

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 308**

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 11179765 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** EP 2436691

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, ES**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 638 308 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

5

Campo de la invención

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 para 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 también a una célula anfitriona transformada con dicho vector de expresión. Adicionalmente, la invención se refiere a un método para producir el polipéptido de la invención. La presente invención también se refiere a el polipéptido o vector de expresión para uso en el tratamiento o prevención de alergia, así como también a una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido de la invención o vector de expresión de la invención. La invención también se refiere a el uso de el polipéptido o vector de expresión de la invención, para la preparación de una composición para uso en el tratamiento o prevención de alergia.

10

15

Estado de la técnica

La alergia es un trastorno hereditario o adquirido específico en la capacidad de reaccionar a las sustancias extrañas que normalmente son inofensivas (alérgenos). Las alergias están relacionadas con reacciones inflamatorias de los órganos afectados (piel, conjuntivo, nariz, faringe, membrana de mucosa bronquial, tracto gastrointestinal). Los síntomas inmediatos de la enfermedad incluyen rinitis, conjuntivitis, dermatitis, asma y choque anafiláctico; y las manifestaciones crónicas de la enfermedad incluyen reacciones retardadas de asma y dermatitis atópica. Las alergias de tipo I son un importante problema de salud en los países industrializados. Este tipo de alergia es provocada por la formación de anticuerpos IgE contra antígenos transportados por el aire. Estos anticuerpos IgE interactúan con los mastocitos y basófilos, mediadores biológicos de liberación tales como histamina, que produce 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].

20

25

30

35

40

45

En la actualidad, el único tratamiento para la alergia que se dirige a la causa de la enfermedad es la inmunoterapia específica a alérgeno (SIT). La SIT es un tratamiento efectivo para enfermedades alérgicas provocadas por alérgenos específicos y, básicamente, implica la modulación de la respuesta inmunitaria del paciente mediante administración regular en concentraciones crecientes de las proteínas que producen la alergia (extractos alérgicos). Aunque diversos estudios han demostrado la eficacia clínica de esta inmunoterapia específica a alérgeno, los mecanismos inmunológicos de la misma no se entienden completamente.

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

Lo que se sabe hasta ahora es que dosis altas de alérgenos inyectados inducen síntesis elevada de IL-12 mediante células que presentan antígenos, por ejemplo células dendríticas, que promueven preferencialmente el desarrollo de células T auxiliares vírgenes (nT_H) en células T_H1 o T_H0 . Esto permite que la respuesta inmunitaria alérgica relacionada con células T_H2 conmute a una respuesta T_H1/T_H0 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 inmunitaria se refuerza por la inducción de la tolerancia (anergia clonal o supresión clonal) de células de memoria T_H2 bajo la influencia de células T de regulación (T_R1) que producen las citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β [Akdis, C.A., Joss, A., Akdis, M., and Blaser, K. (2001). Mechanism of IL-10 induced cell inactivation in allergic inflammation and normal response to allergens. *Int. Arch Allergy Immunol.* 124; 180-182]. La disminución en la activación y proliferación de células T_H2 resulta en una menor producción de IL-4, y de IgE por las células B. La disminución en la activación e infiltración de las células T_H2 en la membrana de mucosa nasal bronquial resulta en menor síntesis de IL-5, lo que permite una reducción en la infiltración de eosinófilos que lleva a una gran reducción en la liberación de mediadores inflamatorios tales como la MBP (proteína básica principal) y ECP (proteína catiónica de eosinófilos). Los nuevos clones específicos a alérgenos de células T del fenotipo predominante T_H0 producen una mezcla de citoquinas T_H1 y T_H2 que promueven la producción mediante las células B de una gran cantidad de anticuerpos IgG específicos a alérgenos. Adicionalmente, los altos niveles de IL-10 inducen la síntesis elevada de anticuerpos IgG4 específicos a alérgeno. Estos dos tipos de anticuerpos específicos pueden actuar como anticuerpos de bloqueo que impiden el entrecruzamiento de receptores unidos IgE anclados sobre los mastocitos, y de esta manera la inhibición de la desgranulación y la liberación de histamina [Moverare, R. (2003). Immunological

50

55

60

65

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 que presentan antígenos, y esto suprime la reacción inmunitaria a los alérgenos.

Los extractos alérgicos aislados de fuentes naturales son mezclas complejas de proteínas y otras moléculas. La composición, y por lo tanto la alergenidad de los mismos, 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 ácaros, etc. Adicionalmente, algunos extractos pueden contener una concentración insuficiente de los principales alérgenos, que pueden estar contaminados con componentes no deseables, a los que el paciente no es alérgico, o ambos problemas pueden estar presentes. La inmunoterapia actual utiliza extractos alérgicos exclusivamente completos, y esto tiene una serie de inconvenientes tales como:

- Reacciones adversas graves debido a la reactividad de la vacuna con los anticuerpos IgE anclados en las células efectoras.

- Ha comenzado aparición, después de un 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 eficaz como se desearía

Una mejor comprensión de la patogénesis de la alergia y los mecanismos de la inmunoterapia específica ha permitido una solución a los problemas mencionados anteriormente que se van a abordar. Una comprensión de la influencia de la presentación del antígeno mediada por IgE en la respuesta T_H2 específica del alérgeno ha aumentado los esfuerzos para producir alérgenos que no se unan a IgE. Dicho alérgeno estará dirigido a células T por un mecanismo de captura de antígeno basado en la fagocitosis/pinocitosis, evitando entrecruzamiento IgE y la presentación del antígeno dependiente de IgE. Esto induce un equilibrio en la producción de citoquinas T_H0 o T_H1 mediante las células T, e IgE inferior y una mayor producción de IgG por las células B; que conducen a la inducción de tolerancia de las células T de tipo T_H2 sin riesgo de anafilaxis.

El progreso de técnicas recombinantes para obtener alérgenos y derivados de alérgenos ha facilitado un gran aumento en la capacidad de desarrollar nuevas vacunas para el tratamiento de la alergia. La dificultad que enfrentan los que trabajan en este campo es el de reducir la unión a IgE del antígeno, mientras que se conserva su reconocimiento por las células T. Las moléculas de alérgeno, que tienen una menor capacidad de unión a IgE pero mantienen su reactividad con las células T, podrían ser administradas en dosis más altas que permitan inmunoterapia más rápida y más segura con menos inyecciones. Adicionalmente, se pueden producir alérgenos recombinantes a gran escala en tanques de fermentación, utilizando sistemas de expresión microbianos, y la purificación de los mismos es más eficiente que la de sus equivalentes naturales.

Los ácaros pertenecen al grupo de artrópodos y tienen un tamaño de menos de 0.3 mm; que se pueden encontrar en diferentes ambientes, que incluyen polvo de la casa. Se han reconocido como responsables de las alergias al polvo doméstico desde finales de 1960.

Los principales ácaros responsables de producir síntomas alérgicos están incluidos en el orden Astigmata y su distribución taxonómica es como sigue:

- Reino Animal
- Filum Artrópodos
- Clase Aracnida
- Subclase Acari
- Orden ASTIGMATA
- Familia Glycyphagidae
- Subfamilia Glycyphagidae
- Género Blomia
 - B. freemani
 - B. kulagini
 - B. tropicales
- Género Glycyphagus
 - G. domesticus
- Género Lepidoglyphus
 - L. destructor
- Subfamilia Labidophorinae
- Género Gollería

- G. fusca
- Familia Pyroglyphidae
- Subfamilia Dermatophagoidinae
- Género Dermatophagoides
- 5 D. evansi
- D. faringe
- D. microceras
- D. pteronyssinus
- D. siboney
- 10 D. neotropicalis
- Género Hirstia
- H. domicola
- Género Malayoglyphus
- M. carmelitas
- 15 Subfamilia Pyroglyphinae
- Género Euroglyphus
- E. maynei
- Familia Acaridae
- Género Acarus
- 20 A. siro
- Género Tyrophagus
- T. longior
- T. putrescentiae
- Familia Chortoglyphidae
- 25 Género Chortoglyphus
- C. arcuatus

Las especies que con mayor frecuencia producen alergia son aquellas del género Dermatophagoides. Sus condiciones óptimas de crecimiento son una temperatura de aproximadamente 20°C y humedad relativa por encima del 70%. Un entorno con una humedad de menos de 50-60% limita su presencia en una medida extraordinaria; por lo tanto son muy abundantes en las regiones costeras templadas, y rara vez presente en zonas montañosas secas, particularmente por encima de una altitud de 1500 m. Por lo tanto, en las casas, la concentración de ácaros también aumenta en épocas de cambio estacional (primavera y otoño), con lluvia y temperaturas suaves, y usualmente disminuye durante el verano (clima cálido y seco) y el invierno (clima frío y seco).

Los ácaros del polvo domésticos son organismos complejos que producen miles de diferentes proteínas y otras macromoléculas. Son una de las fuentes más frecuentes de alergia y se ha estimado que de los 50 millones de personas en la UE que sufren de alergias, el 15% están sensibilizados a los ácaros, con aproximadamente 10-15 millones de personas que se estima no se han diagnosticado correctamente. Otros datos indican que hasta el 80% de los niños asmáticos podrían ser sensibles 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 ha descrito que cada uno de los 14 alérgenos de los ácaros más comunes, D. pteronyssinus y D. farinae, 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 los alérgenos del Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos (<http://www.allergen.org/Allergen.aspx>) de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (U.I.S.) son:

- Der p 1
- Nombre bioquímico: proteasa de cisteína, 28 kDa (SDS-PAGE) con una actividad proteolítica que puede provocar un efecto adyuvante en procesos alérgicos.
- Alergenicidad:
 - En el suero existe una correlación positiva entre IgE a Der p 1 y con un extracto de D. pteronyssinus, según se mide por RIA y RAST ($r = 0.82$, $p < 0.001$, $n = 30$).
 - Todos los 11 pacientes estudiados tenían pruebas cutáneas positivas en respuesta a Der p 1 ($< 10^{-2}$ µg/ml).
 - 92% de los 42 pacientes alérgicos a ácaros tenía las IgE específicas a rDer p 1 en RAST.
- 50
- Der p 2
- Nombre bioquímico: pertenece a la familia NPC2, 15 kDa (SDS-PAGE).
- Pruebas de alergenidad:
 - 9 de 12 pacientes alérgicos a ácaros (75%) tenían la piel positiva en respuesta a Der p 2 ($< 10^{-3}$ µg/ml).
 - 59 de 65 (90.7%) de los pacientes alérgicos a ácaros tenían IgE específico A Der p 2 en RAST.
 - 32 de 45 (71%) pacientes alérgicos a ácaros tenían IgE específico a Der p 2 en RAST.

ES 2 638 308 T3

- 100% de los 35 pacientes alérgicos a ácaros tenía IgE específico a Der p 2 en RAST.

• Der p 3

Nombre bioquímico:

tripsina, 31 kDa (SDS-PAGE).

Alergenicidad:

- 100% de los 55 pacientes alérgicos a ácaros tenía IgE específico a Der p 3 en RAST.
- de 35 pacientes alérgicos a ácaros 97% tenían IgE específico a Der p 3 en RAST.

• Der p 4

Nombre bioquímico:

α -amilasa, 60 kDa (SDS-PAGE).

Alergenicidad:

- En inmunotransferencias con Der p 4 purificada, el 46% de los 27 pacientes adultos alérgicos ácaros tenía IgE específico a Der p 4 y 25% de 20 niños alérgicos a ácaros.
- De 10 pacientes alérgicos a ácaros estudiados, 3 tenían IgE a Der p 4 en dot-blot.

5

• Der p-5

Tamaño:

proteína de 14 kDa (SDS-PAGE) con homología no significativa con otras proteínas descritas.

Alergenicidad:

- 6 de 19 (31%) de los pacientes alérgicos a ácaros tenían IgE específico a Der p 5 en RIA.
- 7 de los 20 pacientes alérgicos a ácaros (37%) tuvieron reactividad positiva a Der p 5 entre 10^{-4} y 10^{-2} μ g/ml en las pruebas de punción cutánea.
- En inmunotransferencias, 21 de 38 sueros de pacientes alérgicos a ácaros reconocieron Der p 5.

• Der p 6

Nombre biológico:

quimiotripsina, 25 kDa (SDS-PAGE).

Alergenicidad:

- 41% (36 de 88) de los pacientes alérgicos a ácaros tenía IgE específico a Der p 6 en RAST.
- 44% (8 de 18) de los pacientes alérgicos a ácaros tenía reacciones positivas en las pruebas intradérmicas subcutáneas con Der p 6.
- 65% de 35 pacientes alérgicos a ácaros fueron positivos a Der p 6 en RAST.

10

• Der p 7

Tamaño:

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

Alergenicidad:

- 53% (16 de 30) de los pacientes alérgicos a ácaros tenía reacciones positivas en pruebas subcutáneas con rDer p 7 (1 μ g/ml).
- 14 de 38 (37%) de niños tenían IgE específico a rDer p 7.
- 19 de 41 (46%) de los pacientes alérgicos a ácaros tenían IgE específico 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 ácaros reconocen rDer p 8 en inmunotransferencia.

15

• Der p 9

Nombre bioquímico:

serina proteasa colagenolítica de 29 kDa (SDS-PAGE).

Alergenicidad:

92% de 35 pacientes alérgicos a ácaros tenía IgE específico a Der p 9 en RAST

• Der p 10

Nombre bioquímico:

Tropomiosina, 36 kDa (SDS-PAGE),

Alergenicidad:

5.6% de los pacientes alérgicos a ácaros tenían IgE específico a Der p recombinante 10.

• Der p 11

Nombre bioquímico:

paramiosina, 103 kDa (SDS-PAGE).

