(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 685 478**

(51) Int. Cl.:

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2012** **PCT/EP2012/057046**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012** **WO12143374**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2012** **E 12714328 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018** **EP 2699681**

(54) Título: **Hipoalergénicos**

(30) Prioridad:

18.04.2011 FI 20115374
18.04.2011 US 201161476488 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2018

(73) Titular/es:

DESENTUM OY (100.0%)
Kivipylväänkuja 5
02940 Espoo, FI

(72) Inventor/es:

TAKKINEN, KRISTIINA;
LAUKKANEN, MARJA-LEENA;
SÖDERLUND, HANS;
JYLHÄ, SIRPA;
HOLKERI, HEIDI;
NIEMI, MERJA;
JÄNIS, JANNE y
ROUVINEN, JUHA

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 685 478 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

Hipoalergénicos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos mutantes útiles como hipoalergénicos. Más específicamente la invención se refiere a los polipéptidos específicos Bet v 1. Adicionalmente, la invención se refiere a formulaciones vacunales que comprenden dichos polipéptidos; también se describe el uso de dichas formulaciones en la vacunación.

Antecedentes de la invención

Las alergias están causadas por la reacción inmunitaria contra proteínas comúnmente inocuas, los alérgenos. Las enfermedades alérgicas están alcanzando proporciones de epidemia en todo el mundo. Más del 25 % de la población de los países industrializados sufren el tipo I de alergia y el número aumenta rápidamente. La alergia al polen de abedul es una forma muy común de tipo I de alergia. El Bet v 1 es el alérgeno principal del polen de abedul. Más información sobre el alérgeno Bet v 1, sus isoalérgenos y variantes, se encuentra en el sitio de la OMS en internet www.allergen.org.

El tipo I de alergia se basa en la formación de anticuerpos inmunoglobulinas E (IgE). Los síntomas se producen cuando una molécula de alérgeno se une a dos anticuerpos IgE unidos a receptores de una superficie de mastocitos o basófilos induce la unión cruzada de los complejos IgE-FcεRI. Esto desencadena la desgranulación de mediadores biológicos, tales como la histamina y mediadores lipídicos, que producen las reacciones inflamatorias y los síntomas, tales como el asma alérgica, rinitis, alergia alimentaria y cutánea, e incluso anafilaxia.

La IgE es una molécula grande que consiste en dos cadenas ligeras y pesadas idénticas. Existen cinco dominios en la cadena pesada de IgE: VH, Cε1, Cε2, Cε3 y Cε4. El tamaño de la molécula de IgE completa es de aproximadamente 200 kDa. Se han determinado las estructuras cristalinas del fragmento Cε2 - Cε4 unido a su receptor FcεRI (Garman y col., Nature 2000(406):259-266, y Wan y col., Nature Immunology, 2002(3):681-686).

En los últimos pocos años, se han determinado las estructuras tridimensionales de un gran número de alérgenos diferentes. Estructuralmente, estos alérgenos varían considerablemente, y no se ha identificado un motivo estructural común que pudiera explicar la capacidad de los alérgenos para causar la producción de anticuerpos IgE. Sin embargo, hay estudios que implican que la alergenicidad está restringida solo a unas pocas familias proteicas, dando lugar de esta manera a la prueba de que las características estructurales de las proteínas podrían tener también un papel en la alergenicidad (Jenkins y col., J Allergy Clin. Immunol. 2005(115):163-170; Raudauer y col., J Allergy Clin Immunol. 2008(121):847-852; Rouvinen y col., PloS ONE 2010(5): e9037).

