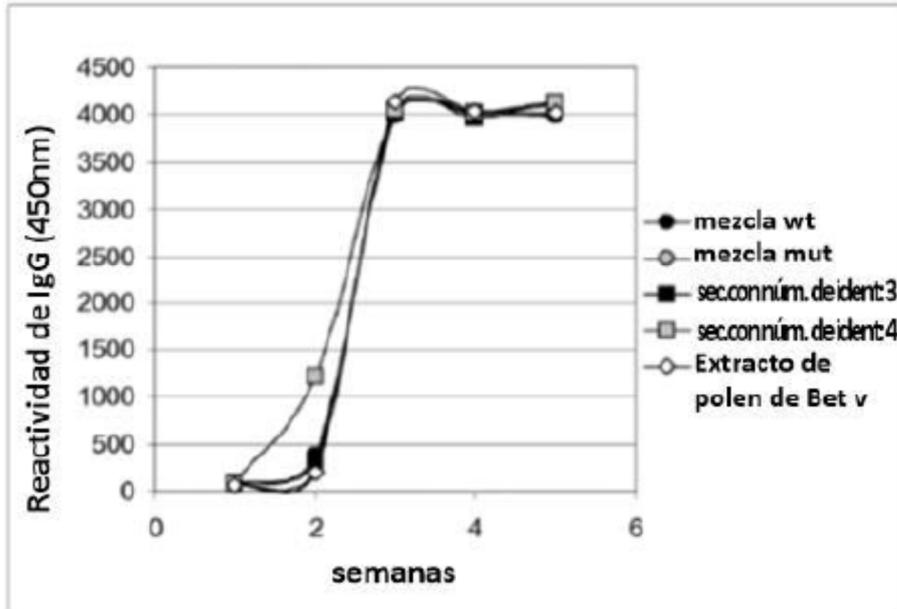


Figura 12

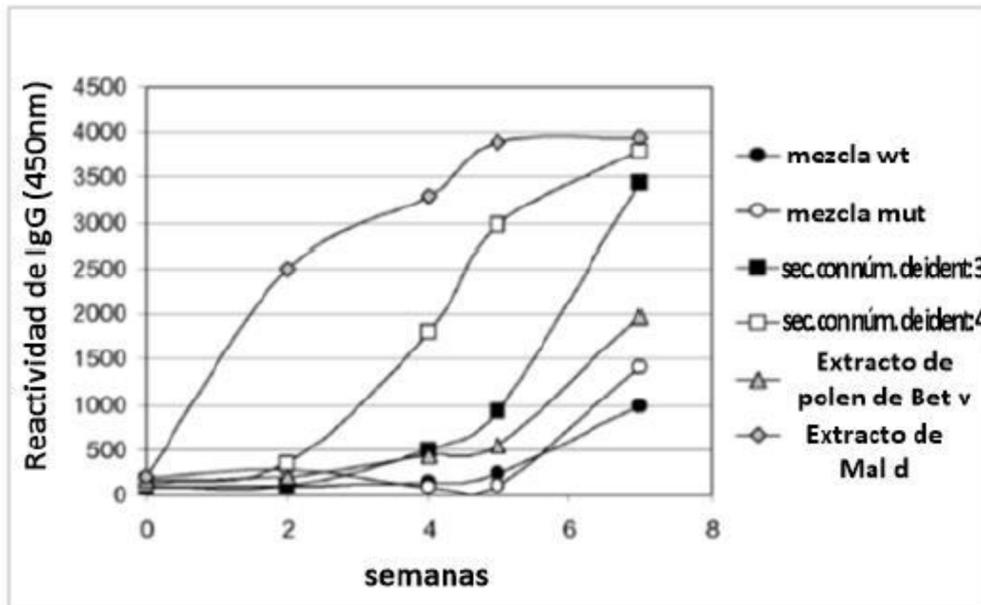
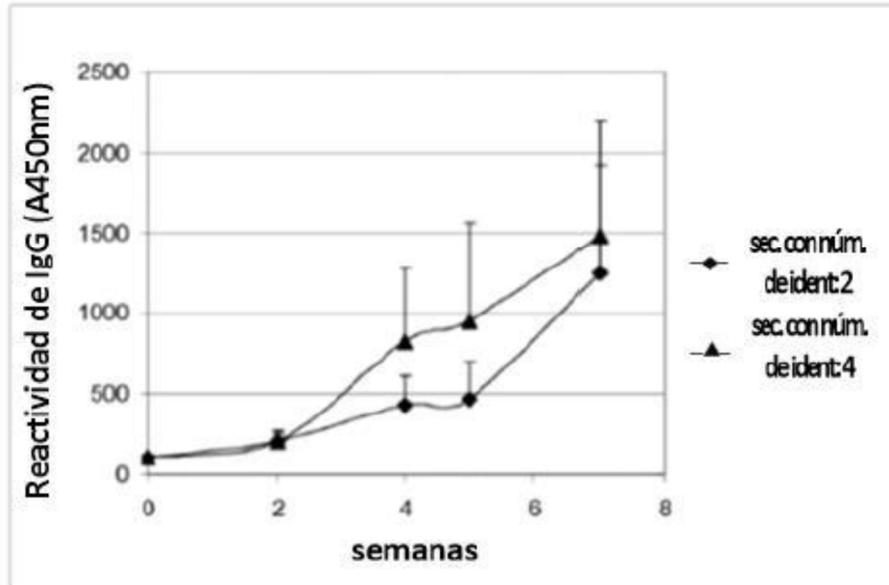