Alergenicidad:

La prevalencia de IgE en suero para Der p 11, medida en inmunotransferencia, varió entre 41.7% y 66.7% dependiendo del grupo de pacientes, aunque es muy bajo en pacientes no atópicos con urticaria (18.8%) o individuos normales (8%)

20

• Der p 14

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

Alergicidad: Der p 14 induce respuestas y estimulación IgE significativa de células T.

• Der p 20

Nombre bioquímico: Arginina quinasa sin tamaño descrito.

5 • Der p 21

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

10 Der p 1 y Der p 2 reaccionan con 80-100% de los pacientes alérgicos a 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., Aalberse, R.C. (1988). Skin tests and histamine release with P1-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].

15 Los alérgenos del grupo 1 (Der p 1) son proteínas con actividad de proteasa cisteína y pertenecen a la misma familia que la papaína y la proteasa actina-cisteína. La proteína madura tiene 222 residuos y 80 residuos preproteína. Se produce en el tracto digestivo del ácaro y por lo tanto se encuentra en las heces y parece estar implicada en la digestión de los alimentos. Tiene 3 puentes disulfuro: C4-C117, C31-C71 y C64-C103 y su estructura tridimensional se compone de dos dominios globulares: uno formado en el extremo de terminal amino (residuos 21-90) y el otro en el terminal carboxilo (residuos 131-200). Ellos están unidos por un bucle flexible (en las posiciones 101 a 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 gran actividad estimulante de célula T [Kircher, M.F., Haeusler, T., Nickel, R., Lamb, J.R., Renz, H., Beyer, K. (2002). Vb 18.1 and Va 2.3+ T-cell 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 células B se distribuyen a lo largo de la totalidad de la molécula, siendo algunos epítomos conformacionales [De Halleux, S., Stura, E., VanderElst, L., Carlier, V., 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].

20 Los alérgenos del grupo 2 (Der p 2) contienen tres puentes disulfuro (C8-C119, C21-C27 y C73-C78) y se componen de dos hojas β antiparalelas. Los epítomos de las células T de Der p 2 se localizan en toda la proteína. Sin embargo el péptido 111-129 se reconoce frecuentemente 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 depende altamente de la estructura terciaria.

35 Los extractos alergénicos de ácaros son mezclas complejas de proteínas y moléculas no proteicas. El creciente uso de técnicas para la búsqueda de niveles de IgE específico en relación con los componentes de un extracto ha hecho posible demostrar que los pacientes alérgicos generalmente reaccionan a diversos componentes. Existen pocos casos de pacientes alérgicos que reaccionen a un solo alérgeno. Estudios de inmunoterapia con extractos de ácaros completos han demostrado que pueden ocurrir efectos adversos sistémicos peligrosos durante inmunoterapia con extractos de ácaros [Akçakaya, N., Hassanzadeh, A., Camcioglu, 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]. Por lo tanto, se muestra que los extractos alergénicos conocidos en la actualidad tienen claras desventajas en la consecución de un tratamiento óptimo para alergia a ácaros.

Características de la invención

55 Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente mencionados, los inventores se han concentrado en la investigación de nuevos métodos ventajosos para tratamiento anti-alergia, particularmente tratamiento de las alergias producidas por ácaros. Como resultado de una extensa investigación, los inventores han descubierto un nuevo método efectivo para el tratamiento de alergias de ácaros basado en las nuevas proteínas híbridas formadas al unir fragmentos de dos alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p 1 y Der p 2), y diversos arios métodos y medios para su obtención.

60 En un cebador aspecto, la invención proporciona un 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 epítomos de unión de anticuerpo IgE, dichos

fragmentos tienen por lo menos 50 residuos de aminoácidos en longitud, caracterizados porque el polipéptido tiene por lo menos 95% de homología con la SEQ ID No.: 2, y tiene alergenicidad, según se mide por la capacidad de unión a IgE, aproximadamente 2500 veces menor que aquella de la mezcla de las proteínas de alérgenos Der p 1 y Der p 2 naturales individuales.

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

10 En un tercer aspecto, la invención proporciona un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos del segundo aspecto.

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

15 En un quinto aspecto, la invención proporciona un método para producir un polipéptido, caracterizado porque comprende cultivar una célula anfitriona de acuerdo con el cuarto aspecto y aislar y purificar el polipéptido producido por la célula anfitriona.

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

25 En un séptimo aspecto, la invención se refiere a el uso de un polipéptido del cebador aspecto, o un vector de expresión del tercer aspecto, para la preparación de una composición para uso en el tratamiento o prevención de alergia.

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

30 Las proteínas híbridas hipoalérgicas pueden haber reducido significativamente la alergenicidad en comparación con aquella de los alérgenos nativos individuales y/o a con mezclas de los mismos. Las proteínas híbridas de acuerdo con la presente invención pueden ser llamadas hipoalérgicas ya que tienen una menor capacidad de anticuerpos IgE de unión con base en: i) ELISA in vitro, inhibición de ELISA y pruebas de inmunotransferencia utilizando mezclas de suero de pacientes alérgicos a D. pteronyssinus; ii) pruebas de reactividad cutánea in vivo en
35 pacientes alérgicos a D. pteronyssinus; iii) pruebas de activación ex vivo de basófilos aislados de sangre de pacientes alérgicos a D. pteronyssinus y iv) pruebas EAST in vitro 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 por estudios de linfoproliferación con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 23 pacientes alérgicos a D. pteronyssinus que muestra la reactividad de células T; ii) de
40 hecho tener mayor inmunogenicidad que las proteínas de tipo silvestre después de inmunización de ratones con proteínas híbridas; y iii) tienen la capacidad de inducir anticuerpos de 'bloqueo' en ratones, es decir, inducir IgG específico a Der p 1 y Der p 2, que inhiben la unión de IgG de pacientes alérgicos a ácaros de polvo domésticos a los alérgenos naturales.

45 Por lo tanto, la presente invención se refiere a proteínas híbridas (o quimeras) (un ejemplo de las cuales se menciona en adelante como QM1) compuestas de fragmentos de los alérgenos Der p 1 y Der p 2, en las que por lo menos uno de los dos β hojas de Der p 2, en las que se ha interrumpido el puente disulfuro entre C8 y C119 de Der p 2 por sustitución de uno o ambos de los residuos de cisteína en las posiciones 8 y 119 de la proteína nativa
50 madura mostrada en la Figura 2, por ejemplo con un residuo de serina. También se divulga aquí una proteína híbrida de comparador (denominada en adelante como QM2) que no es parte de la invención. La QM2 se compone de fragmentos de los alérgenos Der p 1 y Der p 2, en la que por lo menos una de las dos β hojas de Der p 2, en las que se ha interrumpido el puente disulfuro entre C8 y C119 de Der p 2 mediante inserción de secuencia adicional de aminoácidos, tal como un fragmento de Der p 1 por ejemplo, residuos 5 a 222 de la proteína madura (es decir, sin la pre-región mostrada en la Figura 1). Preferiblemente se inserta la secuencia de aminoácidos adicional entre el
55 residuo 73 y 74 de la secuencia de proteína nativa madura de Der p 2 mostrada en la Figura 2. Sin embargo, se ha reducido la reactividad alérgica, sorprendentemente sin detrimento de su capacidad inmunogénica. De hecho, las proteínas híbridas han demostrado una mayor inmunogenicidad en algunas pruebas y, adicionalmente, pueden estimular la producción de anticuerpos IgG.

60 Por lo tanto la invención proporciona secuencias de péptidos que comprenden o que consisten de secuencias de aminoácidos de por lo menos 95%, o más preferiblemente 100% de homología de secuencia con la SEQ ID No 2.

65 Dichas proteínas se pueden producir por cualquier método de síntesis de proteínas estándar, por ejemplo síntesis química, síntesis semiquímica o mediante el uso de sistemas de expresión. De acuerdo con lo anterior, la presente invención también se refiere a secuencias de nucleótidos que comprenden o que consisten del ADN que codifica dichas proteínas quiméricas, sistemas de expresión, por ejemplo, vectores que comprenden dichas secuencias

acompañadas por las secuencias necesarias para la expresión y control de la expresión, y células anfitrionas y organismos anfitriones transformados por dichos sistemas de expresión.

5 Por lo tanto la invención proporciona polinucleótidos que comprenden o que consisten de secuencias de nucleótidos que tienen por lo menos 95%, o más preferiblemente 100% de homología de secuencia con la SEQ ID No 1.

10 Los vectores de expresión se pueden seleccionar dependiendo de la célula anfitriona en la que se pueden insertar los polinucleótidos de la invención. Dicha transformación de la célula anfitriona implica técnicas convencionales, tales como aquellas que se enseñan en Sambrook et al [Sambrook, J., Russell, D. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA]. La selección de vectores adecuados está dentro de las habilidades de la persona con conocimientos en el campo. Los vectores adecuados incluyen plásmidos, bacteriófagos, cósmidos y virus.

15 Las proteínas híbridas producidas se pueden aislar y purificar a partir de la célula anfitriona mediante cualquier método, por ejemplo precipitación adecuada o separación cromatográfica por ejemplo cromatografía de afinidad.

20 La invención también se refiere a los usos clínicos de estos polipéptidos quiméricos y a la inmunoterapia específica para el tratamiento de alergias, particularmente alergia a ácaros del polvo, *D. pteronyssinus*. Como se señaló anteriormente, la inmunoterapia específica es un método de tratamiento y prevención de la alergia mediante administración de una cantidad efectiva de una o más de las proteínas híbridas de la presente invención. Preferiblemente, el tratamiento es de mamíferos, particularmente humanos. La alergia se puede manifestar como rinitis, conjuntivitis, asma, urticaria, angioedema, eccema, dermatitis, y/o choque anafiláctico. De acuerdo con lo anterior, el tratamiento y terapia preventiva cubiertos por la presente solicitud pueden incluir el tratamiento de una o más de estas afecciones.

25 Las proteínas híbridas según se preparan mediante el proceso descrito se pueden formular como un medicamento para el tratamiento de una reacción alérgica. La invención también se refiere a posibles composiciones que comprenden estas proteínas híbridas. Una realización particular de la invención se refiere a una composición de vacuna. El componente principal es la proteína híbrida que se administra preferiblemente junto con un adyuvante. Existen diversos adyuvantes adecuados para aplicación a 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, New York, 1995.

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

35 Las propiedades hipoalérgicas de las proteínas híbridas de la presente invención se discuten a continuación. Las pruebas inmunológicas llevadas a cabo por los inventores utilizando ELISA y experimentos de inhibición de ELISA indican que la quimera de comparador QM2 no mostró reconocimiento de IgE en el suero de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* (Figura 9). A pesar de que contiene la mayoría de las secuencias de ambas proteínas de alérgenos, la quimera de la invención QM1 tiene una capacidad de unión a IgE 2500 veces menor que aquella de la mezcla de ambas proteínas naturales, como se muestra en la Figura 10. La QM1 contiene la mayoría de las secuencias de de ambas proteínas pero tiene mutaciones en dos cisteínas de Der p 2 (residuos 8 y 119).

40 Estos datos de baja alergenidad fueron autenticados por experimentos in vivo en 107 pacientes que utilizaron pruebas de punción cutánea. La alergenidad (capacidad de unión a IgE como se indica mediante, por ejemplo, el tamaño de pápula) de la quimera QM1 fue de alrededor de 50 veces menor que aquella obtenida con las dos proteínas naturales aisladas (Figura 11). La alergenidad de QM2 fue prácticamente nula.

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

Depósito de cepas

50 Se ha depositado una cepa del microorganismo de acuerdo con la presente invención en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia (Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100 BURJASOT, Valencia) de conformidad con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Propósitos del Procedimiento de Patentes, con las siguientes referencias:

65 CECT 7317 *Escherichia coli* QM1
CECT 7318 *Escherichia coli* QM2

Depositadas el 3 de octubre de 2007.

Descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 muestra secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidas de lo anterior que corresponde a la preproteína proDer p 1, en la que se ha enmarcado la pre-región y los puentes de disulfuro se indican por líneas que conectan líneas que conectan los residuos de cisteína rodeados pertinentes.
- 10 La Figura 2 muestra secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidas de lo anterior que corresponden a la proteína madura Der p 2, en la que los puentes de disulfuro se indican por líneas que conectan los residuos de cisteína rodeados pertinentes.
- 15 La Figura 3 muestra un diagrama de construcción QM1. El * indica la ubicación de residuos sustituidos.
- La Figura 4 muestra secuencias de aminoácidos y nucleótidos of la QM1. Los residuos introducidos de Der p 2 se sombream y aquellos de Der p 1 se enmarcan. Los residuos sustituidos se muestran por un marco doble.
- 20 La Figura 5 muestra un diagrama de construcción QM2. El * indica la ubicación de residuos sustituidos.
- La Figura 6 muestra secuencias de aminoácidos y nucleótidos de QM2. Los residuos introducidos de Der p 2 se sombream y aquellos de Der p 1 se enmarcan. Los residuos sustituidos durante la construcción de la quimera se muestran mediante un doble subrayado.
- 25 La Figura 7 muestra un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie después de electroforesis en 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 los anticuerpos IgE de una muestra de sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* en el que aparecen alérgenos naturales y recombinantes (Der p 1 y Der p 2) y las fusiones QM1 y QM2. El carril M indica marcadores de peso molecular estándar.
- 30 La Figura 9 muestra la unión de anticuerpos IgE a nDer p 1, nDer p 2, QM1 y QM2 utilizando sueros de 19 pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* (dilución 1/4).
- 35 La Figura 10 muestra los resultados procedentes de una prueba de inhibición de ELISA de la actividad de unión a IgE de una muestra 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 de tres experimentos con una desviación estándar de menos de 10%.
- 40 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 medios de áreas de superficie de pápula duplicadas medidas en ambos brazos. Los resultados se muestran como diagrama de cajas en los que los bordes de cada caja marcan los percentiles 25 y 75 y las líneas indican los valores de la mediana. Las barras que se extienden hacia arriba y hacia abajo de cada caja muestran el mayor valor observado que no es un valor atípico. Los círculos blancos y las estrellas indican valores atípicos y extremos de cada grupo de pacientes. Se incluyen los valores P después de la prueba de rangos Wilcoxon.
- 45 La Figura 12 muestra una representación en forma de diagramas de caja de medios de IgE específico duplicados a partir de sueros de pacientes individuales (n=107) para un extracto de *D. pteronyssinus* (DPT), nDer p 1, nDer p 2, nD1D2, QM1 y QM2. Los resultados se muestran como diagrama de cajas en las que los bordes de cada caja marcan los percentiles 25 y 75 y las líneas indican los valores de la mediana. Las barras que se extienden hacia arriba y hacia abajo de cada caja muestran el mayor valor observado que no es un valor atípico. Los círculos blancos y las estrellas indican valores atípicos y extremos de cada grupo de pacientes. Se incluyen los valores P después de la prueba de rangos Wilcoxon.
- 50 La Figura 13 muestra la proliferación de linfocitos T obtenido con 10 µg/ml del extracto de *D. pteronyssinus* (DPT), las dos proteínas híbridas y las mezclas equimoleculares de las formas naturales y recombinantes de Der p 1 y Der p 2 (MEZCLA NAT y MEZCLA REC, respectivamente). El valor mostrado es aquel del índice de estimulación (%). Los valores de P sólo se muestran cuando las diferencias son significativas.
- 60 La Figura 14: (A) Titulación de los antisueros producidos 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). La densidad óptica media (OD) que corresponde a los anticuerpos IgG unidos se muestra para cada dilución de suero. (B) Inhibición de IgE humana de unión a nD1D2 y sus componentes, Der p 1 y Der p 2 después de pre-incubación con anticuerpos IgG de ratón específicos a nD1D2, QM1, y QM2.
- 65

Descripción detallada

Las proteínas híbridas de baja alergenicidad de acuerdo con la presente invención (QM1) y la proteína de comparador (QM2) se obtienen, en el caso de QM1, por 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, por 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 células T (Figura 13) e inmunogenicidad inducida más fuerte que las moléculas de tipo silvestre separadas (Figura 14A).

Los fragmentos de péptidos que constituyen las proteínas híbridas se pueden sintetizar a partir de secuencias de nucleótidos que las codifican por una persona calificada y entrenada mediante por ejemplo, amplificación de reacción de cadena de polimerasa (PCR) de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica tales como aquellos descritos por ejemplo, en Sambrook et al [Sambrook, J., Russell, D. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA]. Dichas secuencias de nucleótidos, que habían sido digeridas por las enzimas de restricción adecuadas, se pueden incorporar en un vector de expresión mediante ligación. Las diferentes secuencias de nucleótidos que codifican los fragmentos de péptidos se unen utilizando ligadores formados con secuencias reconocidas por enzimas de restricción diferentes, y por lo tanto algunos residuos aparecen en la molécula de péptido híbrido final que no existían en la secuencia original del alérgeno natural. Estos nuevos residuos no interfieren con la traducción correcta de la proteína y se han marcado en la secuencia en la Figura 6 por un doble subrayado.

La presente invención cubre el uso de las quimeras de acuerdo con la presente invención, QM1, o péptidos sintéticos derivados de estas a partir de tratamientos de desensibilización en animales, en particular mamíferos, tales como humanos. Los métodos de desensibilización implican la administración repetida por ruta parenteral (subcutánea, intravenosa o intramuscular), oral, sublingual, nasal o por rectal. Estas proteínas híbridas se pueden administrar solas o en combinación con excipientes, adyuvantes y/o diluyentes farmacéuticos y, de acuerdo con la actual legislación y procedimientos galénicas aplicables.

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

Las proteínas híbridas QM1 y QM2 descritas aquí son hipoalergénicas: como se muestra en las Figuras 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, en particular para la quimera QM2, menor capacidad para activar basófilos en pruebas "ex vivo".

Esta hipoalergenicidad también se ha demostrado en pruebas de la piel in vivo (Figura 11).

La Figura 8 muestra un ensayo de inmunodetección que indica que las quimeras QM1 y QM2 tienen una menor capacidad de unión a IgE en los pacientes alérgicos en comparación con la reactividad de la proteína natural Der p 2. Esta reducción de la alergenicidad se cuantificó por medio de inhibición de ELISA con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* (Figura 10). 2500 veces más de la proteína QM1 se requirió para conseguir una inhibición del 50% de la mezcla de las dos proteínas naturales. Por lo tanto, se puede deducir que era 2500 veces menos alérgica 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 de 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 en 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 de pápula media 50 veces más bajo que aquel observado para nDer p 2 y 10 veces inferior a la observada para nDer p 1, lo que indicaría una reducción en la actividad alérgica de 90-98%. Esto a pesar de las dosis más altas utilizadas para las proteínas híbridas.

La capacidad de unión a IgE baja 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 de IgE fue prácticamente inexistente para QM2 en comparación con la mezcla de proteínas naturales, DPT, y a las proteínas individuales, ya sea en forma recombinante o nacional.

Esta gran reducción en la capacidad para unirse a IgE y provocar reacciones adversas fue acompañada de mantenimiento de la capacidad inmunógena. Las proteínas QM1 y QM2 mostraron un índice de linfoproliferación similar a aquel inducido por la mezcla de las dos proteínas puras, Der p 1 y Der p 2 en combinación (en ambas formas natural y recombinant) como se muestra en la Figura 13. Esto demuestra que las proteínas híbridas QM1, construidas como una fusión del Der p2 de polipéptido mutado (C8-C119) y Der p 1, y QM2, construidos con 2

fragmentos de Der p 2 y Der p 1, contienen menos epítomos de unión a IgE conformacionales pero conserva suficientes epítomos T para inducir una respuesta inmunitaria protectora.

5 Otra característica deseable de las moléculas hipoalérgicas cuando se utilizan como candidatos para la SIT, aparte de tener una actividad de unión a IgE reducida en comparación con los alérgenos correspondientes y que contiene epítomos de células T, es que deben tener capacidad de inducir anticuerpos de 'bloqueo' que impidan la desgranulación y liberación de histamina. La inmunización de ratones con las proteínas híbridas QM1 y QM2 indujo más fuerte respuesta de IgG que la mezcla de proteínas de tipo silvestre. Estos anticuerpos IgG específicos a Der p 1 y Der p 2 inhibieron la unión a IgG de de pacientes alérgicos a ácaros de polvo domésticos a los alérgenos naturales, mejorando aún más la prevención de los síntomas alérgicos.

10 La invención se entenderá mejor a partir de los siguientes ejemplos que se refieren a las etapas experimentales para preparar la invención y demostrar sus cualidades. Estos ejemplos son solo ilustrativos y no limitantes de la invención.

15 Ejemplos

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

20 Una mezcla de cuerpos liofilizados y heces de *D. pteronyssus* (Laboratorios Leti, Madrid, España) se utilizó como material de partida, se extrajo con 10 volúmenes (p/v) de PBS (salina reguladora de fosfato) complementado con 1 mm de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) durante 15 minutos con agitación rápida a 4°C. A continuación, se centrifugó a 3800 xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante de extracción se filtró a través de AP (Millipore) y se agregó lentamente 60% de sulfato de amonio 361 g/l) durante 30 min. 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,

30 El sedimento obtenido después de centrifugación se resuspendió en 2 ml de Tris 20 mM pH 8.0 y se filtró a través de 0.22 µm. Se llevó a cabo cromatografía de tamiz molecular en una columna 16/60 Superdex S200 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) para lo cual la columna se equilibró con PBS y se inyectaron los 2 ml de la etapa anterior. Las fracciones de 3 ml se recolectaron del volumen de exclusión que se analizaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, que se combinaron con fracciones de 24 kDa. Luego se llevó a cabo cromatografía de intercambio aniónico en una columna Hightrap Q (GE-Healthcare) para lo cual la columna se equilibró con Tris 20 mM pH 8.5. Las fracciones positivas de la etapa anterior se dializaron contra 5 l de agua destilada durante 120 min, y se tomaron en 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.

40 La pureza de la preparación se comprobó mediante electroforesis en gel 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%, fueron sometidos a una corriente de 200 voltios durante 45 minutos en regulador Tris-glicina. Las proteínas utilizadas como marcadores fueron aquellas del kit Bio-Rad para pesos moleculares bajos. El cálculo de los pesos moleculares y el análisis densitométrico de los geles se llevaron a cabo utilizando un analizador de imágenes (Diversity, BioRad).

50 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 el SDS-PAGE se realizó en condiciones reductoras (Figura 7).

• Purificación de Der p 2 natural

55 Se agregaron 239 g/l de sulfato de amonio al sobrenadante de la precipitación con sulfato de amonio al 60% para obtener una concentración de 95% y se dejó que se agitara durante la noche a 4°C. Se centrifugó durante 15 minutos a 17.000 xg y 4°C, y el sedimento se resuspendió en 25 ml de agua MilliQ. Luego se llevó a cabo cromatografía de intercambio aniónico en una columna 16/20 HighFlow Q (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 tomó en 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 tomó en AcNa 20 Mm pH 5.5. La muestra tenía un índice 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 la etapa de purificación final, la cromatografía en tamiz molecular se realizó en una columna Superdex S75/300 (GE-Healthcare) equilibrada con PBS. La fracción de la etapa anterior se eluyó con NaCl 200 mM, se concentró en Amicon Ultra 4 (Millipore) y tenía un índice de flujo de 60 0.4 ml/min, y se recolectaron fracciones de 0.5 ml. Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE. Aquellas que contenían una proteína de 16 kDa correspondiente a Der p 2 se combinaron juntas.

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 el SDS-PAGE se realizó en condiciones reductoras (Figura 7).

5 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 inversa seguida de amplificación por PCR utilizando ARNm como una plantilla aislada de Dermatophagoides y cebadores específicos en cada caso. El ARNm se aisló de 100 mg de cuerpos de *D. pteronyssinus* (Laboratorios Leti, Madrid, España) utilizando el kit de purificación Prep Quick microARN (GE-Healthcare). El ADNc se obtuvo mediante transcripción inversa del ARNm utilizando el Kit de Síntesis de ADNc de primera hebra (GE-Healthcare).

Los cebadores consistían de la zona de hibridación, diversos sitios de división para diferentes endonucleasas de restricción (subrayados adelante), y nucleótidos de anclaje. La reacción de amplificación PCR tenía los siguientes componentes en un volumen de reacción de 50 µl: regulador de amplificación x 10, 5 µl; 200 µm de dNTPs; 100 pm de cada cebador de oligonucleótido; 2.5 unidades de Taq polimerasa (ADN polimerasa Pfx, Invitrogen); 1 ng de plantilla de ADN y agua estéril destilada 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 gel de agarosa (2%) y la banda de interés se aisló del gel mediante 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 (obtenibles a través de Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Las colonias resultantes se cultivaron para aislar su ADN plásmido, que fue digerido con enzimas adecuadas para liberar el fragmento de interés. Se seleccionaron los clones positivos para su secuenciación. El ADN insertado en pBluescript se secuenció por el método de Sanger modificado para su uso con didesoxinucleótidos fluorescentes y amplificados en el termociclador utilizando el kit de secuenciación de terminación de reacción DyeDeoxy PRISM Ready (Perkin Elmer) siguiendo las instrucciones del fabricante.

• ADNc 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 GenBank: P08176). El cebador directo 5'-ACTGACAGGCCTCGTCCATCATCGATCAAAAC-3' incluye la secuencia de división de la enzima *StuI* (subrayada) y el cebador inverso 5'-CGGAATTCCTAGGTTAGAGAATGACAACATATGG-3' incluye las zonas de división de endonucleasas de *EcoRI* (subrayado) y *AvrII* (cursiva). 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 vector pGEM (Promega) y se secuenció.

El ADN de plásmido de Der p 1 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 24.97 kDa con un punto isoeléctrico de 5.49.

• ADNc de Der p 2

La región de ADNc que codifica Der p 2 se amplificó mediante PCR utilizando cebadores diseñados de acuerdo con las secuencias publicadas (AAF86462). 5'-CGGGATCCGATCAAGTCGATGTCAAAG-3' se utilizó como un cebador directo, que incluyó la secuencia de división de la enzima de restricción *BamHI* y 5'-CGGAATTCCTTAATCGCGGATTTTAGC-3' como el cebador inverso con la secuencia de división 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 PCR obtenido se aisló, clonó en el vector pBluescript II KS (Stratagene) y se secuenció. El ADN de plásmido que codifica Der p 2 se aisló después de digestión con la enzima de restricción *BamHI/EcoRI* y se subclonó en los vectores pKN172 [(20) Way, M., Pope, B., Gooch, J., Hawkins, M., Weeds, A.G. (1990) Identification of a region in segment 1 of gelsolin critical for actin binding. *EMBO J.* 9; 4103-4109] y pTrcHis A (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

La secuencia de Der p 2 obtenido codifica para un polipéptido de 129 aminoácidos (Figura 2) que incluía un cambio de aminoácido (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.

60 Ejemplo 3: Expresión y purificación de Der p 2 recombinante

Las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido correspondiente por el método de Hanahan [(21) Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580] se dispersaron sobre las placas de Petri que contenían medio LB complementado 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). 1 litro del mismo medio se inoculó con dicha preinoculación a partir de una densidad óptica (600 nm) de 0.2. Se incubó a 37°C con agitación hasta que se logró una densidad óptica (600 nm) de 0.6 (aprox. 90 minutos), en la que la inducción de tiempo se llevó a cabo 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.

