

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 271**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2009** E 11179771 (8)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** EP 2436692

54 Título: **Proteínas híbridas hipoalergénicas de alérgenos de ácaros del grupo 1 y 2 principales para uso en el tratamiento de alergias**

30 Prioridad:

25.03.2008 ES 200800827

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

19.10.2017

73 Titular/es:

BIAL INDUSTRIAL FARMACEUTICA, S.A.
(100.0%)
Alameda de Urquijo 27
48008 Bilbao, Vizcaya ES

72 Inventor/es:

ASTURIAS ORTEGA, JUAN ANDRES;
IBARROLA LOPEZ DE DAVALILLO, IÑAKI;
ARILLA RODRIGUEZ, MARIA CARMEN y
MARTINEZ GARATE, ALBERTO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 638 271 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas híbridas hipoalergénicas de alérgenos de ácaros del grupo 1 y 2 principales para uso en el tratamiento de alergias

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un polipéptido con actividad alérgica reducida que comprende fragmentos de los alérgenos del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* del grupo 1 y grupo 2 Der p 1 y Der p 2, y a un polinucleótido que codifica dicho polipéptido. La invención también se refiere a un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la invención, así como a una célula huésped transformada con dicho vector de expresión. Además, la invención se refiere a un método para producir el polipéptido de la invención. La presente
10 invención se refiere también al polipéptido para uso en el tratamiento o prevención de alergia, así como a una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido o vector de expresión de la invención.

Estado de la técnica

15 La alergia es la alteración hereditaria o adquirida específica en la capacidad de reaccionar a sustancias extrañas que son normalmente inofensivas (alérgenos). La alergia está relacionada con las reacciones inflamatorias de los órganos afectados (piel, conjuntiva, nariz, faringe, membrana mucosa bronquial, tracto gastrointestinal). Los síntomas inmediatos de la enfermedad incluyen rinitis, conjuntivitis, dermatitis, asma y choque anafiláctico, y manifestaciones crónicas de la enfermedad incluyen reacciones tardías de asma y dermatitis atópica. Las alergias Tipo I son un problema significativo de salud en los países industrializados. Este tipo de alergia es causada por la formación de anticuerpos IgE contra antígenos aerotransportados. Estos anticuerpos IgE interactúan con mastocitos
20 y basófilos, que liberan mediadores biológicos como la histamina, que producen rinitis alérgica, conjuntivitis y asma bronquial en más del 25% de la población de los países industrializados. [Floistrup, H., Swartz, J., Bergstrom, A., Alm, J.S., Scheynius, A., van Hage, M., Waser, M., Braun-Fahrlander, C., Schram-Bijkerk, D., Huber, M., Zutavern, A., von Mutius, E., Ublagger, E., Riedler, J., Michaels, K.B., Pershagen, G., The Parsifal Study Group. (2006). Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *J Allergy Clin Immunol.* 117, 59-66].

25 En la actualidad, el único tratamiento para la alergia que está dirigida a la causa de la enfermedad es la inmunoterapia específica para alérgenos (SIT). La SIT es un tratamiento efectivo para enfermedades alérgicas causadas por alérgenos específicos y básicamente involucra modular la respuesta inmune del paciente mediante la administración regular en concentraciones crecientes de las proteínas que producen la alergia (extractos alérgicos). Aunque diversos estudios han demostrado la efectividad clínica de esta inmunoterapia específica para alérgeno, sus mecanismos inmunológicos no se entienden completamente.
30

Se ha descrito el uso de péptidos quiméricos que contienen secuencias de al menos dos alérgenos de ácaros del polvo doméstico [por ejemplo en el documento US2007/065468 o "Proteína alérgica de ácaro de polvo quimérico B5D2D1proD1 - SEQ ID 2" Geneseq EBI No. de acceso AFH52734], así como la modificación de epítomos de unión a IgE por mutación de residuos de cisteína de alérgenos [Bhalla, P.L. and Singh, M.B. (2008). Biotechnology-based allergy diagnosis and vaccination. *Trends Biotechnol.* 26, 153-161].
35

Lo que se sabe hasta ahora es que altas dosis de alérgenos inyectados inducen una elevada síntesis de IL-12 por células que presentan antígeno, por ejemplo células dendríticas, que favorecen preferentemente el desarrollo de células T auxiliares ingenuas (nTH) en células TH1 o TH0. Esto permite que la respuesta inmune alérgica relacionada con las células TH2 se conmute a una respuesta TH1/TH0 que induce la producción de altos niveles de IFN- γ [Akdis, C.A. and Blaser, K. (2000). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 55, 522-530]. Esta conmutación inmune está reforzada por la inducción de tolerancia (anergia clonal o supresión clonal) de células de memoria TH2 bajo la influencia de células T reguladoras (TR1) que producen las citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β [Akdis, C.A., Joss, A., Akdis, M., and Blaser, K. (2001). El mecanismo de IL-10 indujo la inactivación celular en la inflamación alérgica y la respuesta normal a los alérgenos. *Int. Arch Allergy Immunol.* 124; 180 - 182]. La disminución en la activación y proliferación de células TH2 da como resultado una producción más baja de IL-4, y de IgEs por las células B. La disminución de la activación e infiltración de células TH2 en la membrana de la mucosa nasal y bronquial da lugar a una menor síntesis de IL-5, lo que permite una reducción en la infiltración de eosinófilos lo que conduce a una gran reducción en la liberación de mediadores inflamatorios tales como la MBP (proteína básica mayor) y ECP (proteína catiónica eosinófila). Los nuevos clones alérgicos específicos de células T de fenotipo predominante TH0 producen una mezcla de citoquinas TH1 y TH2 que promueven la producción por las células B de una gran cantidad de anticuerpos IgG específicos para alérgenos. Además, los altos niveles de IL-10 inducen una síntesis elevada de anticuerpos IgG4 específicos para alérgenos. Estos dos tipos de anticuerpos específicos pueden actuar como anticuerpos bloqueadores que previenen el entrecruzamiento de los receptores unidos a IgE anclados en los mastocitos, e inhibiendo así la desgranulación y liberación de histamina [Moverare, R. (2003). Immunological mechanisms of specific immunotherapy with pollen vaccines: implications for diagnostics and the development of improved vaccination strategies. *Expert Rev. Vacc.* 2, 85-97; Wachholz, P.A., Soni, N.K., Till, S., and Durham, S.R. (2003). Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112; 915-922]. También bloquean la captura de antígeno mediada por IgE por las células presentadoras de antígeno, y esto suprime la reacción inmune a los alérgenos.
50
55

- Los extractos alérgicos aislados de fuentes naturales son mezclas complejas de proteínas y otras moléculas. La composición, y por lo tanto la alergenidad de la misma, depende del material utilizado, que varía de acuerdo con las condiciones ambientales en el caso de los pólenes, la fase de maduración en el caso de los hongos, las condiciones de crecimiento de los ácaros, etc. Además, algunos extractos pueden contener una concentración insuficiente de alérgenos principales, pueden estar contaminados con componentes indeseables, a los cuales el paciente no es alérgico, o ambos problemas pueden estar presentes. La inmunoterapia actual utiliza exclusivamente extractos alérgicos completos, y esto tiene una serie de inconvenientes tales como:
- 5 - Reacciones adversas graves debidas a la reactividad de la vacuna con los anticuerpos IgE anclados en las células efectoras.
 - 10 - La aparición, después de iniciado el tratamiento de inmunoterapia, de nuevas sensibilizaciones a otros alérgenos presentes en la vacuna.
 - Dificultades en la producción estandarizada de algunos extractos alérgicos.
- Todo esto lleva a que la inmunoterapia no sea un tratamiento tan seguro y efectivo como se desearía.
- Una mejor comprensión de la patogénesis de la alergia y de los mecanismos de inmunoterapia específica ha permitido abordar una solución a los problemas antes mencionados. Una comprensión de la influencia de la presentación del antígeno mediado por IgE en la respuesta específica del alérgeno TH2 ha incrementado los esfuerzos para producir alérgenos que no unen IgE. Tal alérgeno se dirigirá a las células T mediante un mecanismo de captura al antígeno basado en fagocitosis/pinocitosis, evitando el entrecruzamiento de IgE y la presentación del antígeno dependiente de IgE. Esto induce un equilibrio en la producción de citoquinas TH0 o TH1 por las células T, y producción menor de IgE y mayor de IgG por las células B; lo que conduciría a la inducción de tolerancia de células T de tipo TH2 sin riesgo de anafilaxia.
- 20
- El progreso de las técnicas recombinantes para obtener alérgenos y derivados de alérgenos ha facilitado un gran aumento en la capacidad para desarrollar nuevas vacunas para el tratamiento de la alergia. La dificultad que enfrentan los que trabajan en este campo es reducir la unión de IgE del antígeno, manteniendo su reconocimiento por las células T. Las moléculas alérgicas que tienen una menor capacidad de unión a IgE pero mantienen su reactividad a las células T, podrían administrarse en dosis más altas permitiendo una inmunoterapia más rápida y segura con menos inyecciones. Además, los alérgenos recombinantes se pueden producir a gran escala en tanques de fermentación, utilizando sistemas de expresión microbianos, y la purificación del mismo es más eficiente que la de sus equivalentes naturales.
- 25
- Los ácaros pertenecen al grupo de artrópodos y tienen un tamaño de menos de 0,3 mm; Se pueden encontrar en diferentes ambientes, incluyendo el polvo de la casa. Han sido reconocidos como responsables de las alergias al polvo doméstico desde finales de los años sesenta.
- 30
- Los ácaros principales responsables de producir síntomas alérgicos se incluyen en el orden Astigmata y su distribución taxonómica es como sigue:
- 35 Phylum Arthropoda
- Clase Arachnida
- Subclase Acari
- Orden ASTIGMATA
- Familia Glycyphagidae
- 40 Subfamilia Glycyphaginae
- Género *Blomia*
- B. freemani*
- B. kulagini*
- B. tropicalis*
- 45 Género *Glycyphagus*
- G. domesticus*
- Género *Lepidoglyphus*
- L. destructor*

Subfamilia Labidophorinae

Género Gohieria

G. fusca

• *Familia Pyroglyphidae*

5 *Subfamilia Dermatophagoidinae*

Género Dermatophagoides

D. evansi

D. farinae

D. microceras

10 *D. pteronyssinus*

D. siboney

D. neotropicalis

Género Hirstia

H. domicola

15 *Género Malayoglyphus*

M. carmelitus

Subfamilia Pyroglyphinae

Género Euroglyphus

E. maynei

20 • *Familia Acaridae*

Género Acarus

A. siro

Género Tyrophagus

T. longior

25 *T. putrescentiae*

• *Familia Chortoglyphidae*

Género Chortoglyphus

C. arcuatus

30 Las especies que más frecuentemente producen alergia son las del género *Dermatophagoides*. Sus condiciones óptimas de crecimiento son una temperatura de aproximadamente 20 °C y una humedad relativa superior al 70%. Un entorno con humedad de menos del 50-60% limita su presencia en un grado extraordinario; por lo tanto son muy abundantes en las regiones costeras templadas, y raramente presentes en las zonas montañosas secas, particularmente sobre una altitud de 1500 m. Por lo tanto, la concentración de ácaros también aumenta en las casas en épocas de cambio estacional (primavera y otoño), con lluvias y temperaturas suaves, y generalmente disminuye durante el verano (clima caliente, seco) e invierno (clima frío, seco).

40 Los ácaros del polvo doméstico son organismos complejos que producen miles de diferentes proteínas y otras macromoléculas. Son una de las fuentes más prevalentes de alergia y se ha estimado que de los 50 millones de personas en la UE que sufren de alergias, el 15% están sensibilizadas a los ácaros, con aproximadamente 10-15 millones de personas que no se han diagnosticado correctamente. Otros datos indican que hasta el 80% de los niños asmáticos podrían ser sensibilizados a los ácaros [de Blay F, et al. Influence of mite exposure on symptoms of mite-sensitive patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93:136-138].

Hasta la fecha, se han descrito 14 alérgenos de los ácaros más comunes de la casa, *D. pteronyssinus* y *D. farinae*, cada uno de los cuales tiene un grado muy diferente de prevalencia entre los pacientes alérgicos. Los alérgenos de

D. pteronyssinus, descritos el 3 de julio de 2007 en la lista oficial de alérgenos del Subcomité de la Nomenclatura de Alérgenos (<http://www.allergen.org/Allergen.aspx>) de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (I.U.I.S), son:

• Der p 1

- 5 Nombre bioquímico: Cysteine protease, 28 kDa (SDS-PAGE) con actividad proteolítica que puede causar un efecto adyuvante en procesos alérgicos

Alergenicidad: - En suero hay una correlación positiva entre IgE a Der p 1 y a un extracto de D. pteronyssinus, medido por RIA y RAST ($r = 0,82$, $p < 0,001$, $n = 30$).

- Los 11 pacientes estudiados tuvieron pruebas cutáneas positivas en respuesta a Der p1 ($< 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$).

- 10 - El 92% de los 42 pacientes con alergia a los ácaros tenían IgE específica a rDer p 1 en RAST.

• Der p 2

Nombre bioquímico: Pertenece a la familia NPC2, 15 kDa (SDS-PAGE).

Alergenicidad: - 9 de los 12 pacientes con alergia a ácaros (75%) tuvieron pruebas cutáneas positivas en respuesta a Der p2 ($< 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$).

- 15 - 59 de 65 (90,7%) pacientes con alergia a ácaros tenían IgE específica a Der p 2 en RAST.

- 32 de 45 (71%) de los pacientes con alergia a ácaros tenían IgE específica a Der p 2 en RAST.

- El 100% de los 35 pacientes con alergia a los ácaros tenían IgE específica a Der p 2 en RAST.

• Der p 3

Nombre bioquímico: Tripsina, 31 kDa (SDS-PAGE).

- 20 Alergenicidad: - 100% de los 55 pacientes con alergia a los ácaros tenían IgE específica a Der p 3 en RAST.

- De los 35 pacientes con alergia a los ácaros, el 97% tenía IgE específica a Der p 3 en RAST.

• Der p 4

Nombre bioquímico: α -amilasa, 60 kDa (SDS-PAGE).

Biochemical name: α -amylase, 60 kDa (SDS-PAGE).

- 25 Alergenicidad: - En las inmunotransferencias con Der p4 purificado, el 46% de los 27 pacientes adultos con alergia a ácaros tenía IgE específica a Der p 4 y 25% de 20 niños alérgicos a ácaros.

- De 10 pacientes con alergia a ácaros estudiados, 3 tenían IgE a Der p 4 en inmunoprecipitación de mancha.

• Der p 5

Tamaño: Proteína de 14 kDa (SDS-PAGE) sin homología significativa con otras proteínas descritas.

- 30 Alergenicidad: - 6 de 19 (31%) pacientes con alergia a ácaros tenían IgE específica a Der p 5 en RIA.

- 7 de los 20 pacientes con alergia ácaros (37%) tenían reactividad positiva a Der p 5 entre 10^{-4} y 10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ en pruebas de pinchazo de piel.

- En inmunotransferencias, 21 de los 38 sueros de pacientes con alergia a ácaros reconocieron Der p 5.

• Der p 6

- 35 Nombre biológico: quimotripsina, 25 kDa (SDS-PAGE).

Alergenicidad: - 41% (36 de 88) de los pacientes con alergias ácaros tenían IgE específica a Der p 6 en RAST.

- El 44% (8 de 18) de los pacientes alérgicos a ácaros tuvieron reacciones positivas en las pruebas intradérmicas subcutáneas con Der p 6.

- 65% de los 35 pacientes con alergia a ácaros fueron positivos para Der p 6 en RAST.

- 40 • Der p 7

Tamaño: Grupo de proteínas de 26, 30 y 31 kDa (SDS-PAGE) sin homología significativa con otras proteínas descritas.

Alergenicidad: - 53% (16 de 30) de los pacientes alérgicos a ácaros tuvieron reacciones positivas en pruebas subcutáneas con Der p 7 (1 µg/ml).

5 - 14 de 38 (37%) de los niños tenían IgE específica para rDer p 7.

- 19 de 41 (46%) de los pacientes con alergia a ácaros tenía IgEs específica a rDer p 7 en RIA.

• Der p 8

Nombre bioquímico: Glutación S-transferasa, 27 kDa (SDS-PAGE).

Alergenicidad: 40% de los pacientes alérgicos a los ácaros reconocidos rDer p 8 en inmunotrasferencia.

10 • Der p 9

Nombre bioquímico: serasa proteasa colagenolítica 29 kDa (SDS-PAGE).

Alergenicidad: 92% de los 35 pacientes con alergia a ácaros tenían IgE específica a Der p 9 en RAST.

• Der p 10

Nombre bioquímico: Tropomiosina, 36 kDa (SDS-PAGE).

15 Alergenicidad: 5,6% de los pacientes con alergia a ácaros tenía IgE específica a Der p 10 recombinante.

• Der p 11

Nombre bioquímico: Paramyosina, 103 kDa (SDS-PAGE).

Alergenicidad: La prevalencia de IgE en suero a Der p 11, medida en inmunodot, varió entre el 41,7% y 66,7% dependiendo del grupo de pacientes, aunque fue muy baja en pacientes no atópicos con urticaria (18,8%) o individuos normales (8%).

20

• Der p 14

Nombre bioquímico: Apolipophorina, 177 kDa (SDS-PAGE).

Alergenicidad: Der p 14 induce respuestas IgE significativas y estimulación de las células T.

• Der p 20

25 Nombre bioquímico: Arginina quinasa sin tamaño descrito.

• Der p 21

No hay datos sobre el nombre bioquímico o el tamaño de la molécula.