Figura 13

A



B

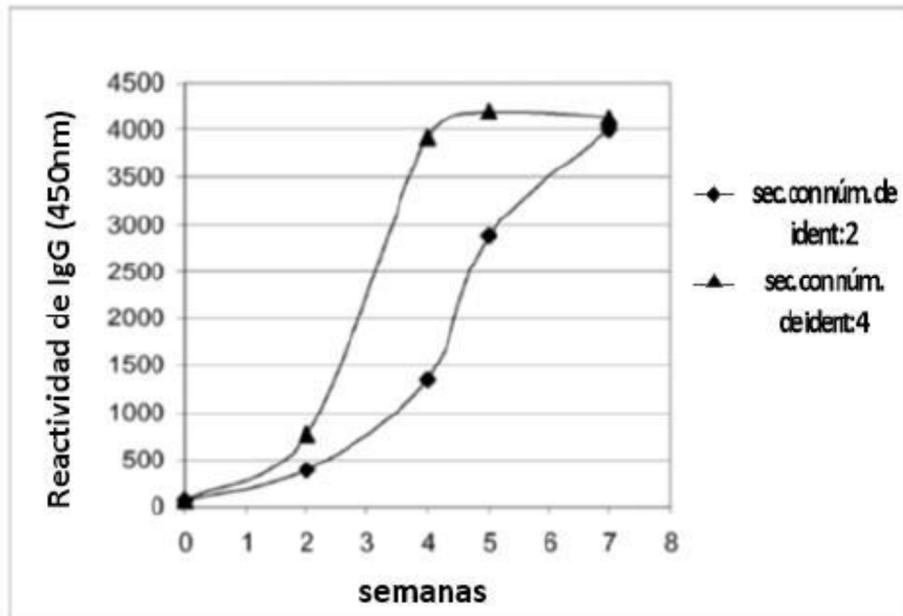


Figura 14

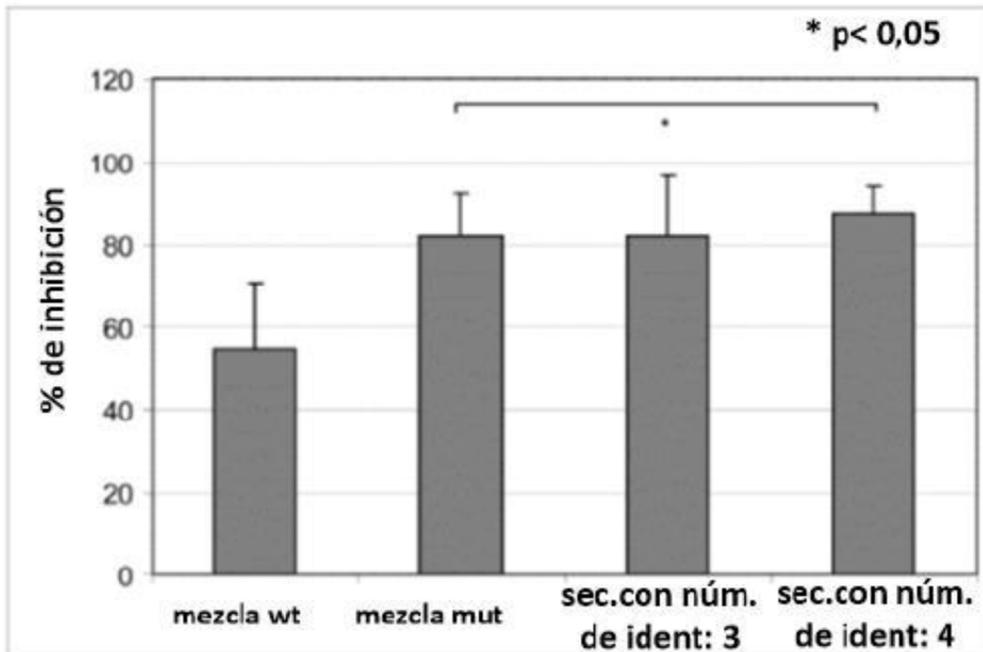


Figura 15