La cuestión esencial cuando se estudia la alergenicidad implica el llamado epítopo celular B, el sitio de unión de un alérgeno al anticuerpo IgE. Desafortunadamente, sin embargo, este epítopo celular B no se puede deducir directamente de la estructura tridimensional de un alérgeno. Adicionalmente, existen diferencias de epítopos de un alérgeno que son reconocidos por la IgE de un paciente particular. Por lo tanto, los epítopos celulares B se han buscado utilizando distintas técnicas y distintas bases, tales como analizando fragmentos alergénicos o péptidos, que reaccionan con agrupamientos de sueros con IgE policlonal de pacientes alérgicos, mutagénesis dirigida al sitio de alérgenos, uso de miméticos de epítopos (mimótopos) y estudios de modelos informáticos. Sin embargo, como tal no existen mapas generales de epítopos dominantes para ningún alérgeno.

Con respecto al polen de abedul, por ejemplo, Holm y col. (The Journal of Immunology 2004 (173): 5258-5267) produjeron mutantes de Bet v 1 que contenían 4 y 9 mutaciones puntuales con el fin de manipular la topología de superficie en “áreas seleccionadas”. El artículo no describe como se hace esta “selección”. Los mutantes con cuatro sustituciones de aminoácidos representaban tres áreas diferentes en la superficie molecular y los mutantes con nueve sustituciones de aminoácidos representaban cinco áreas diferentes en la superficie molecular. Estos mutantes de Bet v 1 tienen en algunos casos una reducción de la capacidad para unirse al suero de IgE humana y para desencadenar la liberación de histamina por los basófilos humanos. También son capaces de inducir anticuerpos IgG contra el Bet v 1 no mutado.

Se ha informado de más alérgenos recombinantes modificados:
Las Publicaciones de patente internacional WO 02/40676 y WO 03/096869 desvelan numerosas formas mutantes del alérgeno Bet v 1 del polen de abedul. Estos mutantes se produjeron introduciendo mutaciones aleatorias en el supuesto sitio de unión a IgE, basándose en el análisis de secuencia de estructuras de superficie conservadas del polipéptido Bet v 1. El documento WO 03/096869 desvela el uso de cuatro mutaciones primarias en diferentes “grupos pequeños” en la superficie del alérgeno.

La publicación de patente internacional WO 073907 desvela un polipéptido Bet v 1 que comprende tres sustituciones o eliminaciones de aminoácidos en los sitios de aminoácido 54, 115 o 123. No existen pruebas de que estos mutantes tengan una capacidad reducida de liberación de histamina.

La publicación de patente internacional WO 2009/024208 desvela un mutante de Bet v 1 que tiene al menos cuatro mutaciones en el área de aminoácidos 100-125. Sin embargo, debido a las mutaciones se pierde la estructura tridimensional del polipéptido y no existe información sobre la actividad de liberación de histamina.

La publicación de patente internacional WO 2008/092992 desvela un procedimiento de bloqueo de la interacción de superficie tipo I de sustancias alergénicas modificando los restos de aminoácidos en epítopos alergénicos no continuos, es decir, en una superficie plana con un área de 600-900 Å sobre la sustancia alergénica y sugiere que se podrían preparar en consecuencia proteína de polen de abedul hipoalergénicas.

Niemi y col., Structure 2007(15): 1413-21, desvela una estrategia en la búsqueda de epítopos alergénicos específicos en línea con la divulgación de Laver y col., Cell 1990(61):553-556, que establece que el único procedimiento racional por el que determinar el epítopo completo de cualquier alérgeno implica la medición de la estructura cristalina de un alérgeno en el complejo con un anticuerpo IgE. Niemi, y col. desvelan la estructura cristalina de un fragmento Fab de IgE formando un complejo con β-lactoglobulina (BLG). También presentan cómo dos moléculas de Fab/IgE se unen a la BLG dimérica y que el epítopo de IgE es diferente cuando se compara con las estructuras de epítopos de IgG conocidos, siendo una superficie “plana” localizada en la región de la lámina β.