Der p 1 y Der p 2 reaccionan con 80-100% de pacientes alérgicos a los ácaros [Thomas, W.R., Smith, W-E, Hale, B., Mills, K.L., O'Brien, R.M. (2002). Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129; 1-8] y son capaces de inhibir casi toda la reactividad de IgE al extracto completo de *D. pteronyssinus* [Van der Zee, J.S., van Swieten, P., cansen, H.M., Aalbersen, R.C. (1988). Skin tests and histamine release with PI-depleted *D. pteronyssinus* body extracts and purified P1. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81; 884-895; Meyer, C.H., Bond, J.F., Chen, M.C., Kasaian, M.T. (1994). Comparison of the levels of the allergens Der p I and Der p II in standardised extract of the house dust mite *D. pteronyssinus*. *Clin. Exp. Allergy* 24; 1041-1048].

30

35 Los alérgenos del grupo 1 (Der p 1) son proteínas con actividad de cisteína proteasa y pertenecen a la misma familia que la papaína y la actina-cisteína proteasa. La proteína madura tiene 222 residuos y 80 residuos de preproteína. Se produce en el tracto digestivo del ácaro y por lo tanto se encuentra en las heces y parece estar involucrado en la digestión de los alimentos. Tiene 3 puentes disulfuro: C4-C117, C31-C71 y C64-C103 y su estructura tridimensional está compuesta por dos dominios globulares: uno formado en el extremo del terminal amino (residuos 21-90) y el otro en el terminal carboxilo (residuos 131-200). Están enlazados por un bucle flexible (en las posiciones 101-131) [Meno, K., Thorsted, P.B., Ipsen, H., Kristensen, O., Larsen, J.N., Spangfort, M.D., Gajhede, M., Lund, K. (2005). The crystal structure of recombinant proDer p 1, a major house dust mite proteolytic allergen. *J. Immunol.* 175, 3835-3845], donde se ha demostrado una gran actividad estimulante de células T [Kircher, M.F., Haeusler, T., Nickel, R., Lamb, J.R., Renz, H., Beyer, K. (2002). Vb 18.1 and Va 2.3+ Tcell subsets are associated with house dust mite allergy in human subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109, 517-523]. La proteína Der p 1 tiende a formar dímeros en condiciones de pH neutro y alcalino. Los epítomos de las células B se distribuyen a lo largo de toda la molécula, algunos de los cuales son epítomos conformacionales [De Halleux, S., Stura, E., VanderElst, L., Carlier, V.,

40

45

Jacquemin, M., Saint-Remy, J.M. (2006). Three-dimensional structure and IgE-binding properties of mature fully active Der p 1, a clinically relevant major allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 571-576].

5 Los alérgenos del grupo 2 (Der p2) contienen tres puentes disulfuro (C8-C119, C21-C27 y C73-C78) y están compuestos de dos hojas β anti-paralelas. Los epítomos de las células T de Der p2 se localizan a través de la proteína. Sin embargo, el péptido 111-129 es frecuentemente reconocido por las células T [O'Brien, R.M., Thomas, W.R., Nicholson, I., Lamb, J.R., Tait, B.D. (1995). An immunogenetic analysis of the T-cell recognition of the major house dust mite allergen Der p 2: identification of high- and low-responder HLA-DQ alleles and localization of T-cell epitopes. *Immunology.* 86, 176-182]. Los epítomos de células B parecen ser conformacionales ya que la unión a IgE es altamente dependiente de la estructura terciaria.

10 Los extractos de ácaros alergénicos son mezclas complejas de proteínas y moléculas no proteicas. El uso creciente de técnicas para encontrar los niveles de IgE específica en relación con los componentes de un extracto ha permitido demostrar que los pacientes alérgicos generalmente reaccionan a diversos componentes. Hay pocos casos de pacientes alérgicos que reaccionan a un solo alérgeno. Los estudios de inmunoterapia con extractos de ácaros completos han demostrado que pueden producirse efectos adversos sistémicos peligrosos durante la
15 inmunoterapia con extractos de ácaros [Akçakaya, N., Hassanzadeh, A., Camcio lu, Y., Coku ra, H. (2000). Local and systemic reactions during immunotherapy with adsorbed extracts of house dust mite in children *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 85; 317-321] y la inducción de nueva reactividad de IgE a los mariscos [van Ree, R., Antonicelli, L., Akkerdaas, J.H., Garritani, M.S., Aalberse, R.C., Bonifazi, F. (1996). Possible induction of food allergy during mite immunotherapy. *Allergy* 51; 108-113]. Se muestra así que los extractos alergénicos conocidos en la actualidad presentan inconvenientes claros para conseguir un tratamiento óptimo de la alergia a ácaros.

Características de la invención

Teniendo en cuenta el antecedente antes mencionado, los inventores se han concentrado en investigar nuevos enfoques ventajosos para el tratamiento antialérgico, en particular el tratamiento de alergias producidas por ácaros. Como resultado de una extensa investigación, los inventores han descubierto un nuevo y efectivo enfoque para el
25 tratamiento de las alergias a ácaros basadas en nuevas proteínas híbridas formadas por fragmentos de unión de dos alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p 1 y Der p 2) y diversos métodos y medios para obtenerlos.

En un primer aspecto, la invención proporciona un polipéptido con actividad alergénica reducida que comprende fragmentos de las secuencias de aminoácidos del grupo 1 y del grupo 2 de los alérgenos de ácaros *D. pteronyssinus* Der p 1 y Der p 2 en los que las secuencias carecen de uno o más epítomos de unión a anticuerpos IgE de unión, siendo dichos fragmentos al menos 50 residuos de aminoácidos en longitud caracterizado porque el polipéptido tiene al menos 95% de homología con SEQ ID NO: 4 y no muestra reconocimiento de IgE en sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de acuerdo con el primer aspecto.

35 En un tercer aspecto, la invención proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido del segundo aspecto.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una célula huésped transformada con el vector de expresión de acuerdo con el tercer aspecto.

40 En un quinto aspecto, la invención proporciona un método para producir un polipéptido, caracterizado porque comprende cultivar la célula huésped del cuarto aspecto y aislar y purificar el polipéptido producido por la célula huésped.

En un sexto aspecto, la invención proporciona el polipéptido de acuerdo con el primer aspecto, o el vector de expresión del tercer aspecto para uso en el tratamiento o prevención de la alergia.

45 En un séptimo aspecto, la invención proporciona una preparación farmacéutica caracterizada porque comprende el polipéptido del primer aspecto o el vector de expresión del tercer aspecto y opcionalmente, un excipiente o adyuvante farmacológicamente aceptable.

Las proteínas híbridas hipoalérgicas pueden tener alergenicidad significativamente reducida en comparación con la de los alérgenos nativos individuales y/o mezclas de los mismos. Las proteínas híbridas de acuerdo con la presente invención se pueden denominar hipoalérgicas ya que tienen una capacidad menor para unirse a anticuerpos IgE basándose en: i) pruebas in vitro ELISA, inhibición de ELISA e inmunotransferencia utilizando grupos de suero de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*; ii) pruebas in vivo de reactividad cutánea en pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*; iii) pruebas de activación ex vivo de basófilos aislados de la sangre de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* y iv) pruebas in vitro EAST con sueros individualizados de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*. Adicionalmente, las proteínas híbridas de acuerdo con la presente invención: i) mantienen su capacidad inmunogénica, como se demuestra mediante estudios de linfoproliferación con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 23 pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* que muestran reactividad de células T; ii) de hecho puede tener mayor inmunogenicidad que las proteínas de tipo silvestre después de la inmunización de
55

ratones con las proteínas híbridas; y ii) tienen la capacidad de inducir anticuerpos de "bloqueo" en ratones, es decir que induce IgG específica para Der p 1 y Der p 2, que inhiben la unión de la IgE de los pacientes alérgicos a ácaros del polvo doméstico a los alérgenos naturales.

5 Por lo tanto, la presente invención se refiere a proteínas híbridas (o quimeras) (denominadas en lo sucesivo QM2) compuestas de fragmentos de los alérgenos Der p 1 y Der p 2, en la que al menos una de las dos hojas β de Der p 2, en la que el puente disulfuro entre C8 y C119 de Der p2 se ha interrumpido por sustitución de uno o ambos residuos de cisteína en las posiciones 8 y 119 de la proteína nativa madura mostrada en la Figura 2, por ejemplo con un resto de serina, o por inserción de secuencia de aminoácidos adicional, tal como un fragmento de Der p 1 por ejemplo residuos 5 a 222 de la proteína madura (es decir sin la preregión mostrada en la Figura 1). Preferiblemente, 10 la secuencia de aminoácidos adicional se inserta entre el residuo 73 y 74 de la secuencia de proteína nativa madura Der p 2 mostrada en la Figura 2. La reactividad alérgica se ha reducido, aunque sorprendentemente sin perjuicio de su capacidad inmunogénica. De hecho, las proteínas híbridas pueden mostrar una inmunogenicidad incrementada en algunas pruebas y además pueden estimular la producción de anticuerpos IgG. Se divulga aquí también una proteína híbrida de comparación (denominada en lo sucesivo como QM1) que no es parte de la invención.

15 La invención proporciona por lo tanto secuencias de péptidos que comprenden o consisten en secuencias de aminoácidos que al menos 95%, o más preferiblemente 100% de homología de secuencia con SEQ ID No 4.

Dichas proteínas pueden producirse mediante cualquier método estándar de síntesis de proteínas, por ejemplo síntesis química, síntesis semiquímica o mediante el uso de sistemas de expresión. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a las secuencias de nucleótidos que comprenden o consisten en el ADN que codifica 20 para dichas proteínas quiméricas, sistemas de expresión, por ejemplo vectores que comprenden dichas secuencias acompañadas de las secuencias necesarias para la expresión y control de la expresión, y células huésped y organismos huésped transformados por dichos sistemas de expresión.

La invención proporciona por lo tanto polinucleótidos que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que tienen al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, todavía más preferiblemente al menos 95%, o lo más preferiblemente 100% de homología de secuencia a SEQ ID No 3 .

Los vectores de expresión pueden seleccionarse dependiendo de la célula huésped en la que puedan insertarse los polinucleótidos de la invención. Tal transformación de la célula huésped implica técnicas convencionales tales como las enseñadas en Sambrook et al. [Sambrook, J., Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, EE.UU]. La selección de vectores adecuados está dentro de las habilidades de 30 la persona con conocimientos en el campo. Los vectores adecuados incluyen plásmidos, bacteriófagos, cósmidos y virus.

Las proteínas híbridas producidas pueden aislarse y purificarse de la célula huésped mediante cualquier método adecuado, por ejemplo precipitación o separación cromatográfica, por ejemplo cromatografía de afinidad.

La invención también se refiere a los usos clínicos de estos polipéptidos quiméricos y a inmunoterapia específica 35 para el tratamiento de la alergia, particularmente alergia al ácaro del polvo, *D. pteronyssinus*. Como se ha indicado anteriormente, la inmunoterapia específica es un método para tratar y prevenir la alergia mediante la administración de una cantidad efectiva de una o más de las proteínas hidróxicidas de la presente invención. Preferiblemente, el tratamiento es de mamíferos, particularmente humanos. La alergia puede manifestarse como rinitis, conjuntivitis, asma, urticaria, angioedema, eczema, dermatitis y/o choque anafiláctico. Por consiguiente, el tratamiento y la terapia 40 preventiva cubiertos por la presente solicitud pueden incluir el tratamiento de una o más de estas condiciones.

Las proteínas híbridas preparadas por el procedimiento descrito pueden formularse como un medicamento para el tratamiento de una reacción alérgica. La invención también se refiere a posibles composiciones que comprenden estas proteínas híbridas, así como a diferentes formas de administrarlas. Una realización particular de la invención se refiere a una composición de vacuna. El componente principal es la proteína híbrida que se administra 45 preferiblemente junto con un adyuvante. Existen varios adyuvantes adecuados para la aplicación a humanos, por ejemplo hidróxido de aluminio. La preparación de vacunas se describe en Vaccine Design "The subunit and adjuvant approach", eds. MF Powell & MJ Newman, Plenum Press, Nueva York, 1995.

Las formas de administración preferidas incluyen todos los métodos de administración estándar descritos y sugeridos para la vacunación en general y la inmunoterapia de alergia en particular (en forma oral, sublingual, 50 transdérmica, intravenosa, intranasal, mucosa, etc.).

Las propiedades hipoalérgicas de las proteínas híbridas de la presente invención se discuten a continuación. Los ensayos inmunológicos llevados a cabo por los inventores utilizando experimentos de ELISA y de inhibición de ELISA indican que la proteína de la quimera QM2 de la invención no mostró ningún reconocimiento de IgE en sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* (Figura 9). A pesar de contener la mayoría de las secuencias de ambas 55 proteínas alérgicas, la quimera QM1 del comparador tiene una capacidad de unión a IgE 2500 veces menor que la de la mezcla de ambas proteínas naturales, como se muestra en la figura 10. QM1 contiene la mayoría de las secuencias de ambos pero tiene mutaciones en dos cisteínas de Der p 2 (residuos 8 y 119).

Estos datos de baja alergenidad fueron autenticados por experimentos in vivo en 107 pacientes usando pruebas de pinchazo de piel. La alergenidad (capacidad de unión a IgE como se indica, por ejemplo, el tamaño de la pápula) de la quimera QM1 era aproximadamente 50 veces inferior a la obtenida con las dos proteínas naturales aisladas (figura 11). La alergenidad de QM2 fue prácticamente nula.

- 5 La baja alergenidad de la quimera QM2 se corroboró cuando se midió la reactividad de esta molécula con sueros de 107 pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* (Figura 12). Esta reducción en alergenidad fue acompañada por el mantenimiento de la capacidad inmunogénica de las quimeras QM1 y QM2, que fue sorprendentemente superior que la observada para la suma de las proteínas naturales individuales (Figura 13 y Figura 14A). Estas características permiten que estas quimeras se utilicen como sustitutos del extracto alérgico completo de la técnica anterior, pero con mayor seguridad.

Depósito de las cepas

- 15 Una cepa del microorganismo de acuerdo con la presente invención se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la University of Valencia Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100 BURJASOT, Valencia), de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines del Procedimiento de Patentes, con las siguientes referencias:

CECT 7317 *Escherichia coli* QM1

CECT 7318 *Escherichia coli* QM2

Depositada el 3 de octubre de 2007.

- 20 Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidos de los anteriores que corresponden al proDer p 1 de la preproteína, en el que la preregión ha sido enmarcada y los puentes disulfuro están indicados por líneas que conectan los residuos de cisteína circundantes relevantes.

- 25 La Figura 2 muestra secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidos de los anteriores que corresponden a la proteína madura Der p2, en la que los puentes disulfuro están indicados por líneas que conectan los residuos de cisteína circundantes relevantes.

La figura 3 muestra un diagrama de construcción QM1. El * indica la ubicación de los residuos sustituidos.

- 30 La Figura 4 muestra secuencias de aminoácidos y nucleótidos de QM1. Los residuos introducidos de Der p2 están sombreados y los de Der p 1 están enmarcados. Los residuos sustituidos se muestran con un marco doble.

La Figura 5 muestra un diagrama de construcción QM2. El * indica la ubicación de los residuos sustituidos.

La Figura 6 muestra secuencias de aminoácidos QM2 y nucleótidos. Los residuos introducidos de Der p2 están sombreados y los de Der p 1 están enmarcados. Los residuos sustituidos durante la construcción de la quimera se muestran con un doble guión bajo.

- 35 La Figura 7 muestra un gel de poliacrilamida teñido con Coomassie Blue después de la electroforesis en la que aparecen los alérgenos naturales y recombinantes (Der p 1 y Der p 2) y las fusiones QM1 y QM2.

La Figura 8 muestra inmunotransferencia incubada con anticuerpos IgE de un grupo de sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* en los que aparecen los alérgenos naturales y recombinantes (Der p 1 y Der p 2) y las fusiones QM1 y QM2. La línea M indica marcadores de peso molecular estándar.

- 40 La Figura 9 muestra la unión de anticuerpos IgE a nDer p 1, nDer p 2, QM1 y QM2 usando sueros de 19 pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* (dilución 1/4).

- 45 La Figura 10 muestra los resultados de una prueba de inhibición de ELISA de la actividad de unión a IgE de un grupo de sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* a una mezcla equimolecular de nDer p 1 + Der p 2 en la fase sólida. Las moléculas inhibitoras utilizadas fueron: nDer p 1 + Der p 2, QM1 y QM2. Cada valor corresponde a la inhibición promedio obtenida a partir de tres experimentos con una desviación estándar inferior al 10%.

- 50 La Figura 11 muestra el resultado de las pruebas cutáneas de pacientes individuales (n = 107) con un extracto de *D. pteronyssinus* (DPT), nDer p 1 y nDer p 2 (ambos a 10 y 100 µg/mL) y se muestran QM1 y QM2 (ambos a 50 y 500 µg/ml). Los valores individuales, en mm², se dan como medio de duplicar el área de superficie de la pápula medida en ambos brazos. Los resultados se muestran como gráfica en caja donde los bordes de cada caja marcan los percentiles 25 y 75 y las líneas indican los valores medianos. Las barras que se extienden hacia arriba y hacia abajo desde cada caja muestran el mayor valor observado que no es un valor atípico. Los círculos abiertos y las estrellas

indican valores atípicos y extremos de cada grupo de pacientes. Se incluyen los valores de P después del análisis de prueba de clasificación Wilcoxon.

5 La Figura 12 muestra una representación gráfica en caja de medios IgE específicos duplicados de sueros de pacientes individuales (n = 107) a un extracto de *D. pteronyssinus* (DPT), nDer p 1, nDer p 2, nD1D2, QM1 y QM2. Los resultados se muestran en forma gráfica en caja donde los bordes de cada caja marcan los percentiles 25 y 75 y las líneas indican los valores medianos. Las barras que se extienden hacia arriba y hacia abajo desde cada caja muestran el mayor valor observado que no es un valor atípico. Los círculos abiertos y las estrellas indican valores atípicos y extremos de cada grupo de pacientes. Se incluyen los valores de P después del análisis de prueba de clasificación Wilcoxon.