5 Las células se centrifugaron a 10.000 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 (ditiotreitolo)). La resuspensión se trató con lisozima (0.1 mg/ml de concentración final) durante 30 minutos a 37°C con agitación. Luego se sometió a sonicación en un baño de hielo durante 5 minutos, se agregó Triton X-100 al 1% y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Después de ser centrifugada a 8.000 xg durante 15 minutos, el sedimento se resuspendió en 20 ml de urea 2 M y Triton X-100 al 0.2% 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 8.000 xg y 4°C durante 15 minutos. El sedimento se resuspendió en 10 ml de cloruro de guanidina 6 M y β-mercaptoetanol al 0.5%. Se mantuvo en agitación magnética durante 1 hora a 4°C y se dializó durante la noche frente a 200 ml de urea 6 M en Tris 25 mM pH 8.0. Para mejorar el plegado del mismo la muestra se diluyó a 1-2 mg/ml con urea 6 M y la diálisis se realizó etapa por etapa a 4°C contra: 400 ml de urea 3 M/urea 111.5 M/urea 0.75 M/urea 0.37 M/urea 0.18 M haciendo los cambios cada 90 minutos. Finalmente se dejó dializar durante la noche a 4°C contra 5 l de agua destilada. La purificación terminó con cromatografía de intercambio aniónico en una columna 16/20 HighFlow SP (Healthcare) equilibrada con AcNa 25 mM pH 5.5. La muestra se tomó en AcNa 25 mM pH 5.5 y después se centrifugó a 3800 xg durante 10 minutos y filtró a través de AP (Millipore) y filtros de 0.45 μm (Millipore) se pasaron 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 la purificación fue de 3.8 mg por litro de cultivo. La purificación de Der p 2 recombinante resultó en una proteína con una pureza de más del 95% y un tamaño de 17.05 kDa cuando el SDS-PAGE se realizó en condiciones reductoras (Figura 7).

Ejemplo 4: Construcción de la proteína de fusión QM1 de la invención

30 Esto se inició con el ADN de plásmido de Der p 2 que se amplificó mediante PCR con el cebador 5'-CGGGATCCGTC AAGATAGTGCCAATC-3' y 5'-ACGGATCTGCAGGTAGCAATAGCACTGGCCAA-3, que incluyó las secuencias de división 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 vector pBluescript KS (Stratagene) dividido con BamHI/PstI y se secuenció. Esta construcción se digirió con PstI/EcoRI, y una secuencia parcial de la proteína madura de Der p 1 que se había obtenido después de digerir la secuencia inicial con las mismas enzimas PstI/EcoRI fue incorporada mediante ligación. 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 por la secuencia codificada de los aminoácidos 5 a 123 de Der p 2. Los oligonucleótidos diseñados para la reamplificación de esta secuencia incluyen cambios de bases que implicaban la sustitución de las cisteínas de las posiciones 8 y 119 de la proteína original por serinas. El segundo fragmento se codificó a partir de los aminoácidos 4 a 222 de la proteína madura de Der p 1. El segundo fragmento se unió al primero mediante 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 codifica 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 de comparador QM2

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

50 • Fragmento 1, que corresponde a el extremo de terminal N de Der p 2, se amplificó con el cebador directo 5'-CGGGATCCGATCAAGTCGATGTC A AAG-3' que incluyó el núcleo de la enzima BamHI y con el cebador inverso 5'-CCGAATTCCTAGGCTGCAGCCATTTGGATCGAT-3' que incluyó 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).

55 • Fragmento 2 de Der p 1 se amplificó con los siguientes oligonucleótidos: 5'-ACTGACAGGCCTCGTCCATCATCGATCAAAAC-3' y 5'-CACCTAGGGAGAATGACAACATATGG-3'. El cebador directo incluyó la secuencia de división de StuI y el cebador inverso incluyó aquella 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).

60 • Fragmento 3 se obtuvo mediante PCR utilizando Der p 2 como una plantilla y los cebadores 5'-CACTAGGCATTACATGAAAAGCCCA-3' y 5'-CGGAATTCCTTAATCGCGGATTTAGC-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). El aislamiento del fragmento deseado y la 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 fue incorporado mediante

ligación. La digestión con PstI aseguró que este segundo fragmento incluyó solo una secuencia parcial de la proteína madura de Der p 1. La nueva construcción que incluía los fragmentos 1 y 2 a su vez fue digerida con AvrII y EcoRI y ligada a un fragmento 3. El ADN de plásmido que codifica la proteína de fusión se secuenció, y se subclonó en los vectores pKN172 y pTrcHis a para expresión de los mismos.

El ADN de la fusión QM2 fue formado a partir de la secuencia que codifica la proteína completa de Der p 2, en la que se había insertado entre las bases que determinaron los aminoácidos 73 y 74 una secuencia que se codifica 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 implica la inclusión de 6 bases adicionales del núcleo de AvrII y que codifica prolina y arginina. Los cebadores diseñados para la construcción de los fragmentos 1 y 3 incluyen algunas diferencias con respecto a la secuencia original: cambios en los aminoácidos 72 (Ala-> Gly) y 78 (Cys-> Ser) de Der p 2 (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 p 2 cuando la secuencia de Der p 1 se introdujo en su aminoácido 73. La proteína híbrida final se compuso de 349 aminoácidos con un peso molecular calculado 38.92 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 6.22.

Ejemplo 6: Expresión y purificación de la proteína híbrida de la invención QM1, y proteína híbrida de comparador QM2

A partir de una colonia de células de E. coli BL21 (DE3) transformadas con el plásmido correspondiente aislado de una placa de LB complementada con 200 µg/ml de ampicilina, un preinoculación de 50 ml del mismo medio se llevó y se incubó durante la noche a 37°C con agitación (260 rpm). 1 litro del mismo medio se inoculó con dicha preinoculación comenzando con una densidad óptica (600 nm) de 0.2. Se incubó a 37°C con agitación hasta que se alcanzó una densidad óptica (600 nm) de 0.6 (aprox. 90 minutos), en la que se llevo a cabo inducción de tiempo 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 mediante centrifugación.

- Purificación de la proteína de la invención QM1

Las condiciones de lisis de las bacterias recombinantes y el plegamiento mediante diálisis en etapas para eliminar la urea fueron como para la purificación de rDer p 2 (Ejemplo 3). Finalmente se llevó a cabo plegamiento oxidativo mediante diálisis a 4°C contra 1 l de cisteína 5 mM/cistina 1 mM en Tris 50 mM pH 8.0 durante la noche. Por último, se centrifugó a 3.800 xg y 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante se filtró a través de AP (Millipore) y se dializó contra 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 comparador QM2

Las condiciones de lisis de las bacterias recombinantes fueron como para la purificación de rDer p 2 (Ejemplo 3). Se agregó 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. Luego se agregó 2-yodoacetamida 0.2 M y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó β-mercaptoetanol 0.2 M, se incubó durante una hora más a temperatura ambiente y se tomó en 50 ml con urea 6 M. Luego se llevó a cabo plegamiento en etapas mediante diálisis para eliminar la urea como para la purificación de rDer p 2 (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 16/20 HighFlow Q equilibrada con etanolamina 20 mM pH 10.0. La muestra se hizo pasar a 5 ml/min y el material no unido se recogió y se concentró en Amicon Ultra 4 (Millipore). Se centrifugó a 3800 xg durante 15 minutos y se filtró a través de filtro de AP y 0.45 µm para eliminar cualquier material precipitado. Finalmente se realizó cromatografía de tamiz molecular en una columna Superdex 16/60 SX200 equilibrada con NH₄HCO₃ 200 mM a 1 ml/min. La proteína salió en el eluyente debido a su tendencia a formar agregados. La preparación pura se liofilizó en el mismo regulador y se mantuvo a 4°C. El rendimiento final de la purificación fue 42.4 mg por litro de medio de cultivo.

Ambas proteínas se encontraron en la fracción insoluble como cuerpos de inclusión, pero que no se podían solubilizar en urea. La purificación de QM1 y QM2 resultó en proteínas con una pureza de más del 95% y un tamaño de 34.91 y 39.67 kDa, respectivamente cuando el SDS-PAGE se realizó en condiciones reductoras (Figura 7).

Ejemplo 7: Pruebas inmunológicas para demostrar la baja reactividad de fijación a IgE de 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, se realizó electrotransferencia utilizando el método de Towbin et al [Towbin, H., Staehelin, I., and Gordon, J. (1979).

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354]. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a hojas de Hybond-P con PVDF (difluoruro de polivinilideno) (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 varios 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 quimioluminiscente ECL (GE-Healthcare) como se mencionó por el fabricante mediante exposición de la hoja a una película (Hyperfilm.ECL, GE-Healthcare).

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

B) ELISA directa

La reactividad 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 de 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/pequeña taza de PBS complementado con BSA al 1% Tween 20 al 0.05% y se mantuvo durante 1 hora a 37°C. Luego se agregó 100 µl/taza pequeña de la mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* a dilución 1/4, y se dejó a 37°C durante 90 min. Después de 3 lavados con 200 µl/pequeña taza de PBS-T (PBS + Tween 20 al 0.05%), se agregaron 100 µl/taza pequeña de un antisuero contra inmunoglobulinas IgE humanas (Dako) combinado con peroxidasa (dilución 1:1000) y se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Después de tres lavados más con PBS-T, se agregaron 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 (Instrumentos SLT-Lab).

La reactividad de IgE a la quimera QM1 se muestra sólo en algunos pacientes, mientras que la QM2 no se reconoció por prácticamente ninguna de los anticuerpos IgE del suero de pacientes (Figura 9).

C) Inhibición de ELISA

La reactividad de IgE para las dos quimeras se analizó mediante la técnica de ELISA de inhibición 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 inhibidor de proteínas (de 0.025 a 2500 ng/ml), durante la noche a 4°C. Los anticuerpos unidos a IgE luego se detectaron como para ELISA directa.

En los ensayos de inhibición de ELISA, la quimera QM1 mostró un menor grado de inhibición de la mezcla equivalente de nDer p 1-nDer p 2. De este modo la cantidad de nDer p 1-nDer p 2 necesaria para lograr una inhibición del 50% fue de 1 ng/ml, mientras que se tuvo que agregar 2500 ng/ml para lograr el mismo efecto con la quimera QM1 (Figura 10). Esto indicaría que la QM1 tiene 2500 veces menos capacidad de unión a IgE específicos de pacientes y por lo tanto su alergenicidad se reduciría en 99.96%. La quimera QM2 es incapaz de unir IgE específicos de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*, y por lo tanto su comportamiento en las pruebas de inhibición de ELISA no varió de aquel obtenido con un control negativo, tal como albúmina de suero bovino.

Ejemplo 8: Experimentos in vivo para demostrar la baja reactividad cutánea de las proteínas híbridas QM1 y QM2.

Las pruebas in vivo de punción cutánea se llevaron a cabo en 107 pacientes alérgicos a ácaros para evaluar la hipoadalergenicidad de las quimeras QM1 y QM2

Las pruebas cutáneas se llevaron a cabo con un extracto de *D. pteronyssinus*, nDer p 1 y nDer p 2 aislado de los ácaros; rDer p 2 expresado en *E. coli*, y las quimeras QM1 y QM2. Todas las muestras se diluyeron en fenolado al 0.5% y solución salina fisiológica 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 utilizaron NaCl al 0.9% y clorhidrato de histamina (10 mg/ml) como controles negativos y positivos, respectivamente.

En el experimento, una gota de cada alérgeno se colocó para la prueba sobre la parte interna del antebrazo que después se pincha a través de la gota con una lanceta. Cada prueba se duplicó en filas para la comparación de aumento y disminución de concentraciones. Después de 15 min, las pápulas se rodearon con un fino punto de rotulador negro. Se colocaron tiras de esparadrapo hipoalergénico en la pápula y se presan suavemente para transferir el rastro de tinta sobre la tira, que se transfirió a las hojas de registro de pápula. Las áreas de pápula se midieron por medio de entradas digitalizadas, utilizando el panel de escritura de digitalización Summasketch y un programa de diseño asistido por ordenador (Autocad v. 11).

Se observó una correlación entre la reactividad medida y la concentración de alérgeno aplicado. La quimera QM2 fue ligeramente reactiva ya que solo se observó reactividad a la máxima concentración (500 µg/ml) en 5 de los 107 pacientes estudiados (4.7%). La quimera QM1 era más reactiva, con 86 pacientes (80.4%) que tenían una reacción positiva a 500 µg/ml y 16 (16.8%) que tenían una reacción positiva a 50 µg/ml, pero con mucho menos reactividad que las proteínas de tipo silvestre. Un estudio estadístico se llevó a cabo para interpretar los resultados obtenidos comparativamente, al mostrar los resultados en el diagrama de cajas de diagramas y utilizando la prueba de Wilcoxon para dos variables relacionadas (Figura 10). Se puede ver en estas ilustraciones que las distribuciones de los valores de las reacciones de la piel (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 de 40.33 mm², de intervalo de confianza de 95%: 35.05-47.88) se comparó con aquellos de nDer p 1, nDer p 2, y rDer p 2 a 100 µg/ml, la reactividad de estos es mayor que la inducida por QM1, con valores de mediana de 52.96; 78.86; y 75.72 mm², respectivamente.