Rouvinen y col., PloS ONE 2010(5):e9037 investigaron el papel de estructuras diméricas de los alérgenos utilizando procedimientos bioinformáticos combinados con espectrometría de masas nativa. (Espectrometría de masas en ciclotrón iónico transformado de Fourier con electronebulización, IES-FT-ICR-MS. Las mediciones ESI-MS de las 55 estructuras cristalinas de alérgenos conocidas demostraban que el 80 % de ellas existían en dímeros u oligómeros simétricos en los cristales y que la mayoría son dímeros transitorios que se forman a altas concentraciones proteicas. La posible relación entre la estructura dimérica y la alergenicidad se estudió con un alérgeno recombinante de la leche de vaca, la β-lactoglobulina (rBos d 5B), que existe como un dímero, y su mutante H146P, que existe principalmente como un monómero. Se observó una capacidad de liberación de histamina reducida hasta cierto punto con el rBos d 5 B mutante H146P en comparación con el rBos d 5B nativo y el rBos d 5B recombinante. Aunque los autores concluyen que la dimerización podría ser una característica muy común y esencial de los alérgenos y en general sugiere que la preparación de variantes monoméricas puras de alérgenos podría abrir nuevas posibilidades para la inmunoterapia específica, el papel último de las características estructurales en la alergenicidad sigue siendo desconocido. A partir del análisis cristalino *in vitro* no se pueden perfilar conclusiones directas de cómo se comportan las moléculas de alérgenos en un cuerpo humano, es decir, *in vivo*.

Hoy día la tendencia en el tratamiento de todos los síntomas de alergia es hacia la inducción activa de tolerancia utilizando la desensibilización específica al alérgeno en vez de evitar el alérgeno, lo que a menudo no es posible, o simplemente tratando los síntomas. La terapia de desensibilización actual se basa en alérgenos purificados de fuentes naturales, en los que las variaciones entre lotes pueden dar lugar a problemas relacionados con el hallazgo y mantenimiento de la dosificación correcta y la eficacia del tratamiento. Estos problemas pueden dar lugar a un riesgo potencial de efectos secundarios anafilácticos y la sensibilización a nuevos alérgenos.

El uso de alérgenos recombinantes para la desensibilización eliminaría las desventajas relacionadas con las variaciones entre lotes, y los primeros alérgenos recombinantes están en ensayos clínicos (Valenta y col., Annu Rev Immunol 2010(28):211-41). La eficacia de dichos alérgenos en clínica sigue aún por ver.

Hay una gran necesidad reconocida de vacunas eficaces y seguras y productos terapéuticos que afronten el problema médico en aumento de la alergia. En este momento el mercado de terapias seguras y eficaces para la alergia están poco desarrolladas.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refifeer a un polipéptido Bet v 1 recombinante del polen de abedul hipoalergénico basado en un matriz de secuencia de aminoácidos de tipo silvestre como se representa en la SEQ ID NO: 3 o de cualquier otra isoforma del Bet v 1 de tipo silvestre del mismo seleccionado de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4-38, comprendiendo dicho polipéptido

(1) una primera sustitución de aminoácidos en la posición E101, en el que la primera sustitución de aminoácidos E101K, y
(2) una segunda sustitución de aminoácidos en la posición N28, en el que la segunda sustitución de aminoácidos es N28K.

La presente invención se refiere adicionalmente a un polipéptido hipoalergénico definido anteriormente para su uso como una vacuna para desensibilizar contra el polen de abedul.

La presente invención se refiere adicionalmente a una composición vacunal que comprende al menos un polipéptido hipoalergénico definido anteriormente y al menos un adyuvante farmacéuticamente aceptable. En una realización de la presente invención dicha vacuna es para su administración sublingual.

Los polipéptidos hipoalergénicos de acuerdo con la presente invención tienen una capacidad de liberación de histamina que está reducida al menos 20x en comparación con la capacidad de liberación de histamina del Bet v 1

de tipo silvestre. En una realización los polipéptidos tienen una capacidad de liberación de histamina que está reducida al menos 100x.