10 La Figura 13 muestra la proliferación de linfocitos T obtenidos con 10 µg/ml del extracto de *D. pteronyssinus* (DPT), las dos proteínas híbridas y las mezclas equimoleculares de las formas natural y recombinante de Der p 1 y Der p 2 (MEZCLA NAT y MEZCLA REC, respectivamente). El valor mostrado es el del índice de estimulación (%). Los valores de P sólo se muestran cuando las diferencias son significativas.

15 Figura 14: (A) Titulación de antisueros elevados por inmunización de ratones con nD1D2, QM1 y QM2. Se probaron diferentes diluciones de antisueros para reactividad a la mezcla equimolar natural de nDer p 1 y nDer p 2 (nD1D2). Se muestra la densidad óptica media (OD) correspondiente a los anticuerpos IgG unidos para cada dilución en suero. (B) Inhibición de la unión de IgE humana a nD1D2 y a sus componentes, Der p 1 y Der p 2 después de la preincubación con anticuerpos IgG de ratón específicos de nD1D2, QM1 y QM2.

Descripción detallada

20 Las proteínas híbridas de baja alergenicidad de acuerdo con la presente invención (QM2) y la proteína comparadora (QM1) se obtienen, en el caso de QM1, mediante la fusión de ambas proteínas (Der p 1 y Der p 2) y la eliminación de uno de los puentes Disulfuro (residuos 8-119) y, en el caso de QM2, mediante la inserción de la proteína Der p 1 entre los residuos 73 y 74 de Der p 2. Sorprendentemente, a pesar de estos cambios, las proteínas híbridas (QM1 y QM2) exhibieron mayor capacidad de estimulación de las células T (Figura 13) e indujo inmunogenicidad más fuerte que las moléculas separadas de tipo silvestre (Figura 14A).

25 Los fragmentos peptídicos que constituyen las proteínas híbridas pueden sintetizarse a partir de secuencias de nucleótidos que las codifican por una persona calificada y entrenada, por ejemplo amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica tales como los descritos, por ejemplo en Sambrook et al. [Sambrook, J., Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, EE.UU.]. Dichas secuencias de nucleótidos, que han sido digeridas por enzimas de restricción adecuadas, pueden incorporarse en un vector de expresión por ligación. Las diferentes secuencias de nucleótidos que codifican los fragmentos peptídicos se unen usando enlazadores formados con secuencias reconocidas por diferentes enzimas de restricción, y por lo tanto algunos residuos aparecen en la molécula de péptido híbrido final que no existía en la secuencia original del alérgeno natural. Estos nuevos residuos no interfirieron con la traducción correcta de la proteína y se han marcado en la secuencia de la figura 6 mediante un doble guión bajo.

35 La presente invención cubre el uso de las quimeras de acuerdo con la presente invención, QM2, o péptidos sintéticos derivados de allí para tratamientos de desensibilización en animales, particularmente mamíferos tales como humanos. Los métodos de desensibilización implican la administración repetida por vía parenteral (subcutánea, intravenosa o intramuscular), oral, sublingual, nasal o rectal. Estas proteínas híbridas pueden administrarse solas o en combinación con excipientes, adyuvantes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la legislación vigente y los procedimientos galénicos aplicables.

A continuación se exponen las características inmunológicas de las proteínas híbridas de acuerdo con la presente invención (QM2) y la proteína de comparación (QM1).

45 Las proteínas híbridas QM1 y QM2 descritas en la presente memoria son hipoalérgicas: como se muestra en las Figs. 8, 9, 10 y 12. Tienen menor reactividad al suero de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* que el extracto completo o las proteínas naturales combinadas y, particularmente para la quimera QM2, una menor capacidad para activar basófilos en pruebas "ex vivo". Esta hipoalergenicidad también se ha demostrado en pruebas cutáneas in vivo (Figura 11).

50 La Figura 8 muestra una prueba de inmunodetección que indica que las quimeras QM1 y QM2 tienen menor capacidad de unión a IgE en pacientes alérgicos en comparación con la reactividad de la proteína natural Der p 2. Esta reducción en la alergenicidad se cuantificó mediante la inhibición de ELISA con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* (Figura 10). 2500 veces más de la proteína QM1 se requiere para lograr una inhibición del 50% que de la mezcla de las dos proteínas naturales. Por lo tanto, se puede deducir que era 2500 veces menos alérgico que las proteínas naturales, lo que indicaría una reducción en la capacidad de unión a IgE a la mezcla de las dos proteínas naturales de más del 99%.

Una medida más directa de la hipoalergenicidad de las quimeras QM1 y QM2 se obtuvo mediante mediciones directas de la reactividad cutánea en 107 pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*. Los datos de la figura 11 muestran que la quimera QM2 había reducido notablemente la reactividad de la piel. La quimera QM2 por otra parte sólo produjo reactividad positiva en 5 pacientes. Una comparación de cada distribución muestra que la quimera QM1 tiene un tamaño medio de pápula 50 veces menor que el observado para nDer p 2 y 10 veces menor que el observado para nDer p 1, lo que indicaría una reducción en la actividad alérgica de 90-98% . Esto fue a pesar de las dosificaciones más altas utilizadas para las proteínas híbridas.

La baja capacidad de unión a IgE de la proteína híbrida QM2 también se demostró con el suero de otros 107 pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* medidos por EAST (Figura 12). En todos los pacientes, la unión a IgE era prácticamente inexistente para QM2 en comparación con la mezcla de proteínas naturales, DPT, y con las proteínas individuales ya sea en forma recombinante o nacional.

Esta gran reducción de la capacidad de unir IgE y causar reacciones adversas fue acompañada por el mantenimiento de la capacidad inmunogénica. Las proteínas QM1 y QM2 mostraron un índice de linfoproliferación similar al inducido por la mezcla de las dos proteínas puras, Der p 1 y Der p 2 en combinación (tanto en formas naturales como recombinantes) como se muestra en la Figura 13. Esto demuestra que las proteínas híbridas QM1, construidas como una fusión del polipéptido mutado Der p 2 (C8-C119) y Der p 1, y QM2, construidas con 2 fragmentos de Der p 2 y Der p 1, contienen menos epítomos conformacionales de unión a IgE pero mantenían suficientes epítomos T para inducir una respuesta inmune protectora.

Otra característica deseable de las moléculas hipoalérgicas cuando se usan como candidatos para SIT, aparte de tener una actividad de unión a IgE reducida en comparación con los alérgenos correspondientes y que contienen epítomos de células T, es que deben tener la capacidad de inducir anticuerpos de "bloqueo" que previenen la desgranulación y liberación de histamina. La inmunización de ratones con las proteínas híbridas QM1 y QM2 indujo una respuesta a IgG más fuerte que la mezcla de proteínas de tipo silvestre. Estos anticuerpos IgG específicos para Der p 1 y Der p 2 inhibieron la unión de la IgE de los pacientes alérgicos a los ácaros de polvo doméstico a los alérgenos naturales, mejorando además la prevención de los síntomas alérgicos.

La invención se comprenderá mejor a partir de los siguientes ejemplos relacionados con las etapas experimentales para preparar la invención y demostrar sus cualidades. Estos ejemplos son simplemente ilustrativos y no limitativos de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 Purificación de los alérgenos naturales Der p 1 y Der p 2 a partir de cuerpos de ácaros

Se utilizó como material de partida una mezcla de cuerpos liofilizados y heces de *D. pteronyssus* (Laboratorios Leti, Madrid, España), extraída con 10 volúmenes (p/v) de PBS (solución salina regulada con fosfato) suplementada con 1 mM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) durante 15 minutos con agitación rápida a 4 °C. Luego se centrifugó a 3.800 xg durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante de la extracción se filtró a través de AP (Millipore) y se añadió lentamente 60% de sulfato de amonio 361 g/l) durante 30 minutos. Después de agitar durante 1 hora a 4 °C, se centrifugó durante 15 minutos a 17.000 xg y 4 °C.

• Purificación de Der p 1 natural

La pella obtenida después de la centrifugación se resuspendió en 2 ml de Tris 20 mM pH 8,0 y se filtró a través de 0,22 mm. La cromatografía en tamiz molecular se llevó a cabo en una columna Superdex S200 16/60 (GE-Healthcare, Uppsala, Suecia) para la cual se equilibró la columna con PBS y se inyectaron los 2 ml del paso anterior. Se recogieron fracciones de 3 ml del volumen de exclusión que se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras, combinándose con fracciones de 24 kDa. La siguiente cromatografía de intercambio aniónico se llevó a cabo en una columna HighTrap Q (GE-Healthcare) para la cual la columna se equilibró con Tris 20 mM pH 8,5. Las fracciones positivas del paso anterior se sometieron a diálisis frente a 5 litros de agua destilada durante 120 minutos y se tomaron a Tris 20 mM, pH 8,5. La muestra se inyectó a 1 ml/minuto y se eluyó con un gradiente de NaCl 200-1000 mM en Tris 20 mM pH 8,5. Se recogió la fracción no unida.

La pureza de la preparación se comprobó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Básicamente, se siguió la técnica descrita por Laemmli [(19) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685], utilizando un aparato de electroforesis MINI-PROTEAN (Bio-Rad). Los geles, que miden 10x10 cm y con una concentración de poliacrilamida del 12,5%, se sometieron a una corriente de 200 voltios durante 45 minutos en regulador de Tris-Glicina. Las proteínas utilizadas como marcadores fueron aquellas del kit Bio-Rad para pesos moleculares bajos. El cálculo de pesos moleculares y el análisis densitométrico de los geles se realizaron usando un analizador de imágenes (Diversity, BioRad).

El resultado de la purificación de Der p 1 natural fue una proteína con una pureza de más del 98% y un tamaño de 29,07 kDa cuando se llevó a cabo el SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 7).

• Purificación de Der p 2 natural

- Se añadieron 239 g/l de sulfato de amonio al sobrenadante de precipitación con sulfato de amonio al 60% para obtener una concentración del 95% y se dejó agitar durante la noche a 4 °C. Se centrifugó durante 15 minutos a 17.000 xg y 4 °C, y la pella se resuspendió en 25 ml de agua MilliQ. La siguiente cromatografía de intercambio aniónico se llevó a cabo en una columna HighFlow Q 16/20 (GE-Healthcare) equilibrada con Tris 50 mM pH 8,0. La muestra se dializó frente a 5 l de agua durante la noche con tres cambios de agua y se llevó a Tris 50 mM pH 8,0. La muestra se inyectó a 5 ml/minuto y se recogió la fracción no unida. La tercera etapa de purificación consistió en cromatografía de intercambio catiónico en una columna HighTrap SP (GE-Healthcare) equilibrada con AcNa 20 mM pH 5,5. La fracción no unida de la etapa anterior se dializó frente a 5 l de agua durante 3 horas y se llevó a AcNa 20 mM, pH 5,5. La muestra tenía una tasa de flujo de 1 ml/minuto y se eluyó con un gradiente de NaCl 200-1000 mM en AcNa 20 mM pH 5,5. Como etapa de purificación final, se realizó cromatografía de tamiz molecular en una columna Superdex S75/300 (GE-Healthcare) equilibrada con PBS. La fracción de la etapa anterior eluida con NaCl 200 mM se concentró en Amicon Ultra 4 (Millipore) y tuvo una tasa de flujo de 0,4 ml/min, y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Las fracciones se analizaron usando SDS-PAGE. Las que contenían una proteína de 16 kDa correspondiente a Der p 2 se combinaron juntas.
- 15 La purificación de Der p 2 natural dio como resultado una proteína con una pureza de más del 95% y un tamaño de 16,63 kDa cuando se realizó SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 7).

Ejemplo 2 Clonación de los alérgenos Der p 1 y Der p 2

- El ADN complementario (ADNc) codificado para los alérgenos Der p 1 y Der p 2 se clonó mediante transcripción reversa seguida de amplificación por PCR usando ARNm como plantilla aislada de Dermatophagoides y cebadores específicos en cada caso. El ARNm se aisló a partir de 100 mg de cuerpos de *D. pteronyssinus* (Laboratorios Leti, Madrid, España) utilizando el Kit de Purificación de MicroRNA Quick Prep (GE-Healthcare). El ADNc se obtuvo mediante transcripción reversa del ARNm usando el kit de síntesis de ADNc de First Strand (GE-Healthcare).

- Los cebadores consistieron de la zona de hibridación, diversos sitios de escisión para diferentes endonucleasas de restricción (subrayadas a continuación) y nucleótidos de anclaje. La reacción de amplificación por PCR tuvo los siguientes componentes en un volumen de reacción de 50 µl: regulador de amplificación x10, 5 µl; 200 µM de dNTP; 100 pm de cada cebador oligonucleotídico; 2,5 unidades de Taq polimerasa (Pfx ADN polimerasa, Invitrogen); 1 ng de plantilla de ADN y agua destilada estéril hasta 50 µl. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador RoboCycler (Stratagene) bajo condiciones específicas que se describieron en cada caso. El producto de la reacción se sometió a electroforesis en geles de agarosa (2%) y la banda de interés se aisló del gel por GeneClean (Bio101), utilizando el protocolo descrito por el fabricante. Los fragmentos aislados se ligaron en el vector pGEM (Promega). La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α (obtenible mediante Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Las colonias resultantes se hicieron crecer para aislar su ADN plasmídico, que se digirió con enzimas adecuadas para liberar el fragmento de interés. Los clones positivos se seleccionaron para su secuenciación. El ADN insertado en pBluescript se secuenció mediante el método de Sanger modificado para su uso con didesoxinucleótidos fluorescentes y se amplificó en el termociclador usando el Kit de Secuenciación de Ciclo de Terminación de DyeDeoxy PRISM Ready Reaction (Perkin Elmer) siguiendo las instrucciones del fabricante.

•cDNA de Der p 1

- La región de ADNc que codifica Der p 1 se amplificó mediante PCR utilizando cebadores diseñados de acuerdo con las secuencias publicadas (número de acceso a GenBank: P08176). El cebador directo 5'-ACTGACAGGCCTCGTCCATCATCGATCAAAAC-3' incluía la secuencia de escisión de la enzima *StuI* (subrayado) y el cebador reverso 5'-CGGAATTCCTAGGTTA-GAGAATGACAACATATGG-3' incluía las zonas de escisión de las endonucleasas *EcoRI* (subrayadas) y *AvrII* (itálicas). Las condiciones de amplificación fueron: 94°C-1' (1 ciclo); 94°C-30", 48°C-1', 72°C-1' (35 ciclos); 72°C-10' (1 ciclo). El producto de PCR obtenido se aisló, se clonó en el vector pGEM (Promega) y se secuenció.

El ADN plasmídico de Der p1 codificó una proteína de 302 aminoácidos que incluía una preproteína de 80 y una proteína madura de 222 aminoácidos (Figura 1). Esta secuencia mostró una diferencia (His152-> Asn) en comparación con la secuencia descrita para Der p 1.0105 (P08176). El peso molecular calculado de la proteína fue de 24,97 kDa con un punto isoeléctrico de 5,49.

50 •cDNA de Der p 2

- La región de ADNc que codifica Der p2 se amplificó mediante PCR usando cebadores diseñados de acuerdo con las secuencias publicadas (AAF86462). 5'-CGGGATCCGATCAAGTCGATGTCAAAG-3' se usó como cebador directo, que incluía la secuencia de escisión de la enzima de restricción *BamHI* y 5'-CGGAATTCCTTAATCGCGGATTTAGC-3' como el cebador reverso con la secuencia de escisión de la enzima de restricción *EcoRI*. Las condiciones de amplificación fueron: 94°C-1' (1 ciclo); 94°C-30", 48°C-1', 72°C-1' (35 ciclos); 72°C-10' (1 ciclo).; El producto de PCR obtenido se aisló, se clonó en el vector pBluescript II KS (Stratagene) y se secuenció. El ADN plasmídico que codificó Der p2 se aisló después de la digestión con las enzimas de restricción *BamHI/EcoRI* y se subclonó en los vectores pKN172 [20 Way, M., Pope, B., Gooch, J., Hawkins, M., Weeds, AG (1990) Identificación de una región en

el segmento 1 de gelsolina crítica para la unión de actina. EMBO J. 9, 4103-4109] y pTrcHis A (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE-UU.)).

La secuencia Der p2 obtenida se codificó para un polipéptido de 129 aminoácidos (Figura 2) que incluía un cambio de aminoácidos (Leu¹²⁷-> Ile) con respecto a la secuencia Der p 2.0102 (AAF86462). Sin embargo Der p 2 (P49278) y otras isoformas descritas también tenían una isoleucina en esta posición. La proteína tenía un peso molecular teórico de 14.106 kDa y un punto isoeléctrico de 7.10.

Ejemplo 3 Expresión y purificación de Der p 2 recombinante

Las células E. coli BL21 (DE3) transformadas con el plásmido correspondiente por el método de Hanahan [(21) Hanahan, D. (1983). Estudios sobre la transformación de Escherichia coli con plásmidos. J. Mol. Biol. 166, 557 - 580] se extendieron sobre las placas de Petri que contenían medio LB suplementado con 200 µg/ml de ampicilina. A partir de una colonia de células, se preinocularon 50 ml del mismo medio, y se incubaron durante la noche a 37 °C con agitación (260 rpm). Se inoculó 1 litro del mismo medio con dicha preinoculación a partir de una densidad óptica (600 nm) de 0,2. Se incubó a 37 °C con agitación hasta obtener una densidad óptica (600 nm) de 0,6 (aproximadamente 90 minutos), momento en el que se llevó a cabo la inducción con isopropil-tio-β-galactósido (IPTG) a una concentración final de 0,6 mM. Después de un período de inducción de 3 horas, las células se recolectaron por centrifugación.