Sin embargo, la reactividad de QM1 no fue significativamente diferente (P=0.067) de aquella de nDer p 2 a 10 µg/ml (mediana de 41.91 mm², intervalo de confianza del 95%: 28.27 a 49.71). Tampoco era (P=0.872) en comparación con la reactividad del extracto de ácaro completo (mediana 39.55 mm², intervalo de confianza del 95%: 34.10 a 44.40). En este sentido, es útil tener en cuenta que la preparación de 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.

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).

Ejemplo 9: Valor SPT comparativo de las quimeras

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

Se observó que las concentraciones de proteínas que producen una pápula similar a aquella producida por la histamina fueron 20.5 y 17.4 µg/ml para nDer p 1 y nDer p 2, respectivamente, mientras que para la quimera QM1 era tan alto como 182.4 µg/ml.

Ejemplo 10: Experimentos para demostrar la baja capacidad de unión a IgE por anticuerpos de la proteína híbrida de la invención QM1, y la proteína híbrida de comparador QM2

Adicionalmente a las pruebas in vivo, estas se llevaron a cabo al determinar el IgE específica, utilizando la técnica directa EAST.

Se determinó el IgE específico, 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], al acoplar las proteínas naturales y recombinantes (50 µg/ml) para discos activados con bromuro de cianógeno, y también extraer de *D. pteronyssinus* (500 µg/ml). A continuación, se agregaron 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 humano anti-IgE unido a fosfatasa alcalina y se cuantificaron siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante en el protocolo del kit IgE EIA Hytec específico (Hycor Biomedical Inc.).

Los resultados obtenidos simplemente reafirman aquellos obtenidos in vivo. La capacidad de la quimera QM2 para unir 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 específico a QM1 fue de 88 (82.2%). La capacidad de unión a IgE de QM1 (mediana 17.01 U/ml, intervalo de confianza del 95%: 9.92-27.16) fue significativamente diferente (P<0.001) y menor que aquel del extracto completo (mediana 39.35 U/ml, intervalo de confianza del 95%: 18.80-50.90) (Figura 11).

Ejemplo 11: Experimentos para demostrar la capacidad de activación de basófilos de la proteína híbrida de la invención QM1, y proteína híbrida de comparador QM2

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando la prueba de estimulación de basófilos medida por citometría de flujo (prueba de estimulación de alérgeno celular de citometría 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 de sangre situadas en la capa por encima de los eritrocitos se recolectaron mediante 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). Los alérgenos y soluciones de control (50 µl) se agregaron a tazas pequeñas en placas de poliestireno con fondo en forma de U (Greiner Microlon, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) a concentraciones que variaban entre 2 µg/ml y 0.02 pg/ml, mezcladas con 50 µl de la suspensión de células de pacientes y se incubaron a 37°C durante 40 minutos. La reacción se detuvo al agregar 100 µl de regulador HEPES sin Ca²⁺ o Mg²⁺, pero que contiene EDTA 0.27 mM (regulador de lavado), y se centrifugaron las placas. Los basófilos del sedimento de células 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, se agregaron, posteriormente, 4 ml de reactivo de eritrolítico (Ortho Diagnostic System, Madrid, España). La lisis celular se detuvo al agregar regulador de lavado y después centrifugar las células, los sobrenadantes se diluyeron con 500 µl del mismo regulador. Los marcadores de superficie de los basófilos se analizaron mediante citometría de flujo a 488 nm utilizando un aparato de citometría de flujo FACScan equipado con un láser de argón nW 15 (Becton Dickinson, San José, EE.UU.) y se analizaron los datos utilizando el paquete de ordenador CellQuest. En cada prueba, los marcadores anti-IgE y anti-CD63 se estudiaron en por lo menos 500 basófilos.

El anticuerpo monoclonal anti-IgE, Le27 (1 µl/ml; Bühlmann, Allschwil, Suiza) se utilizó como un control positivo y los valores basales sin estimulación fueron evaluados 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 del extracto de *D. pteronyssinus* o proteína purificada utilizada) y la activación específica debido 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 aquellas en las que QM1 dio una respuesta positiva.

Ejemplo 12: Experimentos de linfoproliferación inducida para demostrar la capacidad inmunógena de la proteína híbrida de la invención QM1, y la proteína híbrida de comparador QM2

Un requisito esencial para el uso de una molécula hipoalérgica en la inmunoterapia es que se mantendrá la antigenicidad de la misma (epítopos T). Por lo tanto para comprobar si los anticuerpos IgE no de unión, las proteínas híbridas continúan siendo antigénicas, un estudio de linfoproliferación se llevó a cabo en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas por las diferentes proteínas utilizadas en los experimentos. Se llevaron a cabo mediante la incorporación de un derivado de fluoresceína en cultivos de linfocitos purificados. Este derivado (éster de carboxifluoresceína succinimidilo (CFSE)) podría pasar a través de la membrana celular, pero no fue fluorescente hasta que había sido degradado por las esterasas celulares que se convirtió 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.).

Las PBMC de 23 pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando una solución de separación de linfocitos (Lymphoprep, Nycomed). Las PBMC se resuspendieron luego en 1-2x10⁶ células viables/ml en medio de cultivo (RPMI 1640, Sigma Chemical Co.) y se probó la viabilidad de las mismas con 0.25% de azul de tripano en PBS (Sigma Chemical Co.). Las PBMC preparadas con la viabilidad superior al 90% se utilizaron inmediatamente para pruebas de proliferación in vitro. 10x10⁶ PBMCs en medio RPMI-1640 se marcaron con CFSE (concentración final 5 µM) durante 10 min a 37°C y en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. El marcado se detuvo con suero de ternera fetal al 50% durante 5 min y se lavaron dos veces con RPMI-1640 complementado 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) complementado con suero AB humano al 5%. Se colocaron en microplacas de fondo plano con 24 tazas pequeñas (Nunclon, 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 agregaron a una concentración final de 10 µg/ml y se incubaron durante 7 días a 37°C y en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro de flujo (BD FACSCalibur Becton-Dickinson) con capacidad para fluorescencia de cuatro colores. Los resultados se expresaron como porcentaje de los eventos registrados evaluados por el paquete de programas de Software Cell Quest (Becton-Dickinson). Se incluyeron controles por triplicado 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 las proteínas recombinantes rDer p 1 y rDer p 2 aisladas de *E. coli* (mezcla recombinante). El extracto de *D. pteronyssinus* también se utilizó como control.

En la primera etapa se llevó a cabo un barrido de concentraciones de proteína de inmunógeno 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 proliferación máxima (IE%) fue 10 µg/ml.

Los resultados de proliferación con los 23 pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* se analizaron mediante análisis de diagrama de cajas estadístico y pruebas no paramétricas para las dos muestras emparejadas. Se podría ver a partir del análisis estadístico que el extracto de *D. pteronyssinus* (promedio 12%, intervalo de confianza del 95%: 8-20), utilizado como control, tenía una capacidad de estimulación antigénica no significativamente diferente de aquella de las quimeras QM1 (promedio del 15%, intervalo de confianza del 95%: 10-25) y QM2 (promedio 13%, intervalo de confianza del 95%: 8-17) ($P=0.121$ y $P=0.304$, respectivamente). Sin embargo, la inmunogenicidad de QM1 fue significativamente mayor ($P<0.05$) que aquella obtenida con la mezcla natural (promedio 9%, intervalo de confianza del 95%: 5-13) o la mezcla recombinante ($P<0.005$) (promedio 9%, intervalo de confianza de 95%: 57-14.5). Cuando las dos quimeras se compararon entre sí, se observó que la capacidad de 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 y QM2 continuaron manteniendo la capacidad de inducción de inmunoproliferación y esto fue incluso mayor en las proteínas fusionadas en comparación con las proteínas de tipo silvestre.

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

Para este propósito se realizó la inmunización de ratones con híbridos. Se inmunizaron ratones hembra BALB/c de seis semanas de edad (Haarlam, Barcelona, España) por vía intraperitoneal, cinco veces cada quince días, con 10 µg de la mezcla equimolar purificada de nDer p 1 y nDer p 2 (nD1D2), QM1 o QM2 adsorbidas en hidróxido de aluminio. Se utilizaron seis ratones para cada proteína y se obtuvieron sueros 10 días después del último refuerzo a través de la hemorragia de la vena submandibular, se agruparon y almacenaron a -20°C hasta uso.

En primer lugar, se comprobó si los antisueros obtenidos mediante inmunización de ratones con nD1D2, QM1 y QM2 fueron reactivos a nD1D2 utilizando experimentos de titulación ELISA. Los experimentos de ELISA se realizaron como se describió en el Ejemplo 7B, pero se agregaron diluciones de dos veces de los antisueros de ratones y después los pozos se incubaron con anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, EE.UU.) diluido 1/2000. Después de tres lavados, se midió la actividad de peroxidasa agregando 200 µL/pozo de una solución de o-fenilendiamina (Sigma). Después de 30 min, la reacción de color se detuvo al agregar 50 µl/pozo de H₂SO₄ 3 M, y se leyó la densidad óptica a 492 nm.

Los antisueros obtenidos mediante inmunización de ratones con una mezcla equimolar de nDer p 1 y nDer p 2 purificados (nD1D2), QM1 y QM2 reaccionaron a nD1D2, que muestra que la inmunización con ambos híbridos conducen a mayores niveles de anticuerpos IgG específicos a nD1D2 en comparación con inmunización con nD1D2 (Figura 14A).

Con el fin de investigar si los ratones IgG contra moléculas híbridas podrían inhibir la unión de IgE de suero de pacientes a nD1D2, se llevó a cabo 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 conjuntos de suero de anti-nD1D2, anti-QM1, y anti-QM2 de 6 ratones. Un conjunto de suero preinmune se utilizó como control de la inmunización. Después del lavado, las placas se incubaron con sueros individuales (diluido 1/20 y 1/50) o un conjunto de sueros (diluido 1/50) de pacientes alérgicos a HDM. Los anticuerpos IgE unidos se detectaron con un mA b de IgE anti-humano etiquetado con peroxidasa de rábano (HRP) (Southern, Birmingham, AL) diluido 1/2000 y o-fenilendiamina (Sigma). La capacidad de bloqueo se expresó como una señal de porcentaje de los pozos sin suero de ratón agregado.

Los anticuerpos específicos de ratón obtenidos por proteínas híbridas de inmunización fueron capaces de bloquear la unión de nueve IgE de pacientes alérgicos a ácaros a la mezcla equimolar de nDer p 1 y nDer p 2 purificado (nD1D2) de una manera diferente. La inhibición obtenida con anticuerpos anti-nD1D2 de ratón fue de entre 41 y 72% (media 56%) mientras que los anticuerpos anti-QM1 y anti-QM2 de ratón inhibieron la unión a IgE de suero a nD1D2 entre 43 y 82% (media 60%) y entre 0 y 45% (media 20%), respectivamente (Tabla I). La inhibición obtenida con los anticuerpos anti-nD1D2 ratón fue ligeramente inferior (aunque no estadísticamente diferente; $P=0.139$) que aquella obtenida con los anticuerpos anti-QM1 de ratón. La inhibición obtenida en el grupo de anti-QM2 ratón fue estadísticamente diferente ($P<0.01$) a aquella obtenida en los grupos anti-nD1D2 y anti-QM1.

Tabla I: Porcentaje de inhibición de la unión a IgE de pacientes a nD1D2 por anticuerpos de IgG de ratón específicos a 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 hay diferencia estadísticamente significativa 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 de bloqueo de ratón se evaluaron utilizando un conjunto de sueros de 30 pacientes alérgicos a HDM (Figura 14B). El IgG de ratón elevado contra QM1 y QM2 inhibe la unión a IgE de suero a nD1D2 en 71% y 26%, respectivamente, mientras que la inhibición obtenida con anticuerpos anti-nD1D2 de ratón o sueros pre-inmunes fue del 65% y 17%, respectivamente (Figura 6B). La inhibición parcial de la reactividad de IgE por IgG inducido por QM2 se debe a la muy baja inhibición de IgE específico a Der p 2. La capacidad de los anticuerpos IgG anti-QM2 para interferir con la unión a IgE de pacientes a Der p 2 fue mucho menor que aquella de los 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 para nD1D2 fue inhibida por IgG inducido con cada híbrido aunque el IgG inducido por QM1 una mejor capacidad inhibidora en comparación con el IgG inducido con QM2.

Dicha sola inhibición parcial de la reactividad de IgE como se ve con antisuero inducido por QM2 ha sido también encontrada con un mosaico de 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 se podría deber a la destrucción de los epítomos de IgE y por lo tanto no se pudo inducir IgG contra los epítomos originales de IgE. Este podría ser el caso en QM2 ya que la actividad bloqueo a IgG de la unión a IgE para Der p 2 es muy baja y la reactividad de IgE de este híbrido fue casi abolida.

La baja capacidad de los anticuerpos anti-nD1D2 de ratón para inhibir la unión a IgE propia (60-65%; Tabla I y Figura 14B) fue similar a aquella reportada en el caso de IgE específico a Der p 2 [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 las respuestas de IgG de murino e IgE humano a los alérgenos de ácaros podría ser influenciada en parte por el diferente modo de inmunización como se ha reportado 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 los ratones, que se inmunizaron mediante inyecciones IP que contenían adyuvantes, los antígenos se procesan ampliamente mientras que en humanos, que se sensibilizaron mediante inhalación de cantidades diminutas de alérgeno sin adyuvantes, se produce cualquier procesamiento de alérgeno limitado o una forma diferente de procesamiento. Tanto QM1 como QM2 exhibieron mayor capacidad de estimulación de células T y más fuertes respuestas de anticuerpos protectores inducidas que las moléculas separadas.