Breve descripción de las figuras

A continuación, se describirá la invención con más detalle por medio de realizaciones preferidas en referencia a los dibujos adjuntos, en los que

La Figura 1 ilustra los supuestos retos del epítopo de IgE de Bet v 1 (restos en rojo) y los supuestos restos implicados en la dimerización del Bet v 1 (restos en violeta) derivado en el Ejemplo 1;
La Figura 2 es una representación esquemática de las unidades de expresión bacteriana para la producción de alérgenos recombinantes, en la que Ptac es un promotor, PelB es la secuencia de señal asociada a la región codificante de los alérgenos recombinantes y las estrellas ilustran los sitios de sustitución de aminoácidos;
La Figura 3 es un alineamiento de secuencia de aminoácidos de 36 isoformas de Bet v 1;
La Figura 4 muestra las secuencias de ácido nucleico del polipéptido del Bet v 1 de tipo silvestre (A, SEQ ID NO: 1) y el polipéptido N28K-E101K (B, SEQ ID NO: 2) que se utiliza en el Ejemplo 2;
La Figura 5 muestra la inhibición competitiva del suero de IgE por la unión al Bet v 1 con los polipéptidos Bet v 1 recombinante y el Bet v 1 N28K-E101K; y
La Figura 6 muestra los resultados de liberación de histamina con los polipéptidos Bet v 1 recombinante y Bet v 1 N28K-E101K.
La Figura 7 muestra el espectro de masas ESI FT-ICR nativo del Bet v 1 recombinante de tipo silvestre y el Bet v 1 recombinante mutante N28K-E101K a la concentración de 3 μM.

Descripción detallada

En la siguiente descripción, ejemplos y reivindicación, se utilizan tanto los códigos de tres letras y de una letra para los aminoácidos. Véase, por ejemplo, IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides. Eur. J. Biochem. 138:9-37(1984).

La denominación de los sitios de aminoácido en los polipéptidos de acuerdo con la presente invención se ejemplifica de la siguiente manera: N28 significa que hay un resto de asparagina en la posición 28, mientras que N28K significa que el resto de asparagina de la posición 28 se ha sustituido con un resto de lisina. En correspondencia, E101 significa que hay un resto de ácido glutámico en la posición 101, mientras que E101K significa que el resto de ácido glutámico de la posición 101 se ha sustituido por un resto de lisina, etc.

La alergia al polen de abedul es una forma muy común de alergia y el polen del abedul blanco (*Betula verrucosa*) es una de las causas principales de las reacciones alérgicas de tipo I en Europa y Norteamérica. Se estima que aproximadamente un 10-15 % de la población sufre alergia al polen de abedul. Además, otros alérgenos, tales como los alérgenos de la manzana, tienen reacciones cruzadas con la IgE específica del polen de abedul que producen reacciones alérgicas incluso cuando el sujeto no tiene contacto con polen.

El Bet v 1 es el alérgeno principal del polen de abedul y es responsable de la unión con IgE en más del 95 % de los sujetos alérgicos al polen de abedul. El Bet v 1 es una proteína que tiene un peso molecular de 17 kD. La secuencia de aminoácidos del Bet v 1 de tipo silvestre se da en la SEQ ID NO: 3. El sitio de internet de alérgenos de la OMS (www.allergen.org) enumera treinta y seis (36) isoformas de Bet v 1, que se han alineado como secuencias en la Figura 3. El alineamiento muestra que el Bet v 1 está altamente conservado. La matriz de la isoforma utilizada como Bet v 1 de tipo silvestre en la presente invención es de la isoforma Bet v 1a (Bet v 1.0101), pero se puede utilizar cualquiera de estos isoalérgenos, según sea apropiado, para proporcionar una variante polipeptídica hipoalergénica de acuerdo con la presente invención.