Las células se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 50 ml de regulador de lisis (Tris 50 mM pH 8,0; DTT 1 mM (ditiotreitól)). La resuspensión se trató con lisozima (0,1 mg/ml de concentración final) durante 30 minutos a 37 °C con agitación. A continuación se sometió a sonicación en un baño de hielo durante 5 minutos, se añadió Triton X-100 al 1% y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Después de ser centrifugado a 8000 xg durante 15 minutos, la pella se resuspendió en 20 ml de urea 2 M y 0,2% de Triton X-100 y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se sometió a sonicación en un baño de hielo durante 1 minuto y se centrifugó a 8000 xg y 4 °C durante 15 minutos. Las pellas se resuspendieron en 10 ml de cloruro de guanidina 6 M y 0,5% de β-mercaptoetanol. Se mantuvieron en agitación magnética durante 1 hora a 4 °C y se dializaron durante la noche frente a 200 ml de urea 6 M en Tris 25 mM pH 8,0. Para mejorar su plegado, la muestra se diluyó después a 1-2 mg/ml con urea 6 M y se realizó diálisis paso a paso a 4 °C contra: 400 ml de urea 3 M/1 l de urea 1,5 M/urea 0,75 M/urea 0,37 M/urea 0,18 M haciendo los cambios cada 90 minutos. Finalmente se dejó dializar toda la noche a 4 °C con 5 l de agua destilada. La purificación finalizó con cromatografía de intercambio aniónico en una columna HighFlow SP 16/20 (Healthcare) equilibrada con AcNa 25 mM pH 5,5. La muestra se tomó a AcNa 25 mM pH 5,5 y después de centrifugar a 3800 xg durante 10 minutos y filtrar a través de filtros AP (Millipore) y 0,45 µm (Millipore) se pasó a través de la columna a 5 ml/min. La elución se llevó a cabo con NaCl 1000 mM en AcNa 25 mM pH 5,5.

El rendimiento de purificación fue de 3,8 mg por litro de cultivo. La purificación de Der p 2 recombinante dio como resultado una proteína con una pureza de más del 95% y un tamaño de 17,05 kDa cuando se llevó a cabo la SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 7).

The yield from purification was 3.8 mg per litre of culture. Purification of recombinant Der p 2 resulted in a protein with a purity of over 95% and a size of 17.05 kDa when the SDS-PAGE was carried out in reducing conditions (Fig.7).

Ejemplo 4 Construcción de la proteína de fusión del comparador QM1

Esto comenzó con el ADN plasmídico de Der p2 que se amplificó por PCR con el cebador 5'-CGGGATCCGT-CAAAGATAGTGCCAATC-3' y 5'-ACGGATCTGCAGGTAGCAATAGCACTGGACCA-3, que incluía las secuencias de escisión de las enzimas BamHI y PstI, respectivamente (subrayadas). Las condiciones de amplificación fueron: 94°C-1' (1 ciclo); 94°C-30", 56°C-30", 72°C-1' (35 ciclos); 72°C-10' (1 ciclo). El fragmento obtenido se ligó en el vector pBluescript KS (Stratagene) escindido con BamHI/PstI y secuenciado. Esta construcción se digirió con PstI/EcoRI y se incorporó por ligación una secuencia parcial de la proteína madura de Der p1 que se había obtenido después de digerir la secuencia inicial con las mismas enzimas PstI/EcoRI. La proteína de fusión obtenida se subclonó en BamHI/EcoRI en los vectores de expresión pKN172 y pTrcHis.

La proteína de fusión 1 resultó de la unión de dos fragmentos (Figura 3). El primer fragmento se formó mediante la secuencia codificada a partir de los aminoácidos 5 a 123 de Der p 2. Los oligonucleótidos diseñados para la reamplificación de esta secuencia incluyeron cambios de base que implicaron la sustitución de las cisteínas de las posiciones 8 y 119 de la proteína original por serinas. El segundo fragmento codificado a partir de los aminoácidos 4 a 222 de la proteína madura de Der p 1. El segundo fragmento se unió al primero por el núcleo de la enzima PstI situado entre los aminoácidos 3 y 5 de la proteína madura de Der p 1. El ADN de plásmido resultante codificó una proteína de 338 aminoácidos (Figura 4) con un peso molecular de 37,56 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 6,16.

Ejemplo 5 Construcción de la proteína de fusión QM2 de la invención

La proteína de fusión 2 se construyó mediante la unión de tres fragmentos:

- El fragmento 1, correspondiente al extremo de terminal N de Der p2, se amplificó con el cebador directo 5'-CGGGATC-CGATCAAGTCGATGTCAAAG-3' que incluía el núcleo de la enzima BamHI y con el cebador reverso 5'-

CCGAATTCCCTAGGCTGCAGCCATTTGGATCGAT-3' que incluía los núcleos de EcoRI, AvrII y PstI. Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C-1' (1 ciclo); 94 °C-30", 56 °C-30", 72 °C-1' (35 ciclos); 72 °C-10'(1 ciclo).

• El fragmento 2 de Der p 1 se amplificó con los oligonucleótidos siguientes: 5'-ACTGACAGGCCTCGTCCATCATC-GATCAAAAC-3' y 5'-CACCTAGGGAGAATGACAACATATGG-3'. El cebador directo incluyó la secuencia de escisión de StuI y el cebador reverso incluyó el de AvrII. Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C-1' (1 ciclo); 94 °C-30", 56 °C-30", 72 °C-1' (35 ciclos); 72 °C-10' (1 ciclo).

• El fragmento 3 se obtuvo mediante PCR usando Der p2 como plantilla y los cebadores 5'-CA CCAGGCATTACATGAAAAGCCCA-3' y 5'-CGGAATTCCTTAATCGCGGATTTTAGC-3' que tenían las secuencias de reconocimiento para las enzimas AvrII y EcoRI, respectivamente. Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C-1' (1 ciclo); 94 °C-30", 52 °C-30", 72 °C-1' (35 ciclos); 72 °C, 10'(1 ciclo). Aislamiento del fragmento deseado y reamplificación en las siguientes condiciones: 94 °C-1' (1 ciclo); 94 °C-30", 56 °C-30", 72 °C-1' (35 ciclos); 72 °C-10' (1 ciclo). El fragmento 1 se clonó en el vector pBluescript KS (Stratagene) en BamHI/EcoRI. Esta primera construcción se digirió con PstI y AvrII y el fragmento 2 previamente digerido con las mismas enzimas se incorporó por ligación. La digestión con PstI aseguró que este segundo fragmento sólo incluía una secuencia parcial de la proteína madura de Der p 1. La nueva construcción que incluía los fragmentos 1 y 2 a su vez se digirió con AvrII y EcoRI y se unió al fragmento 3. El ADN plasmídico que codificó la proteína de fusión se secuenció y se subclonó en los vectores pKN172 y pTrcHis A para su expresión.

El ADN de la fusión QM2 se formó a partir de la secuencia que codificó la proteína completa de Der p2, en la que se habían insertado entre las bases que determinaban los aminoácidos 73 y 74 una secuencia que codificaba desde el aminoácido 5 hasta el residuo final de la proteína madura de Der p 1 (Figura 5). La unión de Der p 1 con el segundo fragmento de Der p 2 implicó la inclusión de 6 bases adicionales del núcleo de AvrII y que codificaban para prolina y arginina. Los cebadores diseñados para la construcción de los fragmentos 1 y 3 incluían algunas diferencias con respecto a la secuencia original: cambios en los aminoácidos 72 (Ala-> Gly) y 78 (Cys-> Ser) de Der p2 (Figura 6). El aminoácido 342 de la proteína resultó ser una valina en lugar de la alanina de la secuencia original de Der p 2. La proteína final destruyó completamente la estructura tridimensional de Der p2 cuando se introdujo la secuencia de Der p 1 en su aminoácido 73. La proteína híbrida final se componía de 349 aminoácidos con un peso molecular calculado de 38,92 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 6,22.

Ejemplo 6 Expresión y purificación de la proteína híbrida de comparación QM1 y proteína híbrida de la invención QM2

Partiendo de una colonia de células E. coli BL21 (DE3) transformadas con el correspondiente plásmido aislado de una placa LB suplementada con 200 µg/ml de ampicilina, se llevó a cabo una preinoculación de 50 ml del mismo medio y se incubó durante la noche a 37 °C con agitación (260 rpm). Se inoculó 1 litro del mismo medio con dicha preinoculación comenzando con una densidad óptica (600 nm) de 0,2. Se incubó a 37 °C con agitación hasta que alcanzó una densidad óptica (600 nm) de 0,6 (aproximadamente 90 minutos), momento en el que la inducción con isopropil-tio-β-galactósido (IPTG) a una concentración final de 0,6 mM se llevó a cabo. Después de un período de inducción de 3 horas, las células se recolectaron por centrifugación.

• Purificación de la proteína de comparación QM1

Las condiciones de lisis de las bacterias recombinantes y replegamiento por diálisis en etapas para eliminar la urea fueron como para la purificación de rDer p2 (Ejemplo 3). Finalmente, el plegamiento oxidativo por diálisis se llevó a cabo a 4 °C frente a 1 l de cisteína 5 mM/cistina 1 mM en Tris 50 mM pH 8,0 durante la noche. Finalmente se centrifugó a 3800 xg y 4 °C durante 10 minutos y el sobrenadante se filtró a través de AP (Millipore) y se dializó frente a fosfato 2 mM pH 8,5 durante 2 horas y se centrifugó a 18000 xg durante 15 minutos para eliminar el posible material precipitado. El rendimiento final de la purificación fue de 120 mg por litro de medio de cultivo.

• Purificación de la proteína de la invención QM2

Las condiciones de lisis de las bacterias recombinantes fueron como para la purificación de rDer p2 (Ejemplo 3). Se añadió DTT 50 mM a 135 mg de proteína en 10 ml de cloruro de guanidina 6 M y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se añadió 0,2 M de 2-yodoacetamida y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió β-mercaptoetanol 0,2 M, se incubó durante una hora adicional a temperatura ambiente y se llevó a 50 ml con urea 6 M. El siguiente plegamiento se llevó a cabo en etapas por diálisis para eliminar la urea como para la purificación de rDer p2 (Ejemplo 3) y se centrifugó a 3800 xg durante 15 minutos para eliminar cualquier material precipitado. La siguiente etapa de purificación consistió en cromatografía de intercambio aniónico en una columna HighFlow Q 16/20 equilibrada con etanolamina 20 mM pH 10,0. La muestra se pasó a 5 ml/min y el material no unido se recolectó y se concentró en Amicon Ultra 4 (Millipore). Se centrifugó a 3800 xg durante 15 minutos y se filtró a través de AP y 0,45 µm de filtro para eliminar cualquier material precipitado. Finalmente, se realizó una cromatografía en tamiz molecular en una columna Superdex SX200 16/60 equilibrada con NH₄HCO₃ 200 mM a 1 ml/min. La proteína salió en el eluyente debido a su tendencia parfa formar agregados. La preparación pura se liofilizó en el mismo regulador y se mantuvo a 4 °C. El rendimiento final de la purificación fue de 42,4 mg por litro de medio de cultivo.

Ambas proteínas se encontraron en la fracción insoluble como cuerpos de inclusión, pero no pudieron solubilizarse en urea. La purificación de QM1 y QM2 dio como resultado proteínas con una pureza de más del 95% y un tamaño de 34,91 y 39,67 kDa, respectivamente, cuando se llevó a cabo el SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 7).

5 Ejemplo 7: Pruebas inmunológicas para demostrar la baja reactividad de fijación de IgE de las proteínas híbridas a una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*

A) Inmunodetección

Una evaluación inicial de las actividades de unión a IgE por las quimeras QM1 y QM2 se llevó a cabo mediante la técnica de inmunotransferencia utilizando una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*. Después de que los extractos de proteínas y las proteínas purificadas se aplicaron a geles de poliacrilamida, la electrotransferencia se llevó a cabo usando el método de Towbin et al [Towbin, H., Staehelin, I. and Gordon, J. (1979). Transferencia electroforética de proteínas de geles de poliacrilamida a hojas de nitrocelulosa: Procedimiento y algunas aplicaciones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354]. Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a hojas de PVDF (difluoruro de polivinilideno) Hybond-P (GE-Healthcare). Después de que las hojas se habían bloqueado durante 1 hora a temperatura ambiente, se incubaron durante la noche a 4 °C con un anticuerpo primario y después de diversos lavados con el mismo regulador de lavado, las hojas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario combinado con peroxidasa. La detección de banda se llevó a cabo utilizando el método de quimioluminiscencia ECL (GE-Healthcare) de acuerdo con lo mencionado por el fabricante exponiendo la hoja a una película (Hyperfilm.ECL, GE-Healthcare).

20 Las pruebas de inmunodetección no fueron cuantitativas pero mostraron una capacidad de unión a IgE diferente entre las dos quimeras; por lo que sólo en el caso de QM1 hubo un ligero reconocimiento de los anticuerpos IgE, mientras que en el caso de la quimera QM2 el reconocimiento fue cero (Figura 8).

B) ELISA directo

25 La reactividad de IgE de las dos quimeras se analizó mediante la técnica de ELISA con sueros individuales de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*. Las placas de poliestireno (Greiner) se incubaron durante la noche a temperatura ambiente con 0,1 µg por taza pequeña de mezcla equimolecular de proteínas puras nDer p 1 y nDer p 2 en regulador PBS (fosfato 10 mM pH 7,2; NaCl 137 mM KCl 2,7 mM). Se bloquearon con 200 µl/taza pequeña de PBS suplementado con BSA al 1% -Tween 20 al 0,05% y se mantuvo durante 1 hora a 37 °C. A continuación se añadieron 100 µl/taza pequeña de la mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* en dilución 1/4, y se dejó a 37 °C durante 90 min. Después de 3 lavados con 200 µl/taza pequeña de PBS-T (PBS + Tween 20 al 0,05%), se añadieron 100 µl/taza pequeña de un antisuero contra inmunoglobulinas IgE humanas (Dako) combinadas con peroxidasa (dilución 1: 1000) y se incubaron durante 90 minutos a 37 °C. Después de tres lavados más con PBST, se añadieron 200 µl/taza pequeña de una solución de o-fenilendiamina (Sigma-Fast Tablet Sets, Sigma) preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las placas se mantuvieron en la oscuridad durante 30 minutos. La reacción se detuvo con 50 µl/taza pequeña de H₂SO₄ 3 M y se midió la absorbencia a 492 nm en un lector de placas ELISA Easy Reader EAR-400 AT (SLT-Lab Instruments).

La reactividad de IgE a la quimera QM1 sólo se mostró en algunos pacientes, mientras que el QM2 no fue reconocido por prácticamente ninguno de los anticuerpos IgE del suero del paciente (Figura 9).

C) Inhibición de ELISA

40 La reactividad de IgE a las dos quimeras se analizó mediante la técnica de inhibición de ELISA con una mezcla de sueros individuales de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*. La técnica fue la misma que la anterior, excepto que la mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* se preincubó a una dilución de 1/10 con concentraciones particulares de proteínas inhibitoras (de 0,025 a 2500 ng/ml), durante la noche a 4 °C DO. Los anticuerpos unidos a IgE se detectaron entonces como para el ELISA directo.

45 En pruebas de inhibición de ELISA, la quimera QM1 mostró un grado de inhibición más bajo que la mezcla equivalente de nDer p 1-nDer p 2. Así, la cantidad de nDer p 1-nDer p 2 necesaria para lograr una inhibición del 50% fue de 1 ng/ml, mientras que 2500 ng/ml tuvieron que ser añadidos para lograr el mismo efecto con la quimera QM1 (Figura 10). Esto indicaría que QM1 tiene 2500 veces menos capacidad de unión a las IgE específicas de los pacientes y por lo tanto su alergenicidad se reducirá en un 99,96%. La quimera QM2 es incapaz de unirse a IgE específicas de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*, y por lo tanto su comportamiento en las pruebas de inhibición de ELISA no difiere de la obtenida con un control negativo, tal como albúmina de suero bovino.

Ejemplo 8: Experimentos in vivo para demostrar la baja reactividad cutánea de la proteína híbrida de comparación QM1 y la proteína híbrida QM2 de la invención

Se realizaron pruebas de pinchazo en piel in vivo en 107 pacientes con alergia a los ácaros para evaluar la hipoadergenidad de las quimeras QM1 y QM2.

55 Se realizaron pruebas cutáneas con un extracto de *D. pteronyssinus*, nDer p 1 y nDer p 2 aislado de ácaros; RDer p2 expresado en *E. coli*, y las quimeras QM1 y QM2. Todas las muestras se diluyeron en solución salina fisiológica

fenolada al 0,5% y glicerizada al 50%. Las concentraciones utilizadas fueron 1, 10 y 100 µg/ml para las proteínas purificadas no modificadas (nDer p 1, nDer p 2 y rDer p 2) y 5, 50 y 500 µg/ml para las quimeras. Se usaron NaCl al 0,9% e clorhidrato de histamina (10 mg/ml) como controles negativo y positivo, respectivamente.

5 En el experimento, se colocó una gota de cada alérgeno para la prueba sobre la parte interna del antebrazo que luego se pincha a través de la gota con una lanceta. Cada prueba se duplicó en filas para comparar las concentraciones crecientes y decrecientes. Después de 15 minutos, las pápulas se rodearon con un rotulador negro de punto fino. Se colocaron tiras de yeso pegajoso hipoalergénico sobre la pápula y se presionaron suavemente para transferir el trazo de tinta sobre la tira, que se transfirió a las hojas de registro de pápulas. Las áreas de la pápula se midieron mediante entradas digitalizadas, utilizando el teclado de digitalización Summasketch y un programa de diseño asistido por ordenador (Autocad v. 11).