A partir 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

La presente invención se refiere a la quimera hipoalérgica QM1 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 rutas parenterales (subcutáneas, intravenosas o intramusculares), por inhalación, orales, sublinguales, nasales, o rectales del alérgeno en cuestión. Las quimeras se pueden administrar 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

<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

ES 2 638 308 T3

<130> BialSpain Acaro
 <150> ES 200800827
 <151> 2008-03-25

5 <160> 17

<170> PatentIn version 3.5

10 <210> 1
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> ADN proteína de fusión designada QM1

<400> 1

```

gtcaaagata gtgccaatca tgaaatcaaa aaagttttgg taccaggatg ccatggttca      60
gaaccatgta tcattcatcg tggtaaacca ttccaattgg aagccgtttt cgaagccaac      120
caaaaactcaa aaaccgctaa aattgaaatc aaagcttcaa tcgatggttt agaagttgat      180
gttcccggta tcgatccaaa tgcatgccat tatatgaaat gtccattggt taaaggacaa      240
caatatgata ttaaataaac atggaatggt ccgaaaattg caccaaaatc tgaaaatggt      300
gtcgtcactg ttaaagttat gggtgataat ggtgttttgg ccagtgctat tgctacctgc      360
agtatcaatg gaaatgctcc agctgaaatc gatttgcgac aaatgcgaac tgtcactccc      420
attcgtatgc aaggaggctg tggttcatgt tgggctttct ctgggtgttc cgcaactgaa      480
tcagcttatt tggcttaccg taatcaatca ttggatcttg ctgaacaaga attagtcgat      540
tgtgcttccc aacacggttg taatggtgat accattccac gtggtattga atacatccaa      600
cataatggtg tcgtccaaga aagctactat cgatacgttg cacgagaaca atcatgccga      660
cgaccaaagt 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 ggggtgctgat      900
tattggatcg tacgaaacag ttgggatacc aattgggggtg ataatggtta cggttatttt      960
gctgccaaca tcgatttgat gatgattgaa gaatatccat atgttgtcat tctctaa      1017
    
```

20 <210> 2
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Proteína de fusión designada QM1

<400> 2

ES 2 638 308 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 2 638 308 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

5

<210> 3

<211> 1050

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> ADN proteína de fusión designada QM2

<400> 3

ES 2 638 308 T3

```

gatcaagtcg atgtcaaaga ttgtgccaat catgaaatca aaaaagtttt ggtaccagga      60
tgccatgggt cagaacccatg tatkattcat cgtggtaaac cattccaatt ggaagccggt      120
ttcgaagcca accaaaactc aaaaaccgct aaaattgaaa tcaaagcttc aatcgatggt      180
ttagaagttg atgttcccgg tatcगतcca aatggctgca gtatcaatgg aaatgctcca      240
gctgaaatcg atttgcgaca aatgcgaact gtcactccca ttcगतatgca aggaggctgt      300
ggttcatggt gggctttctc tgggtgttgc gcaactgaat cagcttattt ggcttaccgt      360
aatcaatcat tggatcttgc tgaacaagaa ttagtcगतt 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 tgcgcgtcatt attggcatca aagatttaga cgctttccgt      660
cattatgatg gccgaacaat cattcaacgc gataatggtt accaaccaaa ctatcacgct      720
gtcaacattg ttggttacag taacgcacag ggtgtcगतt attggatcgt acgaaacagt      780
tgggatacca attgggggtga taatggttac ggttattttg ctgccaacat cgatttgatg      840

atgattgaag aatatccata tgttgtcatt ctccctagge attacatgaa aagcccattg      900
gttaaaggac aacaatatga tattaatat acatggaatg ttccgaaaat tgcacaaaa      960
tctgaaaatg ttgtcgtcac tgttaaagtt atgggtgata atggtgtttt ggcctgtgct     1020
attgttactc atgctaaaat ccgcgattaa                                     1050

```

<210> 4
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión designada QM2

10

<400> 4

ES 2 638 308 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 2 638 308 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

- 5 <210> 5
- <211> 32
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> Cebador directo para amplificación de Der p 1
- <400> 5
- actgacaggc ctcgtccatc atcgatcaaa ac 32
- 15 <210> 6
- <211> 34
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> cebador inverso para amplificación de Der p 1
- <400> 6
- cggaattcct aggttagaga atgacaacat atgg 34
- 25 <210> 7
- <211> 27

ES 2 638 308 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
5 <223> Cebador directo para amplificación de Der p 2

<400> 7
cgggatccga tcaagtcgat gtcaaag 27

10 <210> 8
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> cebador inverso para amplificación de Der p 2

<400> 8
cggaattctt aatcgcgat ttagc 26

20 <210> 9
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Cebador directo utilizado para amplificación de Der p 2

<400> 9
30 cgggatccgt caaagatagt gccaatc 27

<210> 10
<211> 32
<212> ADN
35 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador inverso utilizado para amplificación de Der p 2

40 <400> 10
acggatctgc aggtagcaat agcactggcc aa 32

<210> 11
<211> 34
45 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador inverso utilizado para la amplificación de Fragmento 1

50 <400> 11
ccgaattccc taggctgcag ccatttgat cgat 34

<210> 12
<211> 26
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
60 <223> cebador inverso utilizado para la amplificación de Fragmento 2

<400> 12
cacctagggg gaatgacaac atatgg 26

65 <210> 13
<211> 26

ES 2 638 308 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Cebador directo utilizado para la amplificación de Fragmento 3

<400> 13

cacctaggca ttacatgaaa agccca 26

10 <210> 14

<211> 909

<212> ADN

<213> Escherichia coli

15 <400> 14

```

cgtccatcat cgatcaaaac ttttgaagaa tacaaaaaag ccttcaacaa aagttatgct      60
accttcgaag atgaagaagc tgcccgtaaa aactttttgg aatcagtaaa atatggtcaa      120
tcaaacggag gtgccatcaa ccatttgtcc gatttgtcgt tggatgaatt caaaaaccga      180
ttcttgatga gtgcagaagc ttttgaacac ctcaaaactc aattcgattt gaatgctgaa      240
actaacgcct gcagtatcaa tggaaatgct ccagctgaaa togatttgcg 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 tgtcgtccaa gaaagctact atcgatacgt tgcacgagaa      540
caatcatgcc gacgacaaa tgcaaacgt ttcggtatct caaactattg ccaaatttac      600
ccaccaaatg caaacaaaat tcgtgaagct ttggtcaaa cccacagcgc tattgccgtc      660
attattggca tcaaagattt agacgctttc cgtcattatg atggccgaac aatcattcaa      720
cgcgataatg gttaccaacc aaactatcac gctgtcaaca ttggttggtta cagtaacgca      780
cagggtgtcg attattggat cgtacgaaac agttgggata ccaattgggg tgataatggt      840
tacggttatt ttgctgcaa catcgatttg atgatgattg aagaatatcc atatggtgtc      900
attctctaa                                     909
    
```

<210> 15

<211> 302

20 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 15

ES 2 638 308 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 2 638 308 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

5 <210> 16
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 16
 gatcaagtcg atgtcaaaga ttgtgccaat catgaaatca aaaaagtttt ggtaccagga 60
 tgccatgggt cagaaccatg tatkattcat cgtggtaaac cattccaatt ggaagccggt 120
 ttcgaagcca accaaaactc aaaaaccgct aaaattgaaa tcaaagcttc aatcgatggt 180
 ttagaagttg atgttcccgg tatcgatcca aatgcatgcc attatatgaa atgtccattg 240
 gttaaaggac aacaatatga tattaatat acatggaatg ttccgaaaat tgcacaaaa 300
 tctgaaaatg ttgtcgtcac tgttaaagtt atgggtgata atgggtgttt ggcctgtgct 360
 attgctactc atgctaaaat ccgcgattaa 390

10 <210> 17
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

15 <400> 17

ES 2 638 308 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 epítomos de unión de anticuerpo IgE, dichos fragmentos tienen por lo menos 50 residuos de aminoácidos en longitud, caracterizado porque el polipéptido tiene por lo menos 95% de homología con la SEQ ID No.: 2, y tiene alergenidad, según se mide por capacidad de unión a IgE, aproximadamente 2500 veces menor que aquella de la mezcla de las proteínas de alérgenos Der p 1 y Der p 2 naturales individuales.
- 10 2. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido tiene mayor inmunogenicidad que los alérgenos de proteína tipo silvestre.
- 15 3. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en el que por lo menos uno de los epítomos de unión de anticuerpo IgE en la secuencia de alérgenos del grupo 2 se ha borrado mediante eliminación de por lo menos un puente de disulfuro.
- 20 4. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3 en el cual por lo menos un puente de disulfuro se ha eliminado mediante sustitución de por lo menos uno de los residuos de cisteína que forman el puente de disulfuro con un residuo de aminoácidos alternativo.
- 25 5. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4 en el cual se ha sustituido por lo menos uno de los residuos de cisteína en las siguientes posiciones de la proteína de alérgeno del grupo 2 madura de longitud completa: 8 y 119.
- 30 6. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4 o reivindicación 5 en el que se ha sustituido por lo menos uno de los residuos de cisteína sustituido con un residuo de serina.
- 35 7. Polipéptido con actividad alérgica reducida que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 2, en el que el polipéptido tiene alergenidad, según se mide por capacidad de unión a IgE, aproximadamente 2500 veces menor que aquel de la mezcla de las proteínas de alérgenos Der p 1 y Der p 2 naturales individuales.
- 40 8. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 7, que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No.: 2.
- 45 9. Polipéptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el polipéptido induce inmunogenicidad más fuerte que la mezcla de moléculas tipo silvestre individuales.
- 50 10. Polipéptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el polipéptido induce una respuesta IgG más fuerte que una mezcla de alérgenos tipo silvestre individuales.
- 55 11. Polipéptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el polipéptido exhibe mayor capacidad de estimulación de células T que la mezcla de moléculas tipo silvestre individuales y el extracto alérgico de *Dermatophagoides pteronyssinus*.
- 60 12. Polipéptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el polipéptido tiene una reducción en la capacidad de unión a IgE de más del 99%.
- 65 13. Polipéptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el péptido tiene alergenidad, según se mide por reactividad de prueba cutánea, alrededor de 50 veces menor que aquel de los alérgenos tipo silvestre individuales.
14. Polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. Polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 14 que tiene por lo menos 95% de homología con la SEQ ID No.: 1.
16. Polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 14 o reivindicación 15, que comprende la SEQ ID No.: 1.
17. Polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 16, que consiste de la SEQ ID No.: 1.
18. Vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17.
19. Célula anfitriona transformada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 18.
20. Método para producir un polipéptido, caracterizado porque comprende cultivar una célula anfitriona de la reivindicación 19 y aislar y purificar el polipéptido producido por la célula anfitriona.

21. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o el vector de expresión de la reivindicación 18 para uso en el tratamiento o prevención de alergia.
- 5 22. Uso de un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o el vector de expresión de la reivindicación 18 para la preparación de una composición para uso en el tratamiento o prevención de alergia.
- 10 23. Preparación farmacéutica caracterizada porque comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o vector de expresión de la reivindicación 18 y opcionalmente, un excipiente o adyuvante farmacológicamente aceptable.
24. Preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 23 en la forma de una solución, suspensión o emulsión secada por congelamiento, laminada.
- 15 25. Preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 23 o reivindicación 24 para administración subcutánea, sublingual, oral, nasal, rectal, tópica, inhalada o parenteral.

cgccatcatcgatcaaaaacttttgaagaatacaaaaaagccttcaacaaaagttagct
 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
 tcaaacggaggtgccatcaaccatttgtccgatttgtcgttggatgaattcaaaaaccga
 S N G G A I N H L S D L S L D E F K N R
 ttcttgatgagtgacagaagcttttgaacacctcaaaaactcaattcgatttgaatgctgaa
 F L M S A E A F E H L K T Q F D L N A E
 actaacgctgcagtatcaatggaaatgctccagctgaaatcgatttgcgacaaatgcga
 T N A C S I N G N A P A E I D L R Q M R
 actgtcactcccattcgatgcaaggaggtgtgggttcattggtggcctttctctggtgtt
 T V T P I R M Q G G C G S C W A F S G V
 gccgcaactgaatcagcttatttggcttaccgtaataatcattggatcttgctgaacaa
 A A T E S A Y L A Y R N Q S L D L A E Q
 gaattagtcgatttgcttcccaacacggttgtaatggtgataccattccacgtggatt
 E L V D C A S Q H G C N G D T I P R G I
 gaatacatccaacataatggtgtcgtccaagaaagctactatcgatacgttgcacgagaa
 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
 ccaccaaatagcaacaaaatttgcgtaagctttggctcaaaccacagcgtattgcccgtc
 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
 cgcgataatggttaccacaaaactatcacgctgtcaacattggttggttacagtaacgca
 R D N G Y Q P N Y H A V N I V G Y S N A
 caggggtgcgattattggatcgtaacaaacagttgggataccaattgggggtgataatggt
 Q G V D Y W I V R N S W D T N W G D N G
 tacggttattttgctgccaacatcgatttgcgattgattgaagaatatccatagttgtc
 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

gatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaaagttttggtaccagga
D Q V D V K D (C) A N H E I K K V L V P G
tggcatgggttcagaaccatgtatcattcatcggtgtaaacattccaattggaagccggt
(C) H G S E P (C) I I H R G K P F Q L E A V
ttcgaagccaacaaaaactcaaaaaccgctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatggt
F E A N Q N S K T A K I E I K A S I D G
ttagaagttgatgttcccggatcgatccaaatgcatgccattatgaaatgtccattg
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
tctgaaaatggtgctcactgttaaagttatgggtgataatggtgttttgccctgtgct
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