Las secuencias de aminoácidos de todas las isoformas de Bet v 1 se desvelan en el listado de secuencias de la siguiente manera: 1.0101 (SEQ ID NO: 3), 1.0102 (SEQ ID NO: 4), 1.0103 (SEQ ID NO: 5), 1.2501 (SEQ ID NO: 6), 1.1501 (SEQ ID NO: 7), 1.1502 (SEQ ID NO: 8), 1.2801 (SEQ ID NO: 9), 1.3001 (SEQ ID NO: 10), 1.2901 (SEQ ID NO: 11), 1.2301 (SEQ ID NO: 12), 1.0501 (SEQ ID NO: 13), 1.0601 (SEQ ID NO: 14), 1.0602 (SEQ ID NO: 15), 1.0801 (SEQ ID NO: 16), 1.1701 (SEQ ID NO: 17), 1.0401 (SEQ ID NO: 18), 1.0402 (SEQ ID NO: 19), 1.0701 (SEQ ID NO: 20), 1.1001 (SEQ ID NO: 21), 1.2401 (SEQ ID NO: 22), 1.2601 (SEQ ID NO: 23), 1.2701 (SEQ ID NO: 24), 1.2201 (SEQ ID NO: 25), 1.0201 (SEQ ID NO: 26), 1.0901 (SEQ ID NO: 27), 1.0301 (SEQ ID NO: 28), 1.1401 (SEQ ID NO: 29), 1.1402 (SEQ ID NO: 30), 1.1901 (SEQ ID NO: 31), 1.2001 (SEQ ID NO: 32), 1.1801 (SEQ ID NO: 33), 1.1101 (SEQ ID NO: 34), 1.1201 (SEQ ID NO: 35), 1.1601 (SEQ ID NO: 36), 1.2101 (SEQ ID NO: 37), y 1.1301 (SEQ ID NO: 38), respectivamente.

Las isoformas de Bet v 1 incluyen variantes que tienen un potencial alergénico diferente. Las isoformas de Bet v 1 son al menos un 94 % idénticos a la secuencia de aminoácidos del Bet v 1 de tipo silvestre con la SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, las isoformas Bet v 1.0401 con un 96 % de identidad de restos de aminoácidos y Bet v 1.001 con un 94 % de identidad de restos con Bet v 1.0101 se han identificado como hipoalergénicos naturales, debido a que son pobres inductores de a liberación de un mediador. En comparación con el Bet v 1.0101, el Bet v 1.1001 contiene, por ejemplo, la mutación N28K. También se ha considerado que cumplan los criterios para representar candidatos vacunales excelentes. (Wagner y col., J. Allergy Clin Immunol 2008;121:725-735). Sin embargo, no hay disponibles

datos científicos, experimentales ni clínicos.

La presente invención proporciona variantes polipeptídicas hipoalergénicos mutadas de Bet v 1, que sean útiles como vacunas para sujetos inmunizados que necesitan las mismas y previniendo así y/o aliviando la alergia y desensibilizar sujetos que sufren alergia contra el polen de abedul.

Los polipéptidos Bet v 1 del polen de abedul recombinantes de acuerdo con la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre, pero contienen mutaciones en posiciones de aminoácidos seleccionadas para reducir o disminuir completamente su capacidad para inducir la producción de IgE, pero manteniendo su capacidad para inducir la producción de anticuerpo IgG protectores, es decir, son hipoalergénicos.

Específicamente, la presente invención se refiere a un polipéptido Bet v 1 recombinante hipoalergénico de polen de abedul como se define en la reivindicación 1. También se desvela un polipéptido Bet v 1 recombinante hipoalergénico del polen de abedul basado en una matriz de secuencia de aminoácidos que se representa en la SEQ ID NO: 3 o de cualquier otra isoforma del Bet v 1 de tipo silvestre de la misma, comprendiendo dicho polipéptido natural o por mutación

(1) al menos una primera sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en los restos de aminoácidos E101, K80, N82, S84, S99, S117, y K119, y
(2) al menos una segunda sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en los restos de aminoácidos N28, D25, N43, G46, N47, e Y158.

En una realización, el polipéptido de la presente invención tiene la matriz de una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre como se representa en la SEQ ID NO: 3. En otra realización, el polipéptido de la presente invención tiene la matriz de una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4-38.