10 Se observó una correlación entre la reactividad medida y la concentración de alérgeno aplicado. La quimera QM2 fue ligeramente reactiva ya que la reactividad sólo se observó a la concentración máxima (500 µg/ml) en 5 de los 107 pacientes estudiados (4,7%). La quimera QM1 fue más reactiva, con 86 pacientes (80,4%) con una reacción positiva a 500 µg/ml y 16 (16,8%) con una reacción positiva a 50 µg/ml, pero con una reactividad mucho menor que las proteínas de tipo silvestre. Se realizó un estudio estadístico para interpretar los resultados obtenidos comparativamente mostrando los resultados en diagramas de gráficos de cajas y utilizando la prueba de Wilcoxon para dos variables relacionadas (Figura 10). Se puede observar en estas ilustraciones que las distribuciones de los valores de las reacciones cutáneas (medidas como área de la pápula en mm²) son significativamente diferentes (P <0,001) cuando QM1 a la concentración máxima de 500 µg/ml (mediana 40,33 mm², Intervalo de confianza 95%: 35,05-47,88) fue comparado con los de nDer p 1, nDer p 2 y rDer p 2 a 100 µg/ml, siendo la reactividad superior a la inducida por QM1, con valores medianos de 52,96; 78,86; Y 75,72 mm², respectivamente.

15 Sin embargo, la reactividad de QM1 no fue significativamente diferente (P = 0,067) de la de nDer p 2 a 10 µg/ml (mediana 41,91 mm², intervalo de confianza 95%: 28,27-49,71). Tampoco fue (P = 0,872) cuando se comparó con la reactividad del extracto completo de ácaros (mediana 39,55 mm², intervalo de confianza 95%: 34,10-44,40). A este respecto, es útil observar que la preparación del extracto de ácaro utilizado para el diagnóstico de pinchazo contenía 7,96 y 2,22 µg/ml de Der p 1 y Der p 2, respectivamente, en comparación con los 500 µg/ml de proteína presente en QM1.

20 También se puede ver en estas ilustraciones que las distribuciones son significativamente diferentes para QM2 en comparación con el extracto de ácaro (DPT), nDer p 1 y nDer p 2 (P <0,001).

30 Ejemplo 9: Valor de SPT comparativo de las quimeras

Se compararon los valores de concentración de alérgenos que produjeron una pápula similar a la producida por la histamina a 10 mg/ml. Para ello, se siguió el método descrito en las Directrices Nórdicas [(24) Registration of allergen preparations. Nordic Guidelines (1989). NLN Publication 23, Uppsala, Suecia]. Para cada paciente se calculó la concentración de proteína que produjo una pápula similar a la producida por la histamina a partir de las medias geométricas de las pápulas obtenidas para cada proteína en las diferentes concentraciones y se calculó entonces el promedio de estos valores para el grupo de pacientes estudiados.

35 Se observó que las concentraciones de proteína que producían una pápula similar a la producida por la histamina fueron de 20,5 y 17,4 µg/ml para nDer p 1 y nDer p 2, respectivamente, mientras que para la quimera QM1 fue tan alta como 182,4 µg/ml.

40 Ejemplo 10: Experimentos para demostrar la baja capacidad de unión al anticuerpo IgE de la proteína híbrida de comparación QM1 y la proteína híbrida de la invención QM2

Además de las pruebas in vivo, se realizaron pruebas in vitro mediante la determinación de IgE específica, utilizando la técnica directa EAST.

45 Se determinó la IgE específica, de acuerdo con Ceska et al. [(25) Ceska, M. and Lundkvist, U. (1972). A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochemistry* 9, 1021-1030], mediante el acoplamiento de las proteínas naturales y recombinantes (50 µg/ml) a discos activados con bromuro de cianógeno, y también extracto de *D. pteronyssinus* (500 µg/ml). A continuación, se añadieron 50 µl de suero de los pacientes y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, los discos se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con 50 µl de anticuerpo anti-IgE humano unido a fosfatasa alcalina y se cuantificaron siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante en el protocolo del kit IgE EIA específico de Hytec (Hycor Biomedical Inc.).

50 Los resultados obtenidos simplemente reafirmaron los obtenidos in vivo. La capacidad de la quimera QM2 para unirse a anticuerpos IgE es muy baja ya que sólo 7 de los 107 sueros estudiados (6,5%) tenían anticuerpos IgE capaces de unirse a QM2. El número de sueros con IgE específicos para QM1 fue de 88 (82,2%). La capacidad de unión a IgE de QM1 (mediana 17,01 U/ml, intervalo de confianza 95%: 9,92-27,16) fue significativamente diferente (P <0,001) e inferior a la del extracto completo (mediana 39,35 U/ml, intervalo de confianza 95%: 18,80 - 50,90) (Figura 11).

Ejemplo 11: Experimentos para demostrar la capacidad de activación basófila de la proteína híbrida de comparación QM1 y la proteína híbrida de la invención QM2

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando la prueba de estimulación de basófilos medida mediante citometría de flujo (prueba de estimulación de alérgeno celular citométrico de flujo) realizada como se describe en Sanz et al. [(26) Sanz, M.L., Sánchez, G., Gamboa, P., Vila, L., Uasuf, C., Chazot, M. (2001) Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to *D. pteronyssinus* and *Lolium perenne*. Clin. Exp. Allergy 31, 1007-1013].

Las células sanguíneas situadas en la capa por encima de los eritrocitos se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en regulador HEPES-Ca²⁺ (HEPES 20 mM, NaCl 133 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 7 mM, MgCl₂ 3,5 mM, 1 mg/ml de BSA, pH 7,4) que contenía IL3 (2 ng/ml) y 10 µl de heparina (5000 UI/ml). Se añadieron los alérgenos y las soluciones de control (50 µl) a pequeñas copas en placas de poliestireno con fondos en forma de U (Greiner Microlon, Greiner-Bio One, Frickenhausen, Alemania) a concentraciones que variaron entre 2 µg/ml y 0,02 pg/ml. Se mezclaron con 50 µl de la suspensión de células de pacientes y se incubaron a 37 °C durante 40 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de regulador HEPES sin Ca²⁺ o Mg²⁺ pero conteniendo EDTA 0,27 mM (regulador de lavado), y las placas se centrifugaron. Los basófilos de las pellas celulares se marcaron con anticuerpos anti-CD63 marcados con PE (Ficoeritrina) y anticuerpos anti-IgE marcados con FITC (isotiocianato de fluoresceína) (diluciones 1:80 y 1:60, respectivamente Caltag, Burlingame, EE.UU.) y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, subsecuentemente se añadieron 4 ml de reactivo eritrolítico (Ortho Diagnostic System, Madrid, España). La lisis celular se detuvo añadiendo regulador de lavado y después de centrifugar las células, los sobrenadantes se diluyeron con 500 µl del mismo regulador. Los marcadores de superficie de los basófilos se analizaron por citometría de flujo a 488 nm utilizando un aparato de citometría de flujo FACScan equipado con un láser de argón de 15 nW (Becton Dickinson, San José, EE.UU.) y los datos se analizaron utilizando el paquete de ordenador CellQuest. En cada prueba se estudió la marca anti-IgE y anti-CD63 en al menos 500 basófilos.

Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-IgE, Le27 (1 µl/ml, Bühlmann, Allschwil, Suiza) como control positivo y los valores basales sin estimulación se evaluaron con regulador HEPES-Ca²⁺. Las respuestas de activación se consideraron positivas cuando el índice de estimulación (% de basófilos activados con extracto de *D. pteronyssinus* o proteína purificada /% de basófilos activados en condiciones basales) fue ≥ 2 en cualquiera de las concentraciones de extracto de *D. pteronyssinus* o proteína purificada utilizada), y la activación específica debida al alérgeno fue > 10%.

Ninguno de los sujetos de control mostró un resultado positivo para cualquiera de las quimeras QM1 o QM2. De los 33 pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* estudiados, QM1 dio una respuesta positiva en 28, mientras que con QM2 hubo una respuesta positiva en sólo 10 casos y siempre a concentraciones mucho más bajas que aquellos en los que QM1 dio una respuesta positiva.

Ejemplo 12: Experimentos de linfoproliferación inducidos para demostrar la capacidad inmunogénica de la proteína híbrida de comparación QM1 y la proteína híbrida de la invención QM2

Un requisito esencial para el uso de una molécula hipoalérgica en inmunoterapia es que se mantenga su antigénicidad (epítomos T). Por lo tanto, para comprobar si los anticuerpos IgE no se unen, las proteínas híbridas continuaron siendo antigénicas, se realizó un estudio de linfoproliferación en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas por las diferentes proteínas utilizadas en los experimentos. Se llevaron a cabo por incorporación de un derivado de fluoresceína en cultivos de linfocitos purificados. Este derivado (éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE)) podía pasar a través de la membrana celular pero no era fluorescente hasta que se había degradado por las esterasas celulares que se convertían en un compuesto fluorescente incapaz de pasar a través de la membrana celular. La incorporación de CFSE se analizó por citometría de flujo en un citómetro de flujo BD FACSCalibur (Becton-Dickinson, Franklin Lakes NJ, EE.UU.).

Se aislaron PBMC de 23 pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* por centrifugación en gradiente de densidad utilizando una solución de separación de linfocitos (Lymphoprep, Nycomed). Las PBMC se resuspendieron entonces a 1-2x10⁶ células viables/ml en medio de cultivo (RPMI 1640, Sigma Chemical Co.) y la viabilidad del mismo se probó con 0,25% de azul de tripano en PBS (Sigma Chemical Co.). Las PBMC preparadas con una viabilidad superior al 90% se utilizaron inmediatamente para las pruebas de proliferación in vitro. Se marcaron 10 x 10⁶ PBMCs en RPMI - 1640 con CFSE (concentración final 5 µM) durante 10 min a 37 °C y en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. La marcación se detuvo con suero de ternera fetal al 50% durante 5 minutos y se lavaron dos veces con RPMI-1640 suplementado con suero de ternera fetal al 10% y se resuspendieron a 1-2x10⁶ células/ml en Medio Completo (RPMI-1640, 50 µg/ml de gentamicina y glutamina 2 mM) suplementado con suero AB humano al 5%. Se colocaron en microplacas de fondo plano con 24 copas pequeñas (Nunc, NUNC), 1-2x10⁶ células en un volumen final de medio de 1 ml y los antígenos (extracto de *D. pteronyssinus* y las diferentes proteínas purificadas) se añadieron a una concentración final de 10 µg/ml y se incubaron durante 7 días a 37 °C y en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro de flujo BD FACSCalibur (Becton-Dickinson) con capacidad de fluorescencia de cuatro colores. Los resultados se expresaron como un porcentaje de los eventos registrados evaluados por el paquete de programa de Cell Quest Software (Becton-Dickinson). Se incluyeron controles triplicados de cultivos no estimulados en todos los casos. Las proteínas

utilizadas en la prueba fueron las dos proteínas híbridas (QM1 y QM2), dos mezclas equimoleculares de las proteínas purificadas nDer p 1 y nDer p 2 de *D. pteronyssinus* (mezcla natural) y de las proteínas recombinantes rDer p 1 y rDer p 2 aislado de *E. coli* (mezcla recombinante). El extracto de *D. pteronyssinus* se utilizó también como control.

- 5 En la primera etapa se llevó a cabo un barrido de concentraciones de proteína inmunógena para determinar la concentración óptima para la posterior realización de la prueba. En todos los casos se observó que la concentración de proteína que mostró la máxima proliferación (IE%) fue de 10 µg/ml.

Los resultados de la proliferación con los 23 pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* se analizaron mediante el análisis estadístico del diagrama de diagrama de graficación en cajas y las pruebas no paramétricas para las dos muestras emparejadas. Se puede ver a partir del análisis estadístico que el extracto de *D. pteronyssinus* (promedio 12%, intervalo de confianza 95%: 8-20), utilizado como control, tenía una capacidad de estimulación antigénica no significativamente diferente de la de las quimeras QM1 (promedio 15%, intervalo de confianza 95%: 10-25) y QM2 (promedio 13%, intervalo de confianza 95%: 8-17) ($P = 0,121$ y $P = 0,304$, respectivamente). Sin embargo, la inmunogenicidad de QM1 fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que la obtenida con la mezcla natural (promedio 9%, intervalo de confianza 95%: 5-13) o la mezcla recombinante ($P < 0.005$) (promedio 9%, intervalo de confianza 95%: 57 - 14,5). Cuando se compararon las dos quimeras entre sí, se observó que la capacidad para inducir inmunoproliferación fue significativamente mayor en el caso de QM1 ($P < 0,005$) (Figura 13).

A partir de los resultados obtenidos se pudo ver que tanto QM1 como QM2 continuaron manteniendo la capacidad de inducción de inmunoproliferación y esto fue aún mayor en las proteínas fusionadas en comparación con las proteínas de tipo silvestre.

20 Ejemplo 13: Anticuerpos inducidos por comparador QM1 y proteína de la invención QM2 inhiben la unión a IgE de pacientes a alérgenos naturales

Para este propósito se realizó la inmunización de ratones con los híbridos. Se inmunizaron intraperitonealmente ratones BALB/c hembra de seis semanas de edad (Haarlam, Barcelona, España) cinco veces cada quince días, con 10 µg bien sea de la mezcla equimolar de nDer p1 y nDer p2 purificado (nD1D2), QM1 o QM2 adsorbido en hidróxido de aluminio. Se utilizaron seis ratones para cada proteína y los sueros se obtuvieron 10 días después del último refuerzo mediante el sangrado de la vena submandibular, se agruparon y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

En primer lugar, se comprobó si los antisueros elevados por inmunización de ratones con nD1D2, QM1 y QM2 eran reactivos a nD1D2 utilizando experimentos de titulación con ELISA. Los experimentos de ELISA se realizaron como se describe en el Ejemplo 7B, pero se añadieron diluciones de dos veces del antisuero de ratón y luego se incubaron los pozos con anticuerpo IgG de ratón anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, EUA) diluido 1/2000. Después de tres lavados, se midió la actividad de la peroxidasa añadiendo 200 µl/pozo de una solución de o-fenilendiamina (Sigma). Después de 30 minutos, se detuvo la reacción de color añadiendo 50 µl/pozo de H₂SO₄ 3 M, y la densidad óptica se leyó a 492 nm.

Los antisueros elevados por inmunización de ratones con una mezcla equimolar de nDer p1 y nDer p2 (nD1D2), QM1 y QM2 purificados, reaccionaron a nD1D2, mostrando que la inmunización con ambos híbridos conduce a niveles de anticuerpos IgG específicos de nD1D2 más altos en comparación con la inmunización con ND1D2 (Figura 14A).

40 Con el fin de investigar si los ratones IgG frente a las moléculas híbridas podrían inhibir la unión de la IgE en suero del paciente a nD1D2, se realizó un ELISA competitivo con sueros individuales de nueve pacientes alérgicos a ácaros del polvo doméstico (HDM) o un conjunto de sueros (diluido 1/50) de 30 pacientes alérgicos a HDM. Las placas de ELISA (Greiner) se recubrieron (100 ng/pozo) durante la noche con nD1D2 en PBS, se preincubaron con una dilución 1/20 de grupos de suero anti-nD1D2, anti-QM1 y anti-QM2 de 6 ratones. Se utilizó un grupo de suero preinmune como control de inmunización. Después del lavado, las placas se incubaron con sueros individuales (diluidos 1/20 y 1/50) o un grupo de sueros (diluidos 1/50) de pacientes alérgicos a HDM. Se detectaron anticuerpos IgE unidos con un mAb IgE anti-humano marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Southern, Birmingham, AL) diluido 1/2000 y o-fenilendiamina (Sigma). La capacidad de bloqueo se expresó como una señal porcentual de pozos sin suero de ratón añadido.

50 Los anticuerpos específicos de ratón obtenidos mediante inmunización con proteínas híbridas fueron capaces de bloquear la unión de la IgE de 9 pacientes alérgicos a ácaros a la mezcla equimolar de nDer p1 y nDer p2 purificados (nD1D2) de una manera diferente. La inhibición obtenida con anticuerpos anti-nD1D2 de ratón estaba entre 41 y 72% (media 56%), mientras que los anticuerpos anti-QM1 y anti-QM2 de ratón inhibían la unión de IgE en suero a nD1D2 entre 43 y 82% (media 60%) y entre 0 y 45% (media 20%), respectivamente (Tabla I). La inhibición obtenida con anticuerpos anti-nD1D2 de ratón fue ligeramente inferior (aunque no fue estadísticamente diferente, $P = 0,139$) que la obtenida con anticuerpos anti-QM1 de ratón. La inhibición obtenida en el grupo anti-QM2 de ratón fue estadísticamente diferente ($P < 0,01$) a los obtenidos en los grupos anti-nD1D2 y anti-QM1.

Tabla I: Porcentaje de inhibición de la unión de IgE de los pacientes a nD1D2 por anticuerpos IgG de ratón específicos de nD1D2, QM1 y QM2.

Paciente	anti-nD1D2	anti-QM1	anti-QM2
#6	51%	56%	0%
#28	52%	57%	19%
#34	69%	77%	36%
#38	41%	49%	11%
#41	41%	43%	24%
#49	64%	53%	21%
#50	60%	57%	9%
#100	54%	65%	18%
#104	72%	82%	45%
Media	56%	60%§	20%*

§ No hubo diferencias estadísticamente significativas con el grupo anti-nD1D2 (P=0.139).

* Diferencias estadísticamente significativas (P <0,01) con los grupos anti-nD1D2 y anti-QM1.

Adicionalmente, los antisueros boqueadores de ratón se evaluaron utilizando un grupo de sueros de 30 pacientes alérgicos a HDM (Figura 14B). La IgG de ratón elevada contra QM1 y QM2 inhibió la unión de IgE en suero a nD1D2 en 71% y 26%, respectivamente, mientras que la inhibición obtenida con anticuerpos anti-nD1D2 de ratón o sueros preinmunes fue de 65% y 17%, respectivamente (Figura 6B). La inhibición parcial de la reactividad de IgE por IgG inducida por QM2 se debió a la inhibición muy baja de IgE específica para Der p 2. La capacidad de los anticuerpos IgG anti-QM2 para interferir con la unión de IgE de pacientes a Der p 2 fue mucho menor que la de sueros anti-QM1 (13 y 85%, respectivamente). Por el contrario, la inhibición de la unión a IgE a Der p 1 fue comparable en ambos antisueros de ratón (inhibición con anti-QM2: 52%, con anti-QM1: 52%) (Figura 14B).