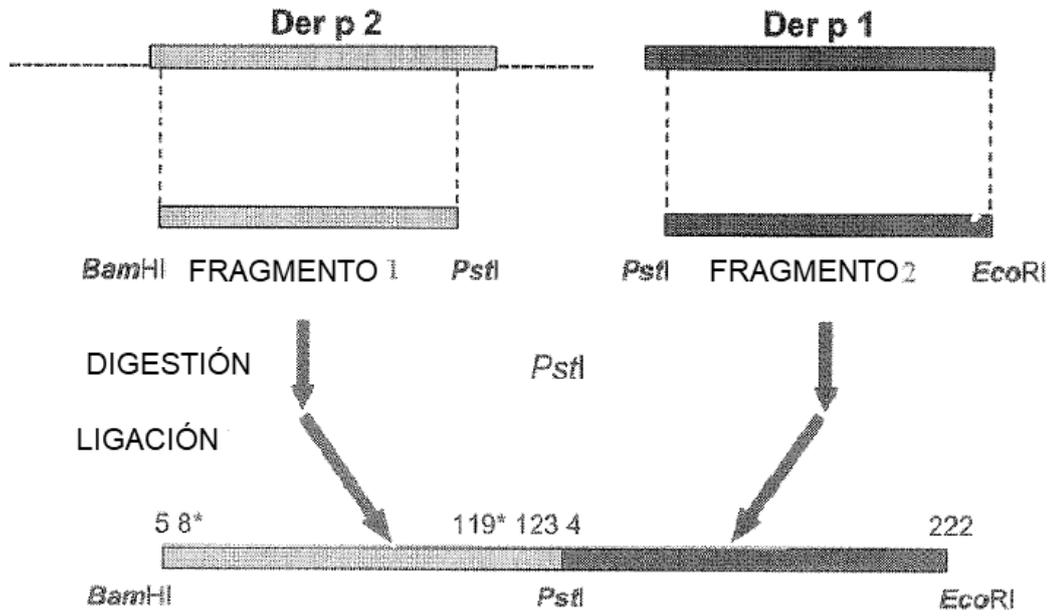


FIG. 3

gtcaaagatagtgccaatcatgaaatcaaaaaagttttggtagaccaggatgccatggttca
 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
 caaaactcaaaaaccgctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatgggttagaagttgat
 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
 caatatgatattaataatatacatggaatgttccgaaaattgcacaaaaatctgaaaatggt
 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
 agtatcaatggaaatgctccagctgaaatcgatttggcagaaaatgccaactgctcactccc
 S I N G N A P A E I D L R Q M R T V T P
 attcgtatgcaaggaggctgtgggttcattgttgggtttctctgggtgttgcgcgaactgaa
 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
 cataatgggtgctgccaagaaagctactatcgatagcttgcacgagaacaatcatgccga
 H N G V V Q E S Y Y R Y V A R E Q S C R
 cgaccaaattgcacaacggttccggtatctcaaaactattgccaatattaccaccaaattgca
 R P N A Q R F G I S N Y C Q I Y P P N A
 acaaaaattcgtgaaagcttgggtcaaaaccacagcgttattgcccgtcattattggcattc
 N K I R E A L A Q T H S A I A V I I G I
 aaagatttagacgctttccgctcattatgatggcgaacaatcattcaacgcgataatggt
 K D L D A F R H Y D G R T I I Q R D N G
 taccaccaaactatcacgctgcaacattggttgggttacagtaacgcacaggggtgtcgat
 Y Q P N Y H A V N I V G Y S N A Q G V D
 tattggatcgtacgaaacagttgggataccaattgggggtgataatgggttacgggtatattt
 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

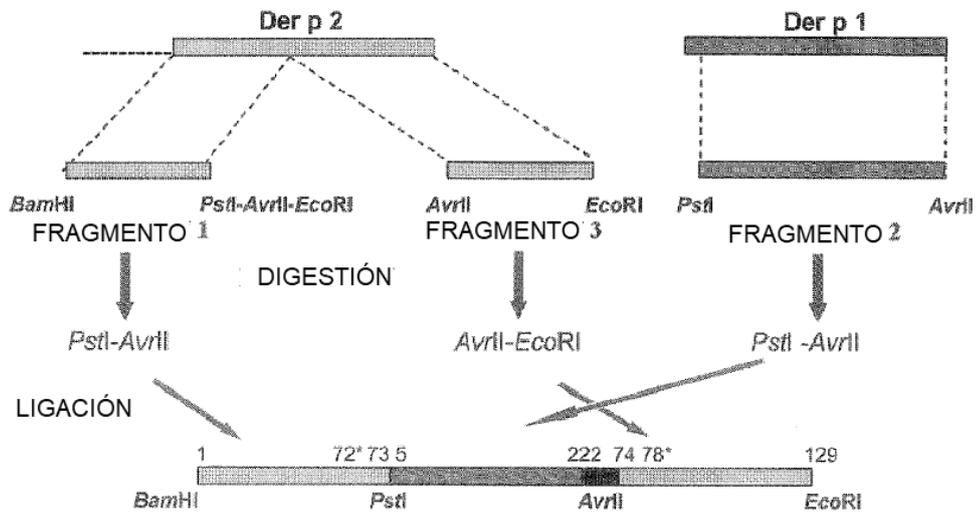


FIG. 5

gatcaagtcgatgtcaaagattgtgccaatcatgaaatcaaaaaagttttggtaccagga
 D Q V D V K D C A N H E I K K V L V P G
 tgccatggttcagaaccatgtatcattcatcgtggtaaacattccaattggaagccgtt
 C H G S E P C I I H R G K P F Q L E A V
 ttggaagccaacaaaactcaaaaaccgctaaaattgaaatcaaagcttcaatcgatggt
 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
 ggttcattggtgggtttctctggtggttgcgcaactgaatcagcttatttggcttacgt
 G S C W A F S G V A A T E S A Y L A Y R
 aatcaatcattggatcttgcgtgaacaagaattagtcgattgtgcttccaacacggttgt
 N Q S L D L A E Q E L V D C A S Q H G C
 aatgggtgataccattccacgtggtattgaatacatccaacataatggtgtcgtccaagaa
 N G D T I P R G I E Y I Q H N G V V Q E
 agctactatcgatacgttgcacgagaacaatcatgcccgcgaccaaattgcacaacgtttc
 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
 gctcaaaccacagcgttattgcccgtcattattggcatcaaagatttagacgctttccgt
 A Q T H S A I A V I I G I K D L D A F R
 cattatgatggccgaacaatcattcaacgcgataatggttaccaaccaaactatcacgt
 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
 tgggataccaattgggggtgataatggttacgggttatttggctgccaacatcgatttgatg
 W D T N W G D N G Y G Y F A A N I D L M
 atgattgaagaatatccatatggttgcattctccctaggcattacatgaaaagcccattg
 M I E E Y P Y V V I L P R H Y M K S P L
 gttaaaggacaacaatatgatattaaatatacatggaatggtccgaaaattgcaccaaa
 V K G Q Q Y D I K Y T W N V P K I A P K
 tctgaaaatggtgctcgtcactgttaaagttatgggtgataatgggtgttttggcctgtgct
 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