En una realización de la invención, el polipéptido Bet v 1 de polen de abedul recombinante hipoalergénico se representa por la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 39, en la que la sustitución de aminoácidos en la posición 29 es K y la sustitución de aminoácidos en la posición 101 es K. La SEQ ID NO: 39 desvela una secuencia de polipéptido del Bet v 1 con las posiciones para las sustituciones de aminoácidos (posiciones de aminoácidos 25, 28, 43, 46, 47, 80, 82, 84, 99, 101, 117, 119, 158) y también desvela los aminoácidos de tipo silvestre en estas posiciones.

Cualquier combinación de la primera y segunda sustitución en cualquiera de las posiciones representadas da como resultado un polipéptido hipoalergénico. En un aspecto de la divulgación, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 41-47, y al menos una segunda sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en los restos de aminoácidos N28, D25, N43, G46, N47, e Y158, o una isoforma de los mismos. Preferentemente, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 41-47, y al menos una segunda sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en los restos de aminoácidos N28, D25, N43, G46, N47, e Y158, o una isoforma de los mismos. En otra realización de la invención, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 41, en la que el aminoácido 101 es K, la SEQ ID NO: 42, en la que el aminoácido 80 es Y, la SEQ ID NO: 43, en la que el aminoácido 82 es K, la SEQ ID NO: 44 en la que el aminoácido 84 es K, la SEQ ID NO: 45, en la que el aminoácido 99 es K, la SEQ ID NO: 46, en la que el aminoácido 117 es K, y la SEQ ID NO: 47, en la que el aminoácido 119 es E; y al menos una segunda sustitución de aminoácidos en la posición seleccionada de entre el grupo que consiste en los restos de aminoácidos N28, D25, N43, G46, N47, e Y158. Preferentemente, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 41, en la que el aminoácido 101 es K, la SEQ ID NO: 42, en la que el aminoácido 80 es Y, la SEQ ID NO: 43, en la que el aminoácido 82 es K, la SEQ ID NO: 44 en la que el aminoácido 84 es K, la SEQ ID NO: 45, en la que el aminoácido 99 es K, la SEQ ID NO: 46, en la que el aminoácido 117 es K, y la SEQ ID NO: 47, en la que el aminoácido 119 es E; y al menos una segunda sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en los restos de aminoácidos N28, D25, N43, G46, N47, e Y158. La SEQ ID NO: 41 desvela la secuencia del polipéptido Bet v 1, en la que el aminoácido en la posición 101 es una sustitución y no el aminoácido E de tipo silvestre. De manera similar, las SEQ ID NO: 42-47 muestran los polipéptidos Bet v 1 , en los que los aminoácidos de las posiciones 80, 82, 84, 99, 117 y 119, respectivamente, son sustituciones y no aminoácidos de tipo silvestre.

En un aspecto de la divulgación, dicha al menos una primera sustitución de aminoácidos está en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en los restos de aminoácidos E101 y S99, y dicha al menos una segunda sustitución de aminoácidos está en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en las sustituciones de aminoácidos N28 y D25.

En otro aspecto preferido de la divulgación dicha al menos una primera sustitución de aminoácidos está en la posición E101, y dicha al menos una segunda sustitución de aminoácidos está en la posición N28. En una realización preferida de la invención, el polipéptido Bet v 1 del polen de abedul recombinante hipoalergénico está representado por la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 40. La SEQ ID NO: 40 muestra la

secuencia de polipéptido del Bet v 1 de polen de abedul con sustituciones en las posiciones 28 y 101, siendo los aminoácidos en estas posiciones lisinas (K).