La unión a IgE de sueros de pacientes alérgicos a HDM a nD1D2 se inhibió por IgG inducida con cada híbrido, aunque la IgG inducida por QM1 mostró una mejor capacidad inhibidora comparada con IgG inducida con QM2.

Tal sólo la inhibición parcial de la reactividad de IgE como se observa con el antisuero inducido por QM2 se ha encontrado también con un mosaico Phl p 2 [(30) Mothes-Luksch, N., Stumvoll, S., Linhart, B., Focke, M., Krant, M-T., Hanswirth, A., Valent, P., Verdino, P., Keller, W., Grote, M., Valenta, R. (2008). Disruption of allergenic activity of the major grass pollen allergen Phl p 2 by reassembly as mosaic protein. *J Immunol* 181, 4864-4873]. Allí, los autores sugirieron que esto podría deberse a la destrucción de epítomos IgE y por lo tanto no se podría inducir IgG contra los epítomos IgE originales. Este podría ser el caso en QM2 ya que la actividad de bloqueo de IgG de la unión de IgE a Der p 2 es muy baja y la reactividad a IgE de este híbrido fue casi abolida.

La baja capacidad de los anticuerpos anti-nD1D2 de ratón para inhibir la unión de IgE a sí misma (60-65%, Tabla I y Figura 14B) fue similar a la informada en el caso de IgE específica de Der p2 [[Chen, K-W., Fuchs, G., Sonneck, K., Gieras, A., Swoboda, I., Douladiris, N., Linhart, B., Jankovic, M., Pavkov, T., Keller, W., Papadopoulos, N.G., Valent, P., Valenta, R., Vrtala, S. (2008). Reduction of the in vivo allergenicity of Der p 2, the major house-dust mite, by genetic engineering. *Mol Immunol.* 45, 2486-2498]. Estas diferencias entre la especificidad de la IgG murínica y las respuestas de la IgE humana a los alérgenos del ácaro podrían estar influenciadas en parte por el modo diferente de inmunización como ha sido descrito anteriormente por Chapman et al. (1987). [Chapman, M.D., Heymann, P.W., Platts-Mills, T.A.E. (1987). Epitope mapping of two major inhalant allergens, Der p 1 and Der p 2, from mites of the genus *Dermatophagoides*. *J Immunol.* 139, 1479-1484]. En ratones, que son inmunizados por inyecciones IP que contienen adyuvantes, los antígenos se procesan extensivamente mientras que en los humanos, que son sensibilizados por inhalación de cantidades diminutas de alérgeno sin adyuvantes, se produce un procesamiento limitado de alérgenos o se produce una forma diferente de procesamiento. Tanto QM1 como QM2 mostraron una mayor capacidad de estimulación de células T e indujeron respuestas de anticuerpos protectores más fuertes que las moléculas separadas.

De lo anterior, se puede concluir que las proteínas híbridas QM1 y QM2 son dos moléculas hipoalérgicas para desarrollar inmunoterapia satisfactoria contra la alergia a *D. pteronyssinus*.

Métodos de administración

- 5 La presente invención se refiere a la quimera hipoadérgica QM2 descrita anteriormente o a péptidos sintéticos derivados de la misma para uso en tratamientos de hiposensibilización en mamíferos. El método de hiposensibilización implica la administración repetida por vía parenteral (subcutánea, intravenosa o intramuscular), inhalación, oral, sublingual, nasal o rectal del alérgeno en cuestión. Las quimeras pueden administrarse solas o en combinación con otros diluyentes y excipientes farmacológicamente aceptables, de acuerdo con la legislación vigente y los procedimientos galénicos aplicables.

Listado de secuencias

Listado de secuencias

- 10 <110> Bial Industrial Farmaceutica S.A.
<120> PROTEÍNAS HÍBRIDAS HIPOALÉRGICAS DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS DEL GRUPO 1 Y 2 PRINCIPALES PARA USO EN EL TRATAMIENTO DE ALERGIAS
<130> BialSpain Acaro
<150> ES 200800827
- 15 <151> 2008-03-25
<160> 17
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 1017
- 20 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> ADN proteína de fusión designada QM1
<400> 1

ES 2 638 271 T3

gtcaaagata	gtgccaatca	tgaaatcaaa	aaagttttgg	taccaggatg	ccatggttca	60
gaaccatgta	tcattcatcg	tggtaaacca	ttccaattgg	aagccgtttt	cgaagccaac	120
caaaactcaa	aaaccgctaa	aattgaaatc	aaagcttcaa	tcgatggttt	agaagttgat	180
gttcccggta	tcgatccaaa	tgcatgccat	tatatgaaat	gtccattggt	taaaggacaa	240
caatatgata	ttaaataaac	atggaatggt	ccgaaaattg	cacccaaatc	tgaaaatggt	300
gtcgtcactg	ttaaagttat	gggtgataat	ggtgttttgg	ccagtgctat	tgctacctgc	360
agtatcaatg	gaaatgctcc	agctgaaatc	gatttgcgac	aatgcgaac	tgctactccc	420
attcgtatgc	aaggaggctg	tggttcatgt	tgggctttct	ctggtggtgc	cgcaactgaa	480
tcagcttatt	tggcttaccg	taatcaatca	ttggatcttg	ctgaacaaga	attagtcgat	540
tgtgcttccc	aacacggttg	taatggtgat	accattccac	gtggtattga	atacatccaa	600
cataatggtg	tcgtccaaga	aagctactat	cgatacgttg	cacgagaaca	atcatgccga	660
cgaccaaata	cacaacgttt	cggtatctca	aactattgcc	aaatttacc	accaaatgca	720
aacaaaattc	gtgaagcttt	ggctcaaacc	cacagcgcta	ttgccgtcat	tattggcatc	780
aaagatttag	acgctttccg	tcattatgat	ggccgaacaa	tcattcaacg	cgataatggt	840
taccaaccaa	actatcacgc	tgtcaacatt	gttggttaca	gtaacgcaca	gggtgtcgat	900
tattggatcg	tacgaaacag	ttgggatacc	aattgggggtg	ataatggta	cggttatttt	960
gctgccaaca	tcgatttgat	gatgattgaa	gaatatccat	atgttgtcat	tctctaa	1017

<210> 2

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión designada QM1

<400> 2

ES 2 638 271 T3

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

ES 2 638 271 T3

Asn Lys Ile Arg Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val
245 250 255

Ile Ile Gly Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg
260 265 270

Thr Ile Ile Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val
275 280 285

Asn Ile Val Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val
290 295 300

Arg Asn Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe
305 310 315 320

Ala Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val
325 330 335

Ile Leu

<210> 3

5 <211> 1050

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN proteína de fusión designada QM2

10 <400> 3

ES 2 638 271 T3

gatcaagtcg atgtcaaaga ttgtgccaat catgaaatca aaaaagtttt ggtaccagga 60
 tgccatgggt cagaacccatg tatcattcat cgtggtaaac cattccaatt ggaagccggt 120
 ttcgaagcca accaaaactc aaaaaccgct aaaattgaaa tcaaagcttc aatcgatggt 180
 ttagaagttg atgttcccgg tatcgatcca aatggctgca gtatcaatgg aaatgctcca 240
 gctgaaatcg atttgcgaca aatgcgaact gtcactccca ttcgatgca aggaggctgt 300
 ggttcatggt gggctttctc tgggtgtgce gcaactgaat cagcttattt ggcttaccgt 360
 aatcaatcat tggatcttgc tgaacaagaa ttagtcgatt gtgcttccca acacggttgt 420
 aatggtgata ccattccacg tggattgaa tacatccaac ataatggtgt cgtccaagaa 480
 agctactatc gatacgttgc acgagaacaa tcatgccgac gaccaaatgc acaacgtttc 540
 ggtatctcaa actattgcca aatttaccba ccaaatgcaa acaaaattcg tgaagctttg 600
 gctcaaacc acagcgctat tgccgtcatt attggcatca aagatttaga cgctttccgt 660
 cattatgatg gccgaacaat cattcaacgc gataatgggt accaaccaaa ctatcacgct 720
 gtcaacattg ttggttacag taacgcacag ggtgtcgatt attggatcgt acgaaacagt 780
 tgggatacca attgggggtga taatggttac gggtattttg ctgccaacat cgatttgatg 840
 atgattgaag aatatccata tgttgtcatt ctccctagge attacatgaa aagcccattg 900
 gttaaaggac aacaatatga tattaatat acatggaatg ttccgaaaat tgcacaaaa 960
 tctgaaaatg ttgtcgtcac tgttaaagtt atgggtgata atgggtgttt ggctgtgct 1020
 attgttactc atgctaaaat ccgcgattaa 1050

<210> 4

<211> 349

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión designada QM2

<400> 4

ES 2 638 271 T3

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

ES 2 638 271 T3

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

Val Ile Ile Gly Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly
 210 215 220

Arg Thr Ile Ile Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala
 225 230 235 240

Val Asn Ile Val Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile
 245 250 255

Val Arg Asn Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr
 260 265 270

Phe Ala Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val
 275 280 285

Val Ile Leu Pro Arg His Tyr Met Lys Ser Pro Leu Val Lys Gly Gln
 290 295 300

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

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

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

<210> 5

<211> 32

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo para amplificación de Der p 1

<400> 5

actgacaggc ctcgtccatc atcgatcaaa ac 32

10 <210> 6

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> cebador inverso para amplificación de Der p 1

<400> 6
cggaattcct aggttagaga atgacaacat atgg 34
<210> 7
<211> 27
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador directo para amplificación de Der p 2
<400> 7
10 cgggatccga tcaagtcgat gtcaaag 27
<210> 8
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> cebador inverso para amplificación de Der p 2
<400> 8
cggaattcct aatcgcggat ttagc 26
<210> 9
20 <211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador directo utilizado para amplificación de Der p 2
25 <400> 9
cgggatccgt caaagatagt gccaatc 27
<210> 10
<211> 32
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador inverso utilizado para amplificación de Der p 2
<400> 10
acggatctgc aggttagcaat agcactggcc aa 32
35 <210> 11
<211> 34
<212> ADN

ES 2 638 271 T3

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador inverso utilizado para la amplificación de Fragmento 1
<400> 11
5 ccgaattccc taggctgcag ccatttgat cgat 34
<210> 12
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> cebador inverso utilizado para la amplificación de Fragmento 2
<400> 12
cacctagga gaatgacaac atatg 26
<210> 13
15 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador directo utilizado para la amplificación de Fragmento 3
20 <400> 13
cacctaggca ttacatgaaa agccca 26
<210> 14
<211> 909
<212> ADN
25 <213> Escherichia coli
<400> 14

ES 2 638 271 T3

```

cgtccatcat cgatcaaac ttttgaagaa tacaaaaaag ccttcaacaa aagttatgct      60
accttcgaag atgaagaagc tgcccgtaaa aactttttgg aatcagtaaa atatgttcaa      120
tcaaacggag gtgccatcaa ccatttgtcc gatttgtcgt tggatgaatt caaaaaccga      180
ttcttgatga gtgcagaagc ttttgaacac ctcaaaaactc aattcgattt gaatgctgaa      240
actaacgcct gcagtatcaa tggaaatgct ccagctgaaa tcgatttgcg acaaatgcga      300
actgtcactc ccattcgtat gcaaggaggc tgtggttcat gttgggcttt ctctggtggt      360
gccgcaactg aatcagctta tttggcttac cgtaatcaat cattggatct tgctgaacaa      420
gaattagtcg attgtgcttc ccaacacggt tgtaatggtg ataccattcc acgtggtatt      480
gaatacatcc aacataatgg tgcgtccaa gaaagctact atcgatacgt tgcacgagaa      540
caatcatgcc gacgaccaa tgcaaacgt ttcggtatct caaactattg ccaaatttac      600
ccaccaaagc caaacaaaat tcgtgaagct ttggctcaa cccacagcgc tattgccgtc      660
attattggca tcaaagattt agacgctttc cgtcattatg atggccgaac aatcattcaa      720
cgcgataatg gttaccaacc aaactatcac gctgtcaaca ttgttgggta cagtaacgca      780
caggggtgtg attattggat cgtacgaaac agttgggata ccaattgggg tgataatggt      840
tacggttatt ttgctgcaa catcgatttg atgatgattg aagaatatcc atatgttctc      900
attctctaa                                     909

```

<210> 15

<211> 302

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 15

ES 2 638 271 T3

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

ES 2 638 271 T3

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

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

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

<210> 16

<211> 390

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 16

```

gatcaagtcg atgtcaaaga ttgtgccaat catgaaatca aaaaagtttt ggtaccagga      60
tgccatgggt cagaaccatg tatcattcat cgtggtaaac cattccaatt ggaagccggt      120
ttcgaagcca accaaaactc aaaaaccgct aaaattgaaa tcaaagcttc aatcgatggt      180
ttagaagttg atgttcccggt tatcgatcca aatgcatgcc attatatgaa atgtccattg      240
gttaaaggac aacaatatga tattaatat acatggaatg ttccgaaaat tgcacaaaaa      300
tctgaaaatg ttgtogtcac tgtaaagtt atgggtgata atgggtgttt ggcctgtgct      360
attgctactc atgctaaaat ccgcgattaa                                     390
    
```

<210> 17

<211> 129

10 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 17

ES 2 638 271 T3

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
 1 5 10 15
 Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly
 20 25 30
 Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Val Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Lys
 35 40 45
 Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp
 50 55 60
 Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Lys Cys Pro Leu
 65 70 75 80
 Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
 85 90 95
 Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly
 100 105 110
 Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg
 115 120 125
 Asp

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido con actividad alérgica reducida que comprende fragmentos de las secuencias de aminoácidos de los alérgenos del ácaro *D. pteronyssinus* del grupo 1 y grupo 2 Der p 1 y Der p 2 en los cuales las secuencias carecen de uno o más epítopos de unión de anticuerpo IgE, dichos fragmentos tienen por lo menos 50 residuos de aminoácidos en longitud, caracterizado porque el polipéptido tiene al menos 95% de homología con la SEQ ID NO: 4, y no muestra reconocimiento de IgE en sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*.
2. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido tiene mayor inmunogenicidad que los alérgenos de proteínas de tipo silvestre.
- 10 3. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que al menos uno de los epítopos de unión de anticuerpo IgE en la secuencia de alérgenos del grupo 2 ha sido borrado mediante la eliminación de al menos un puente disulfuro.
4. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, en el que por lo menos un puente disulfuro se ha eliminado por sustitución de al menos uno de los residuos de cisteína que forman el puente disulfuro con un residuo de aminoácido alternativo.
- 15 5. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4, en el que por lo menos un puente disulfuro se ha eliminado por interrupción de la secuencia del alérgeno del grupo 2 mediante la inserción de una secuencia de aminoácidos adicional.
6. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la secuencia de aminoácidos del alérgeno del grupo 2 se interrumpe mediante la inserción de un fragmento de la secuencia de aminoácidos del alérgeno del grupo 1.
- 20 7. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el fragmento de la secuencia de aminoácidos del alérgeno del grupo 1 es el fragmento de los residuos 5 a 222 del alérgeno del grupo 1 maduro.
8. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 5, en el que se ha sustituido al menos uno de los residuos de cisteína en las siguientes posiciones de la proteína de alérgeno de grupo 2 maduro de longitud completa: 8 y 119.
- 25 9. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que al menos uno de los residuos de cisteína sustituidos ha sido sustituido con un residuo de serina.
10. Polipéptido con actividad alérgica reducida que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 95% de homología con SEQ ID NO: 4, en la que el polipéptido no muestra reconocimiento de IgE en sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*.
11. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
- 30 12. Polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO. 4.
13. Polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido induce una respuesta de IgG más fuerte que una mezcla de los alérgenos de proteínas de tipo silvestre.
- 35 14. Polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido exhibe mayor capacidad de estimulación de células T que las moléculas de tipo silvestre separadas.
15. Polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
16. Polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende la SEQ ID NO: 3.
- 40 17. Vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la reivindicación 15 o la reivindicación 16.
18. Célula huésped transformada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 17.
19. Método para producir un polipéptido, caracterizado porque comprende cultivar una célula huésped de la reivindicación 18 y aislar y purificar el polipéptido producido por la célula huésped.
- 45 20. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o el vector de expresión de la reivindicación 17 para uso en el tratamiento o prevención de la alergia.
21. Preparación farmacéutica caracterizada porque comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o vector de expresión de la reivindicación 17 y opcionalmente, un excipiente o adyuvante farmacológicamente aceptable.

22. Preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 21 para la administración subcutánea, sublingual, oral, nasal, rectal, tópica, inhalada o parenteral.

cgtccatcatcgatcaaaaacttttgaagaatacaaaaaagccttcaacaaaagttatgct
 R P S S I K T F E E Y K K A F N K S Y A
 accttcgaagatgaagaagctgcccgtaaaaactttttggaatcagtaaaaatagttcaa
 T F E D E E A A R K N F L E S V K Y V Q
 tcaaacggagggtgccatcaaccatttgtccgatttgtcgttggatgaattcaaaaaccga
 S N G G A I N H L S D L S L D E F K N R
 ttcttgatgagtgacagaagcttttgaacacctcaaaactcaattcgatttgaatgctgaa
 F L M S A E A F E H L K T Q F D L N A E
 actaacgctgcagtatcaatggaaatgctccagctgaaatcgatttgcgacaaatgcca
 T N A C S I N G N A P A E I D L R Q M R
 actgtcactcccattcgatgcaaggaggetgtggttcatggtgggctttctctggtgtt
 T V T P I R M Q G G C G S C W A F S G V
 gccgcaactgaatcagcttatttggcttacggtaataatcattggatcttgcgaacaa
 A A T E S A Y L A Y R N Q S L D L A E Q
 gaattagtcgattgtgcttcccaacacgggttgtaatggatgataccattccacgtggatt
 E L V D C A S Q H G C N G D T I P R G I
 gaatacatccaacataatgggtgctcgtccaagaaagctactatcgatacgttgcacgagaa
 E Y I Q H N G V V Q E S Y Y R Y V A R E
 caatcatgccgacgaccaaatagcacaacgtttcggatctcaaaactattgccaaatttac
 Q S C R R P N A Q R F G I S N Y C Q I Y
 ccaccaaatagcaacaaaattcgtgaagctttggctcaaaccacagcgctattgcccgtc
 P P N A N K I R E A L A Q T H S A I A V
 attattggcatcaaagatttagacgctttccgctcattatgatggccgaacaatcattcaa
 I I G I K D L D A F R H Y D G R T I I Q
 cgcgataatggttaccaaccaaactatcacgctgtcaacattgttggttacagtaacgca
 R D N G Y Q P N Y H A V N I V G Y S N A
 cagggtgctgattattggatcgtaacgaaacagttgggataccaattggggtgataatggt
 Q G V D Y W I V R N S W D T N W G D N G
 tacggttatttgcgtccaacatcgatttggatgatgattgaagaatatccatagttgtc
 Y G Y F A A N I D L M M I E E Y P Y V V
 attctctaa
 I L -

FIG. 1

gatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaaagttttgggtaccagga
D Q V D V K D (C) A N H E I K K V L V P G
tgccatgggttcagaaccatgtatcattcatcggtgtaaaccattccaattggaagccggt
(C) H G S E P (C) I I H R G K P F Q L E A V
ttcgaagccaacccaaaactcaaaaaccgctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatggt
F E A N Q N S K T A K I E I K A S I D G
ttagaagttgatgttcccggtatcgatccaaatgcatgccattatgaaatgtccattg
L E V D V P G I D P N A (C) H Y M K (C) P L
gttaaaggacaacaatatgatattaaatatacatggaatggtccgaaaattgcacaaaa
V K G Q Q Y D I K Y T W N V P K I A P K
tctgaaaatggtgctcactgttaaagttatgggtgataatgggtgttttggcctgtgct
S E N V V V T V K V M G D N G V L A (C) A
attgctactcatgctaaaatccgcgattaa
I A T H A K I R D -

FIG. 2

QM1

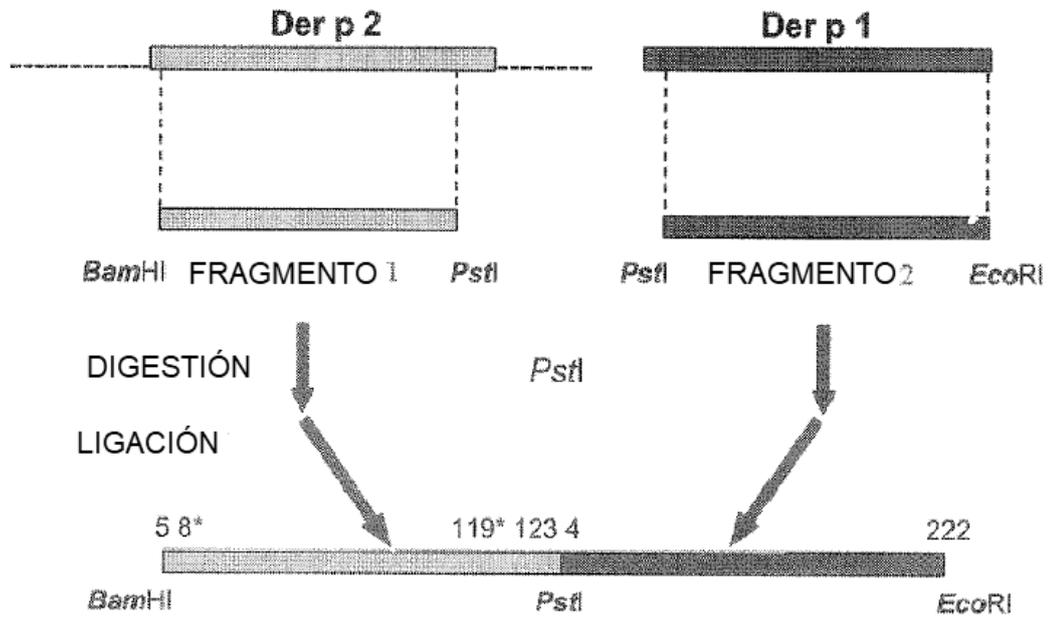


FIG. 3

gtcaaagatagtgccaatcatgaaatcaaaaaagttttggtaccaggatgccatggttca
 V K D S A N H E I K K V L V P G C H G S
 gaaccatgtatcattcatcgtggtaaacattccaattggaagccggttttcgaagccaac
 E P C I I H R G K P F Q L E A V F E A N
 caaaactcaaaaaccggtaaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggttagaagtggat
 Q N S K T A K I E I K A S I D G L E V D
 gttcccggtatcgatccaaatgcatgccattatatgaaatgtccattgggttaaaggacaa
 V P G I D P N A C H Y M K C P L V K G Q
 caatatgatattaataatatacatggaatgttccgaaaattgcacccaaaatctgaaaatgtt
 Q Y D I K Y T W N V P K I A P K S E N V
 gtcgtcactgttaaagttatgggtgataatgggtgttttggccagtgctattgctacctgc
 V V T V K V M G D N G V L A S A I A T C
 agtatcaatggaatgctccagctgaaatcgatttgcgacaaatgccaactgtcactccc
 S I N G N A P A E I D L R Q M R T V T P
 attcgtatgcaaggaggctgtgggtcatgttgggtttctctgggtgttggccgaactgaa
 I R M Q G G C G S C W A F S G V A A T E
 tcagcttatttggcttaccgtaatcaatcattggatcttggctgaacaagaattagtcgat
 S A Y L A Y R N Q S L D L A E Q E L V D
 tgtgcttcccaacacgggttgtaatgggtgataccattccacgtgggtattgaatacatccaa
 C A S Q H G C N G D T I P R G I E Y I Q
 cataatgggtgctcgtccaagaaagctactatcgatagcttgcacgagaacaatcatgccga
 H N G V V Q E S Y Y R Y V A R E Q S C R
 cgaccaaatgcacaacgtttccggtatctcaaaactattgccaaatttaccacccaaatgca
 R P N A Q R F G I S N Y C Q I Y P P N A
 acaaaaattcgtgaagctttgggtcaaaccacagcgctattgcccgtcattattggcatc
 N K I R E A L A Q T H S A I A V I I G I
 aaagatttagacgctttccgctcattatgatggccgaacaatcattcaacgcgataatgggt
 K D L D A F R H Y D G R T I I Q R D N G
 tacciaacaaactatcacgcigtcaacattggttgggttacagtaacgcacaggggtgtcgat
 Y Q P N Y H A V N I V G Y S N A Q G V D
 tattggatcgtacgaaacagttgggataccaattgggggtgataatgggttacgggttatttt
 Y W I V R N S W D T N W G D N G Y G Y F
 gctgccaacatcgatttgatgatgattgaagaatatccatagttgtcattctctaa
 A A N I D L M M I E E Y P Y V V I L -

FIG. 4

QM 2

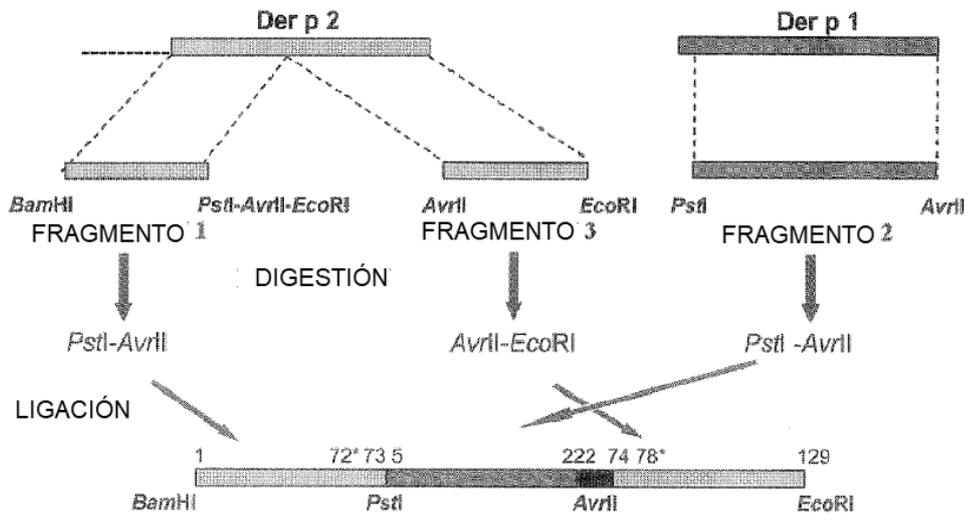


FIG. 5

gatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaaagttttggtaccagga
 D Q V D V K D C A N H E I K K V L V P G
 tgccatgggttcagaaccatgtatcattcatcgtggtaaacattccaattggaagccgtt
 C H G S E P C I I H R G K P F Q L E A V
 ttcgaagccaacaaaactcaaaaaccgctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatggt
 F E A N Q N S K T A K I E I K A S I D G
 ttagaagttgatgttcccggatcgatccaaatggctgcagtatcaatggaaatgctcca
 L E V D V P G I D P N G C S I N G N A P
 gctgaaatcgatttgcgacaaatgccaactgtcactcccattcgtatgcaaggaggctgt
 A E I D L R Q M R T V T P I R M Q G G C
 ggttcatgtttgggctttctctggtgttgcgcaactgaatcagcttatttggcttaccgt
 G S C W A F S G V A A T E S A Y L A Y R
 aatcaatcattggatcttctgctgaacaagaattagtcgattgtgcttccaacacggttgt
 N Q S L D L A E Q E L V D C A S Q H G C
 aatgggtgataaccattccacgtggatttgaatacatccaacataatgggtgctccaagaa
 N G D T I P R G I E Y I Q H N G V V Q E
 agctactatcgatacgttgcacgagaacaatcatgccgacgaccaaatgcacaacgtttc
 S Y Y R Y V A R E Q S C R R P N A Q R F
 ggtatctcaaactattgccaatttaccaccaaattgcaacaaaattcgtgaagctttg
 G I S N Y C Q I Y P P N A N K I R E A L
 gctcaaaccacagcgctattgccgtcattattggcatcaaagatttagacgctttccgt
 A Q T H S A I A V I I G I K D L D A F R
 cattatgatggccgaacaatcattcaacgcgataatggttaccaaccaaactatcacgct
 H Y D G R T I I Q R D N G Y Q P N Y H A
 gtcaacattgttggttacagtaacgcacaggggtgtcgattattggatcgtacgaaacagt
 V N I V G Y S N A Q G V D Y W I V R N S
 tgggataccaattgggggtgataatgggttacgggtatlttgctgccaacatcgatttgatg
 W D T N W G D N G Y G Y F A A N I D L M
 atgattgaagaatatccatatgttgcattctccctaggcattacatgaaaagcccattg
 M I E E Y P Y V V I L P R H Y M K S P L
 gttaaaggacaacaatatgatattaatatatggaatgttccgaaaattgcaccaaa
 V K G Q Q Y D I K Y T W N V P K I A P K
 tctgaaaatgttgcgtcactgttaaagttatgggtgataatgggtgttttggcctgtgct
 S E N V V V T V K V M G D N G V L A C A
 attgttactcatgctaaaatccgcgattaa
 I V T H A K I R D -