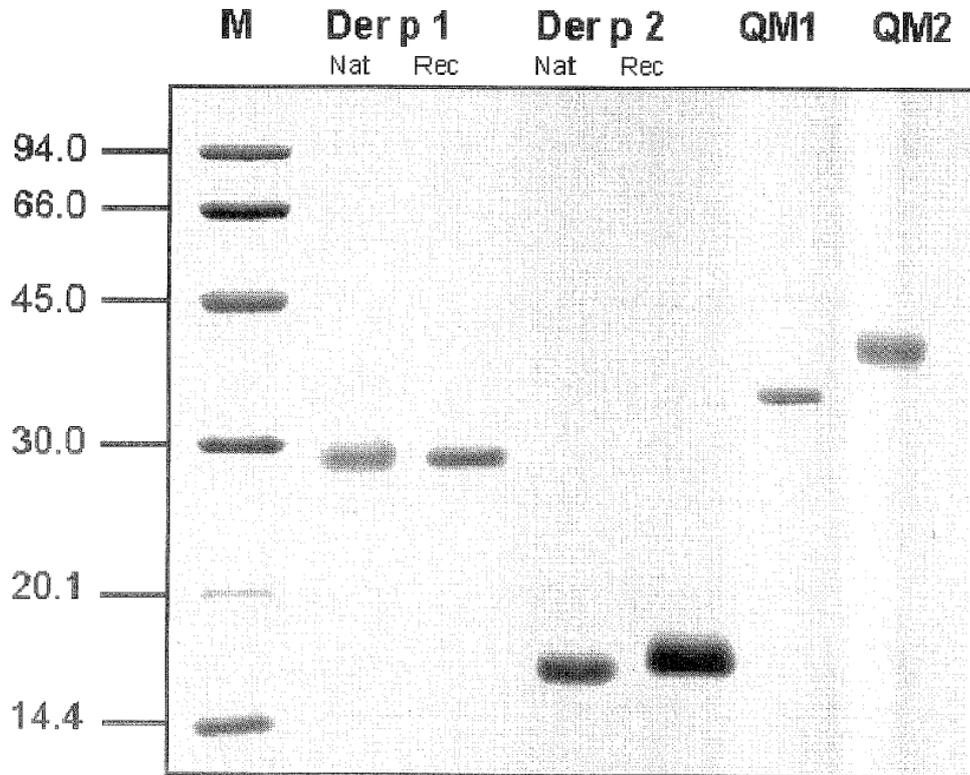


FIG. 7

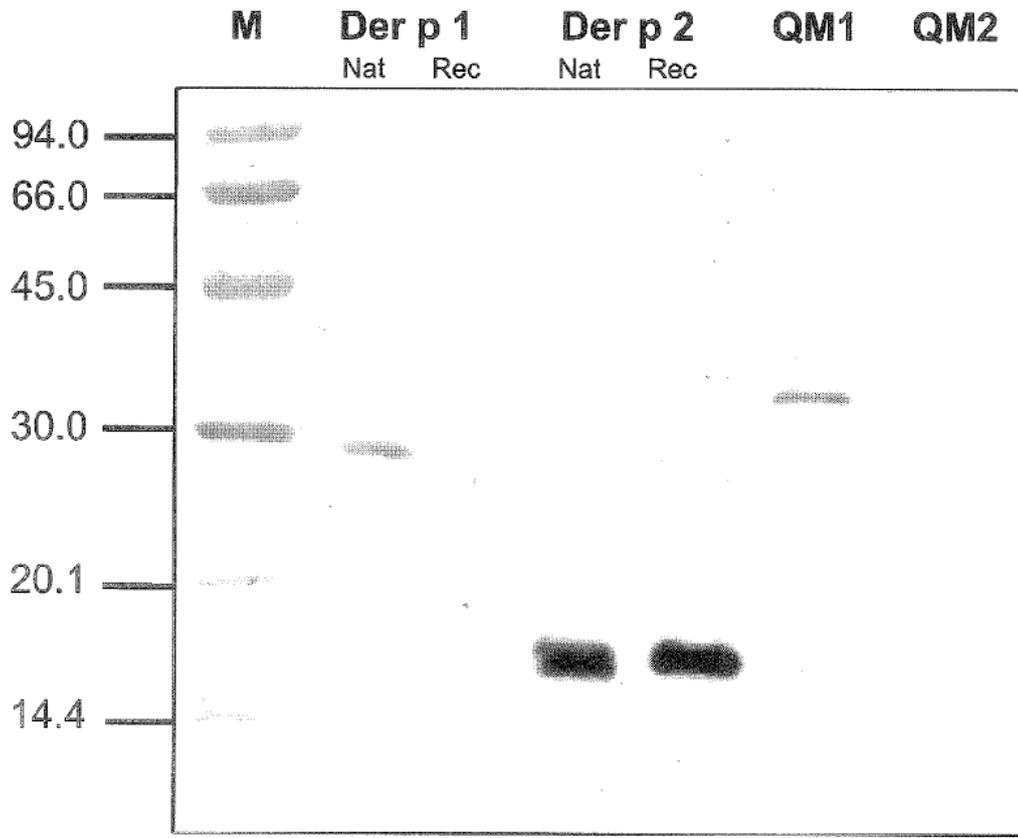


FIG.8

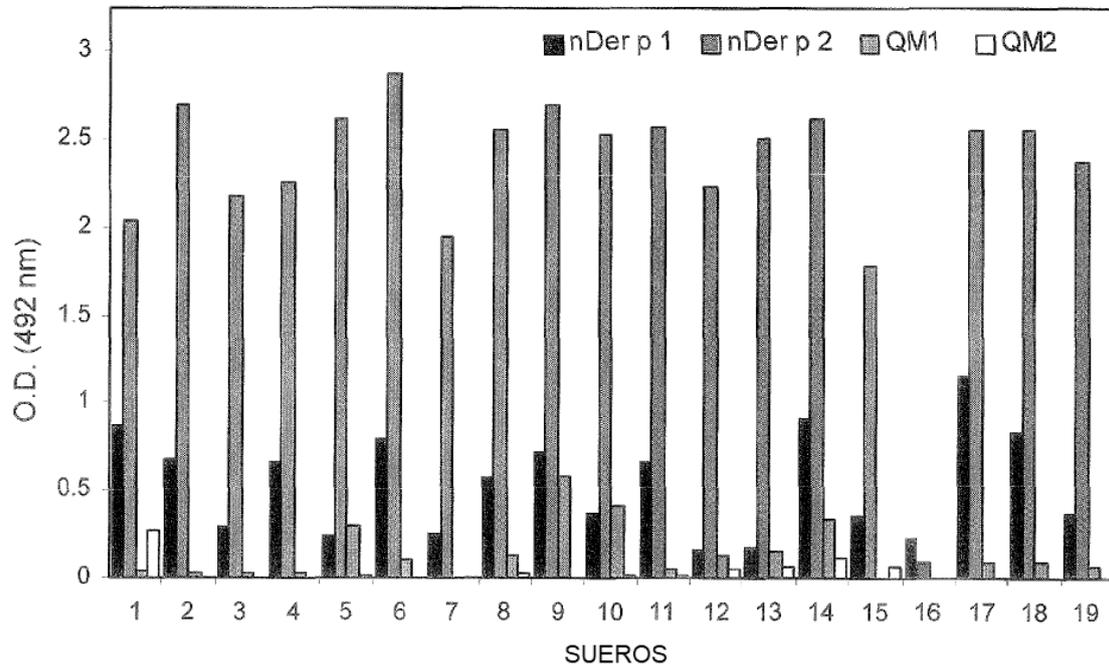


FIG.9

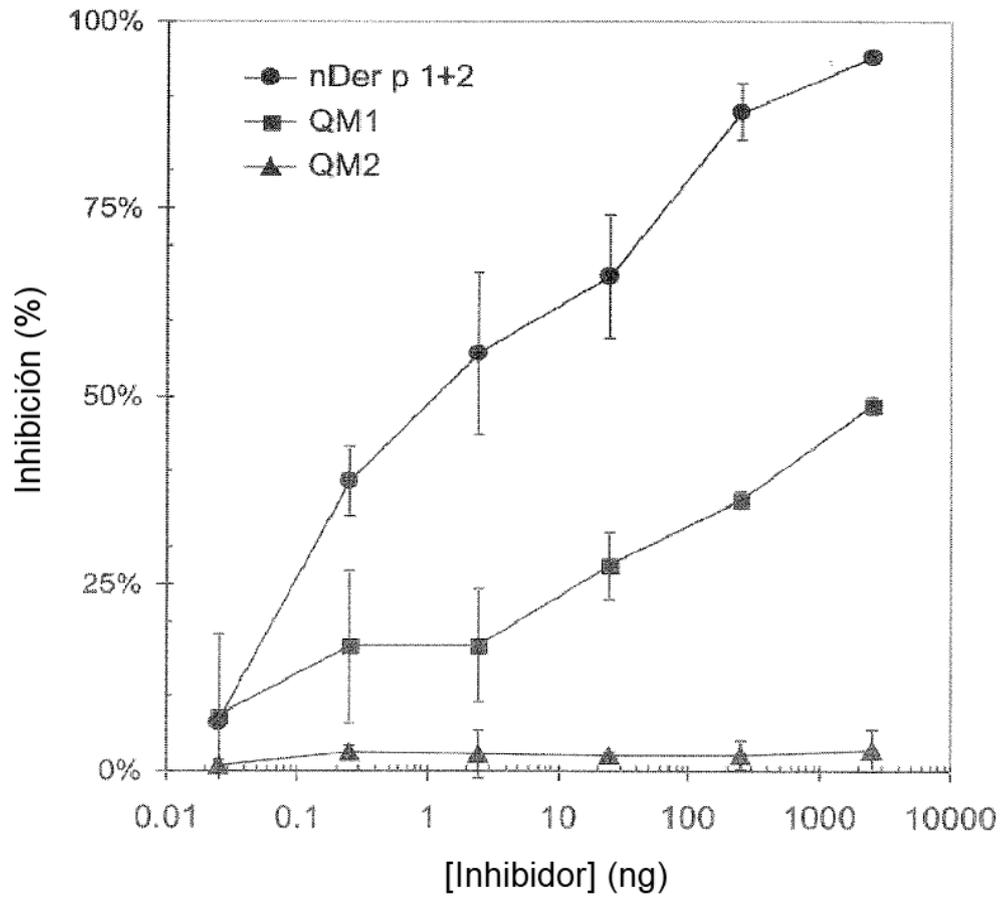


FIG.10

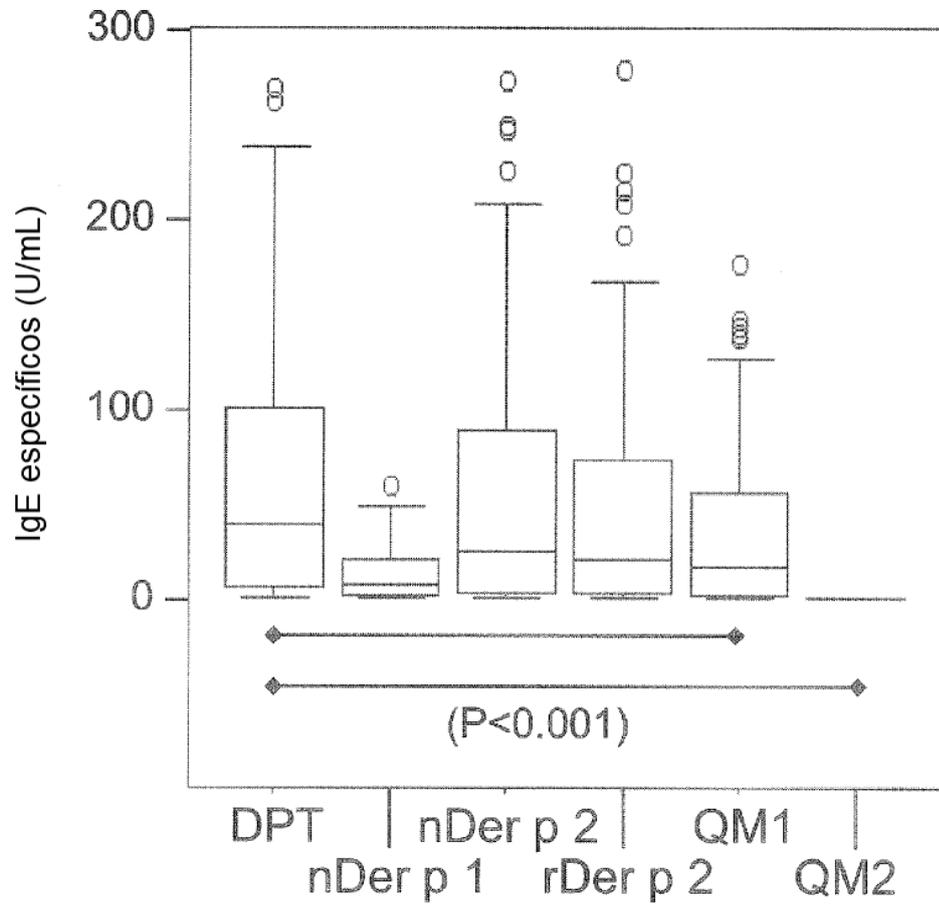


FIG. 12

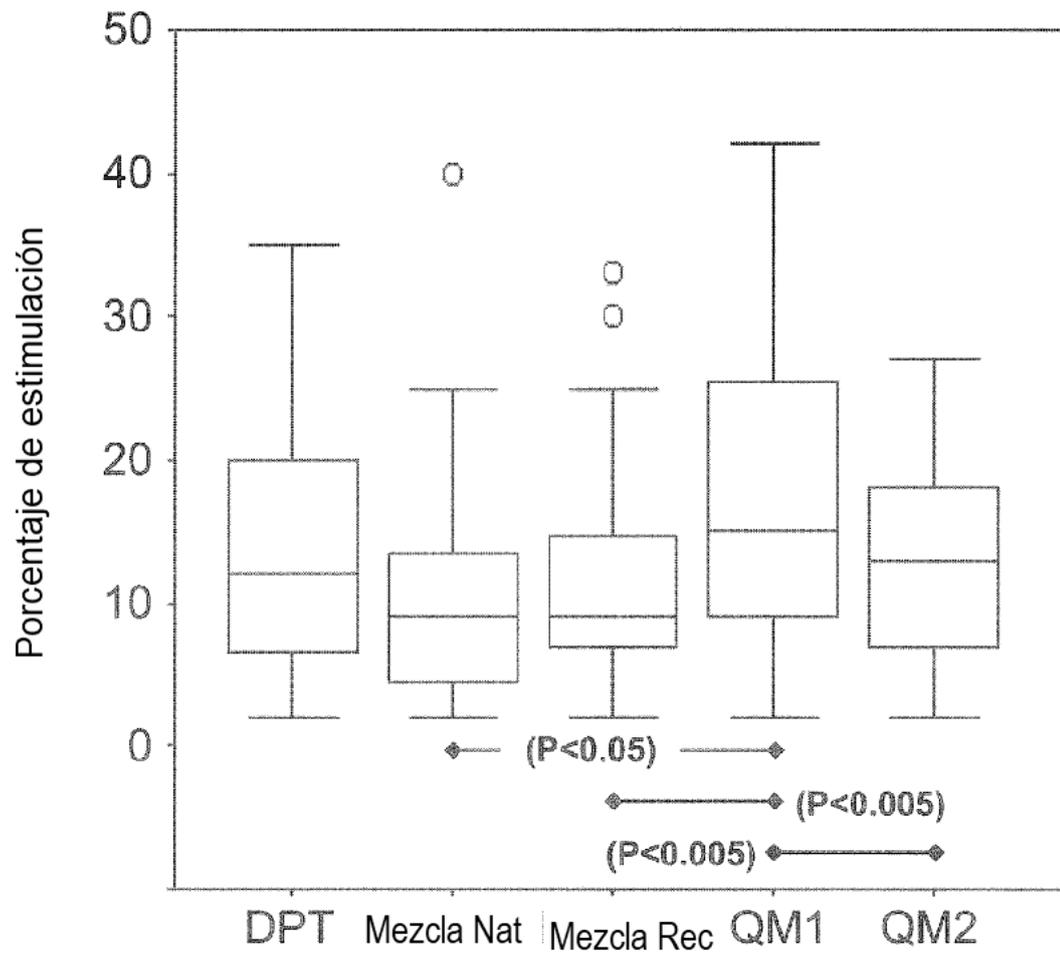


FIG. 13

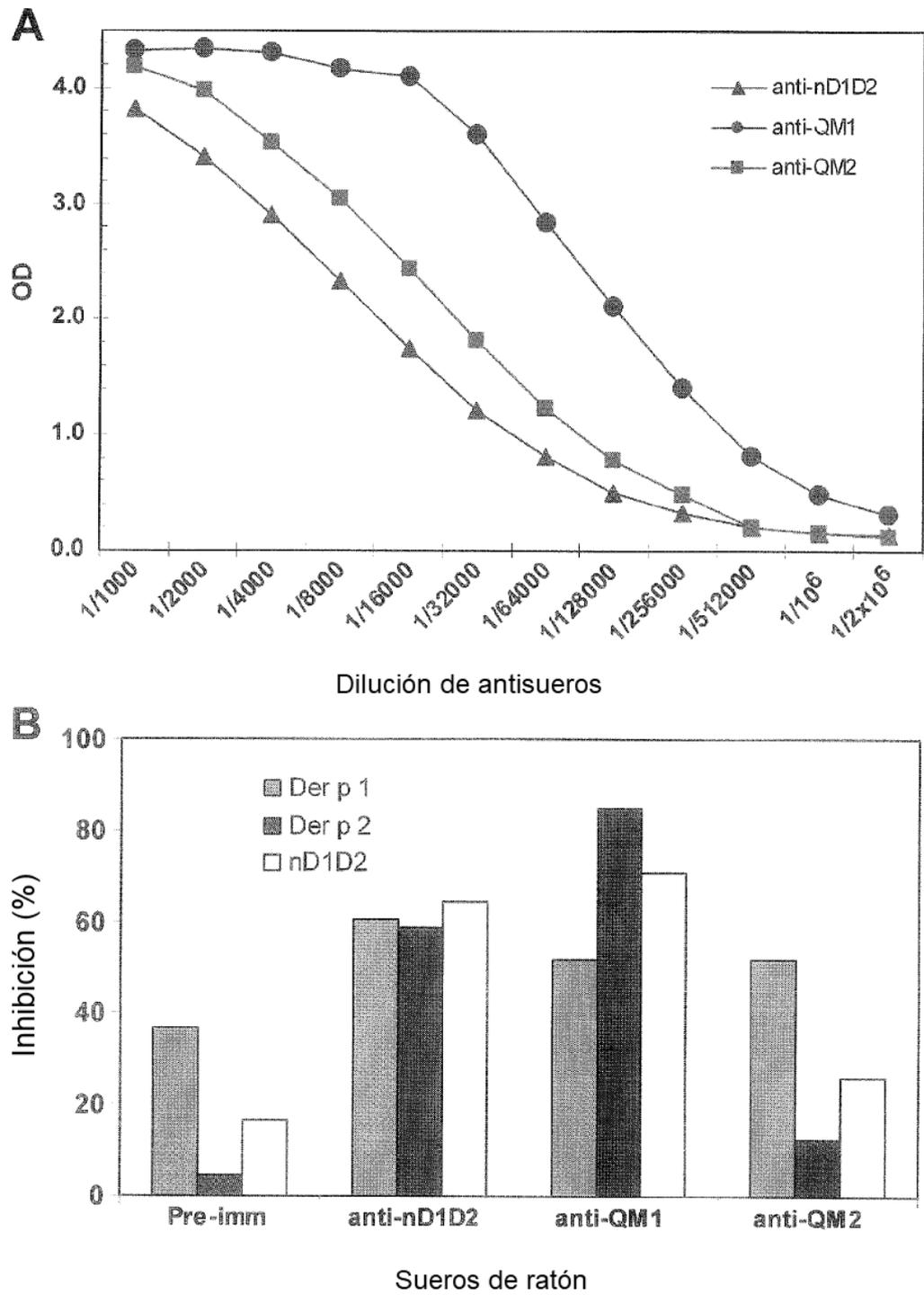


FIG. 14