Las variantes de polipéptido hipoalergénico de la presente divulgación comprenden también variantes, que contienen más de una primera y segunda sustitución. Las expresiones “al menos una primera sustitución” y “al menos una segunda sustitución” significa que dicha primera y segunda sustituciones pueden comprender cada una, una, dos, tres o cuatro o más sustituciones, y cualquiera combinación de primeas y segundas sustituciones son posibles, a condición de que se mantenga la capacidad del polipéptido Bet v 1 hipoalergénico para inducir una respuesta protectora de anticuerpos. Por lo tanto, en un aspecto preferido de la divulgación la primera sustitución de aminoácidos comprende la sustitución en la posición E101, y dichas segundas sustituciones de aminoácidos están en las posiciones N28 y D25, o en las posiciones N28, D25 e Y158. En otro aspecto preferido de la divulgación la primera sustitución de aminoácidos comprende las sustituciones en las posiciones E101 y S99 y dicha segunda sustitución de aminoácidos es en la posición N28. En otro aspecto preferido de la divulgación dichas primeras sustituciones de aminoácidos están en las posiciones E101 y S99, y dichas segundas sustituciones de aminoácidos están en las posiciones N28 y D25.

En un aspecto preferido adicional de la divulgación, las sustituciones de Bet v 1 son al menos E101 y N28, E101 y D25, E101 y N43, E101 y G46, E101 y N47, E101 e Y158, K80 y N28, K80 y D25, K80 y N43, K80 y G46, K80 y N47, K80 e Y158, N82 y N28, N82 y D25, N82 y N43, N82 y G46, N82 y N47, N82 e Y158, S84 y N28, S84 y D25, S84 y N43, S84 y G46, S84 y N47, S84 e Y158, S99 y N28, S99 y D25, S99 y N43, S99 y G46, S99 y N47, S99 e Y158, S117 y N28, S117 y D25, S117 y N43, S117 y G46, S117 y N47, S117 e Y158, K119 y N28, K119 y D25, K119 y N43, K119 y G46, K119 y N47 o K119 e Y158. En un aspecto preferido adicional de la divulgación, las sustituciones son una de estas combinaciones.

En una realización preferida de la invención, hay al menos dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos juntas. Preferentemente, el polipéptido de la invención tiene dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nuevo o diez sustituciones. Más preferentemente, el polipéptido tiene dos, tres o cuatro sustituciones. Una de las ventajas de la invención es que solo es necesario un pequeño número de sustituciones (al menos dos) para los efectos deseados.

Los polipéptidos de acuerdo con la presente invención son hipoalergénicos, y presentan una capacidad de liberación de histamina que está reducida al menos 20x, preferentemente 100x, cuando se compara con la capacidad de liberación de histamina del correspondiente Bet v 1 de tipo silvestre no mutado.

Los polipéptidos hipoalergénicos de acuerdo con la presente invención son útiles como vacunas contra la alergia, especialmente alergia al polen de abedul. Las vacunas que comprenden polipéptidos de acuerdo con la presente invención se formulan de acuerdo con los procedimientos farmacéuticas convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Las vacunas de acuerdo con la presente invención son especialmente adecuadas para la administración sublingual.

Las variantes hipoalergénicas de acuerdo con la presente invención se obtienen mutando restos de aminoácidos específicos escogidos, por ejemplo, restos con grandes cadenas laterales, localizados en las superficies de epítopos del Bet v 1. Los restos de aminoácido seleccionados son aquellos cuyas cadenas laterales apuntan exteriormente hacia el disolvente. La mutación de dichos restos produce un cambio mínimo de la estructura tridimensional básica del alérgeno. Preferentemente, sin embargo, la mutagénesis modifica la superficie del epítopo hasta el punto de que se evita o reduce fuertemente la unión y entrecruzamiento de los anticuerpos IgE a la superficie de mastocitos, mientras que la estructura general de la variante sigue siendo muy similar a la del alérgeno de tipo silvestre. Dicha mutación favorece la inducción de IgG y otros anticuerpos protectores, que tienen la capacidad de unirse al alérgeno de tipo silvestre y a la variante mutada del alérgeno. El efecto de la mutación se determina como de afinidad menor del anticuerpo IgE específico del alérgeno hacia el alérgeno Bet v 1 de al menos diez veces, preferentemente de al menos 20 veces, y más preferentemente de 20 a 1000 veces, y más preferentemente más de 100 veces. El alérgeno Bet v 1 modificado resultante se puede utilizar para provocar una tolerancia contra el polen de abedul en pacientes alérgicos.