FIG. 6

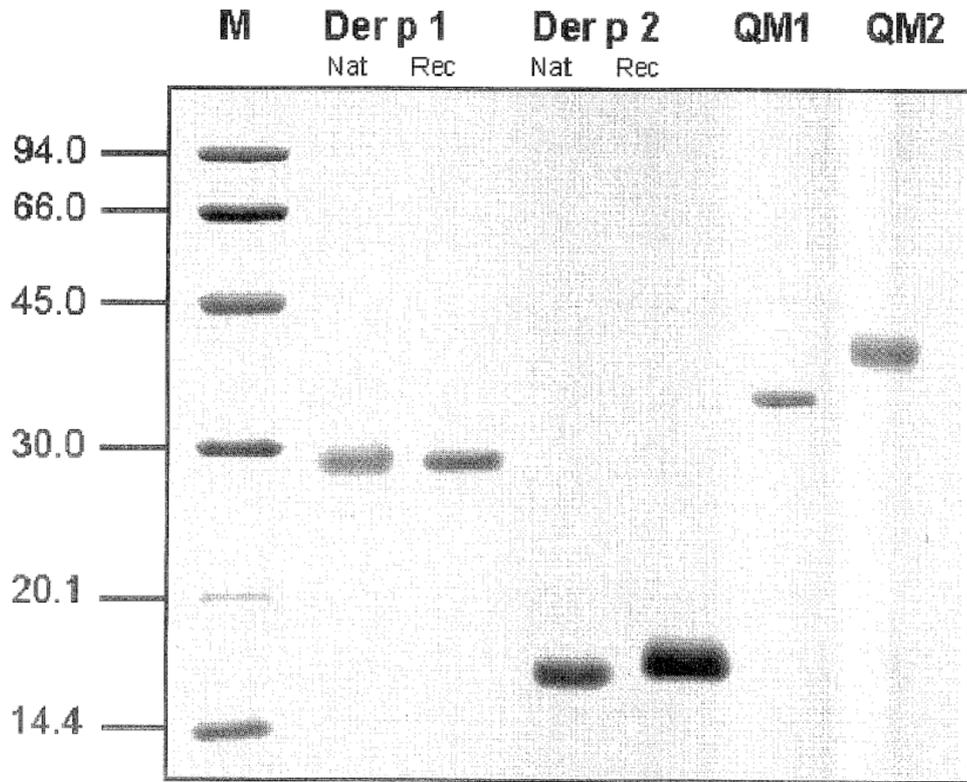


FIG. 7

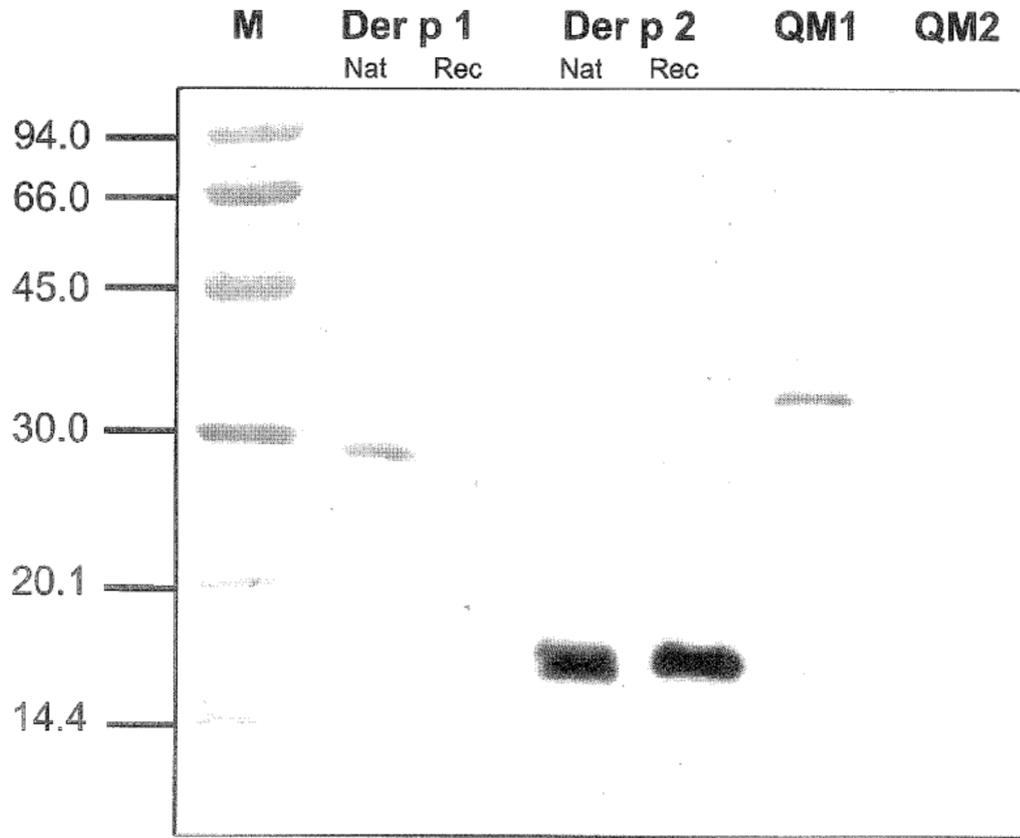


FIG.8

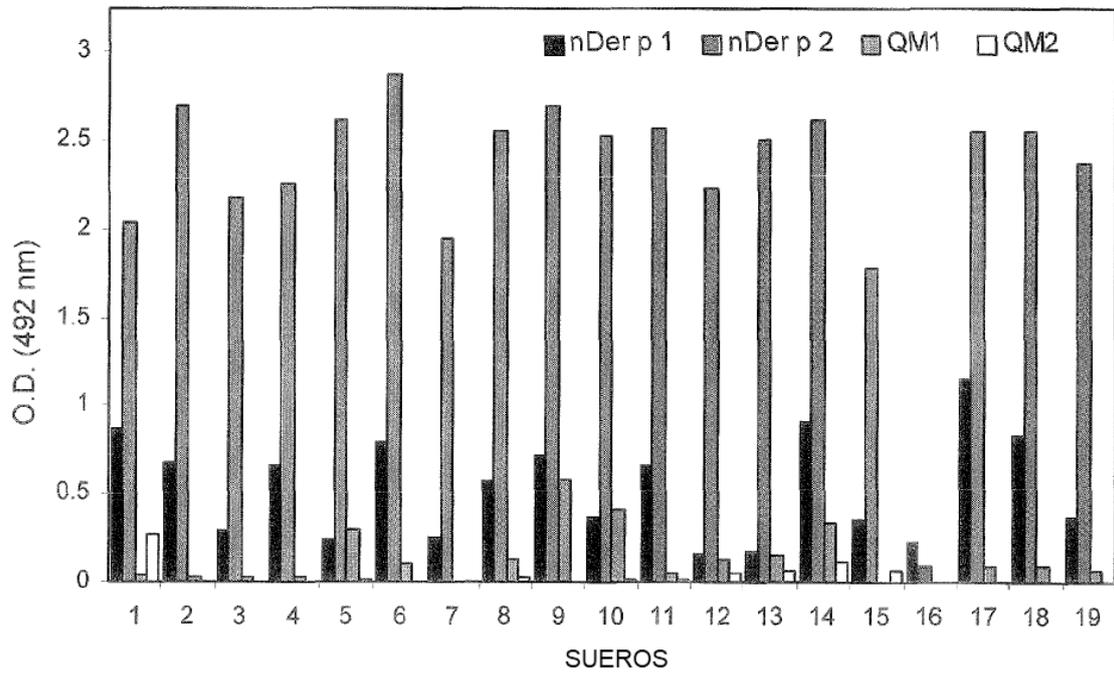


FIG.9

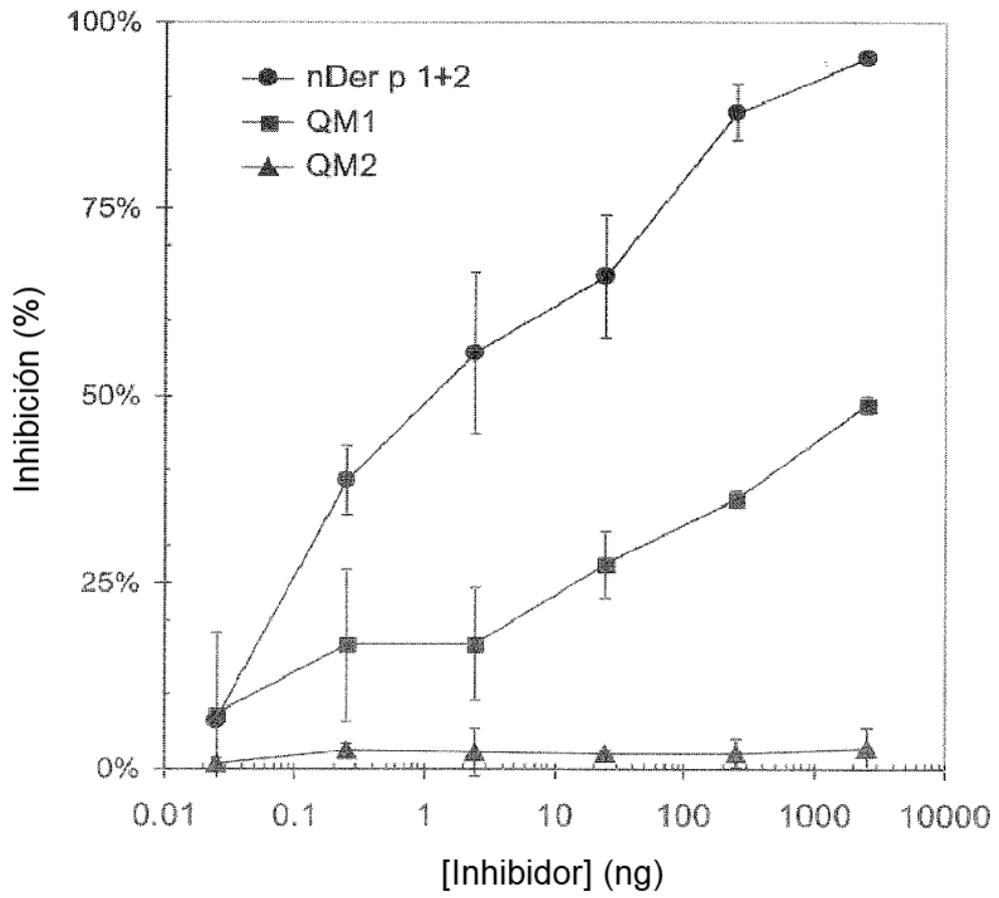


FIG.10

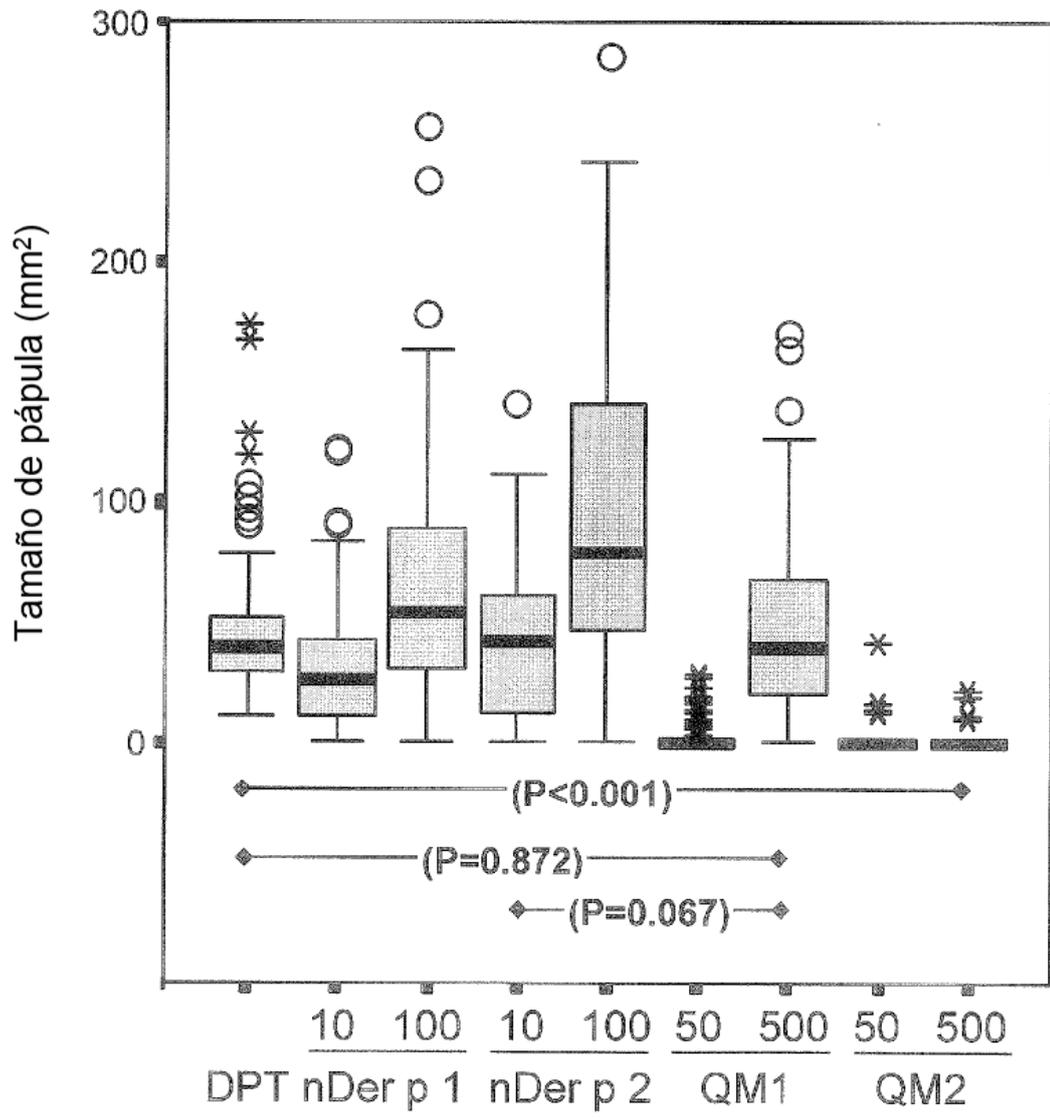


FIG.11

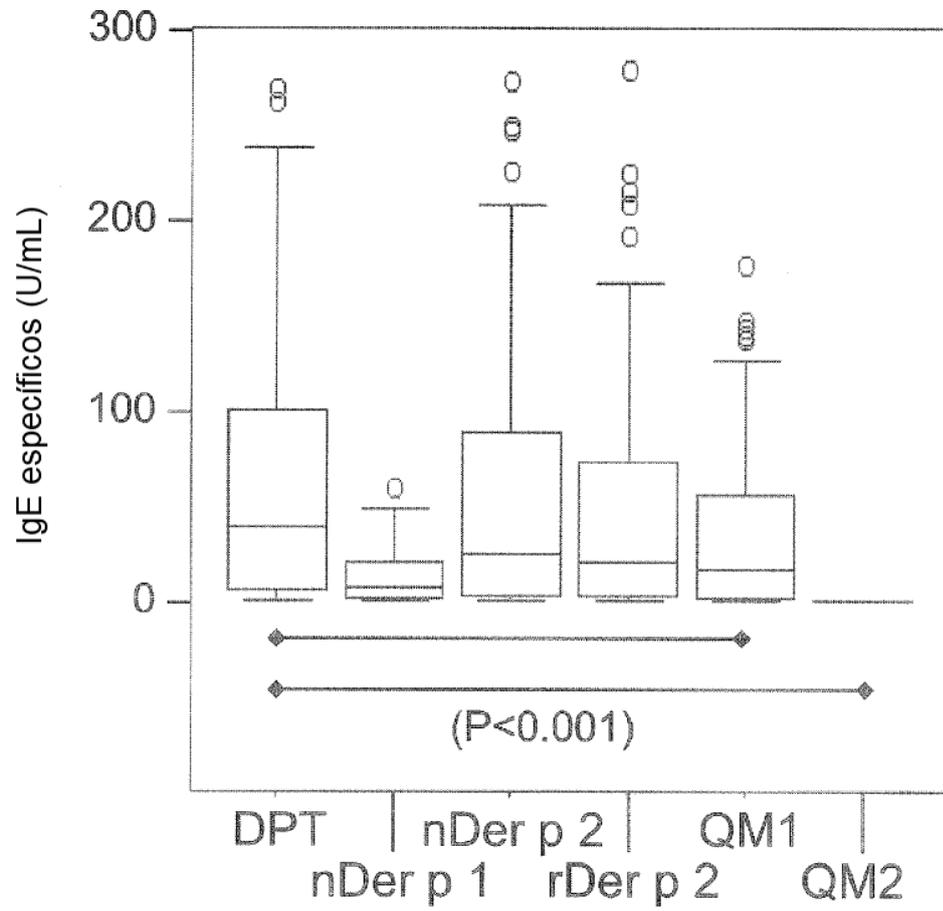


FIG. 12

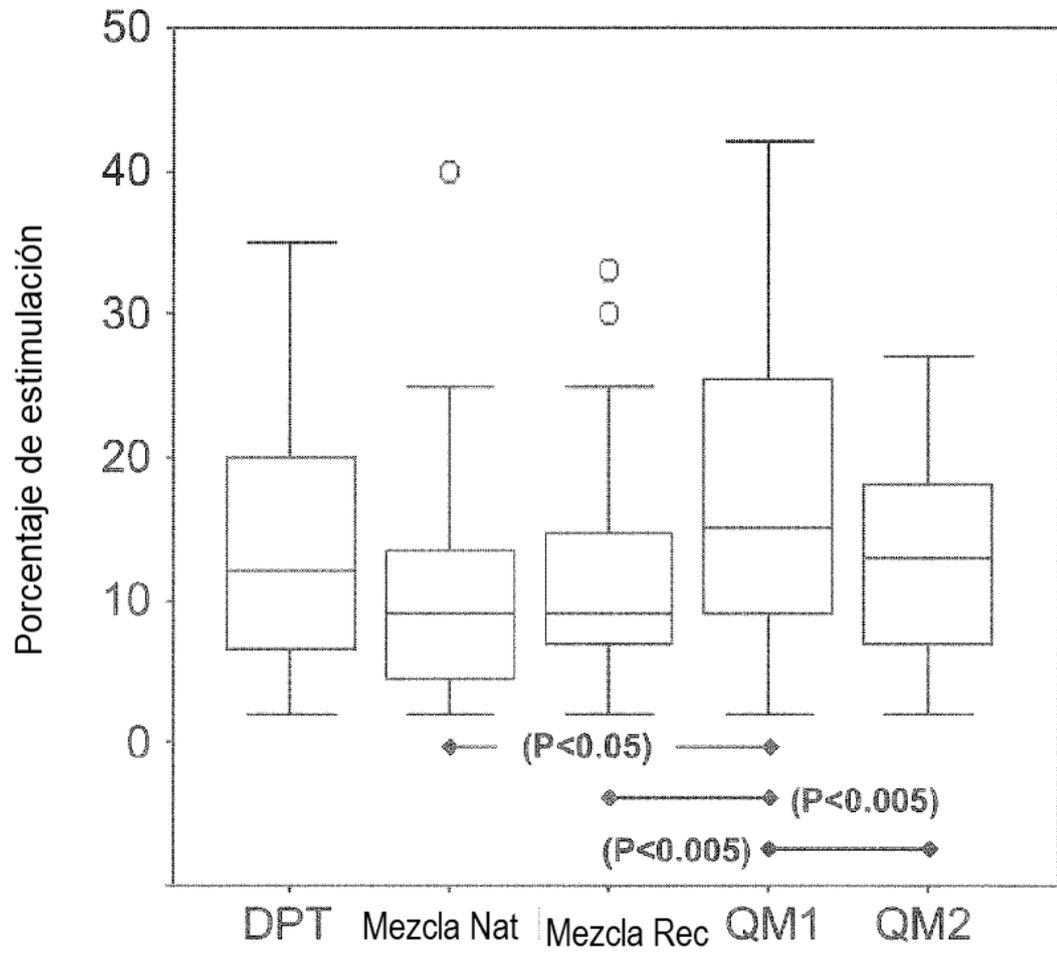


FIG. 13

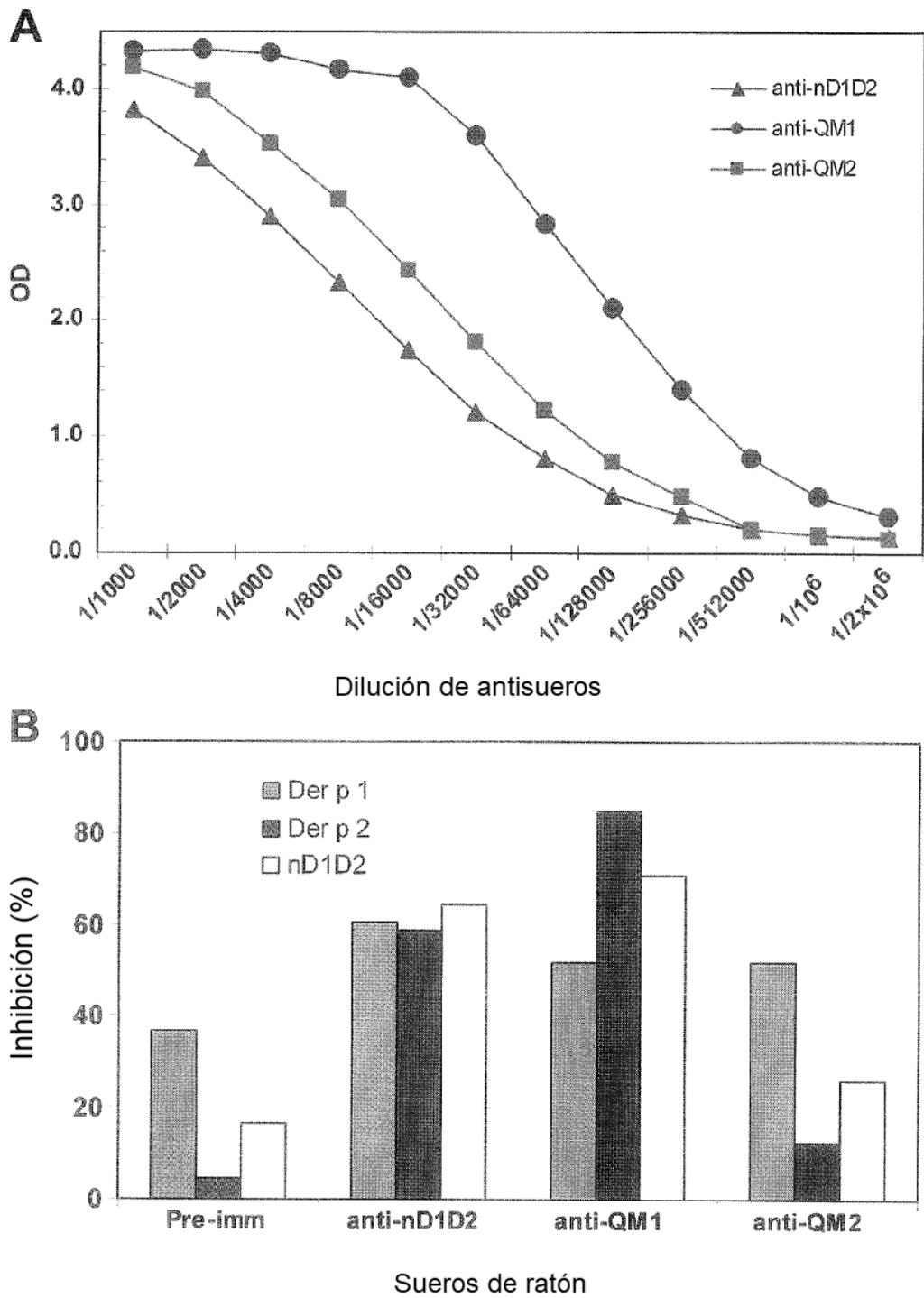


FIG. 14