Los polipéptidos variantes hipoalergénicos de acuerdo con la presente invención, útiles en la desensibilización específica de alérgeno, posee dos características: 1) la capacidad para reducir fuertemente la reacción mediada por IgE; y 2) el mantenimiento del plegamiento 3 d del tipo silvestre, y por lo tanto la capacidad para inducir la producción de anticuerpos IgG capaces de unirse al alérgeno de tipo silvestre.

El conocimiento de la estructura del epítopo de unión a IgE simplificaría enormemente el diseño de variantes hipoalergénicas, como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, la estructura del Bet v 1 formando un complejo con el anticuerpo IgE lamentablemente no está disponible. No se sabe cuántas son las diferencias de los epítopos de un alérgeno determinado que reconoce una IgE individual de un paciente. El uso de péptidos en la exploración de epítopos tampoco es realizable y actualmente solo es útil cuando se exploran epítopos lineales (Niemi y col., Structure 2007(15): 1413-21). La conformación, así como las propiedades físicas, por ejemplo, la solubilidad de un único péptido puede ser marcadamente diferente de la parte correspondiente de una cadena de polipéptido que forme parte de una estructura proteica nativa. Por lo tanto, el diseño de alérgenos Bet v 1 mutantes se basó en el análisis de la superficie molecular utilizando programas de gráficos moleculares, tales como PyMOL,

para aclarar la estructura del epítopo y ensayar sus puntos potenciales preparando y ensayando los mutantes. Además, se tuvo en cuenta la capacidad de dimerización de Bet v 1 en el diseño.

La estructura cristalina de Bet v 1 (código 1BV1 del banco de datos proteicos) se utilizó para definir la estructura cuaternaria del Bet v 1. Se utilizó el servidor de internet PDBePISA para crear las coordenadas del dímero simétrico de Bet v 1. Se ha estimado que la distancia entre los anticuerpos de IgE en el agrupamiento de la superficie de los mastocitos era aproximadamente de 5 nm (Knol, EF; Mol.Nutr.Res. 50(2006):620). Estudiando la superficie molecular del Bet v 1 dimérico alrededor del eje de simetría doble con una distancia de 2,5 nm desde el eje de simetría, se identificaron dos supuestos epítopos en la superficie molecular del Bet v 1 (Fig. 1).

El supuesto epítopo está compuesto de los restos de aminoácidos V2-E6; R70-D75; N78-S84; E96-K103; y K115-H121, mientras que la interfaz monómero-monómero del Bet v 1 dimérico está compuesto por los restos de aminoácidos K20-K32; S39-P50; V74-H76; y D156-N159.

Estos supuestos epítopos se analizaron cuidadosamente, con el fin de identificar restos de aminoácidos, que podrían servir como puntos de mutación. Los puntos de mutaciones preferidos deberían tener la capacidad de disminuir la unión del alérgeno a anticuerpos IgE, pero manteniendo aún la estructura tridimensional del alérgeno de tipo silvestre. El supuesto epítopo incluye los restos de aminoácidos K80, N82, S84, S99, E101, S117, y K119. La interfaz monómero-monómero incluye los restos D25, N28, N43, G46, N47, e Y158. Los restos E101 y N28 se consideraron como los puntos de mutación más importantes, ya que se localizan en el centro del supuesto epítopo y en una posición estratégica en la interfaz monómero-monómero, respectivamente. En la presente invención, la primera sustitución de aminoácidos es en el área del epítopo y la segunda sustitución de aminoácidos está en la interfaz monómero-monómero.

Estos dos restos están altamente conservados en las 36 isoformas de Bet v 1. Existe una variación no natural en el resto 101. Las variaciones naturales se encuentran en el resto 28, que existe como asparagina (en 31 isoformas) o tirosina (en 3 formas). Los restos D25, N43, G46, N47, K80, S84, K119, e Y158 están conservados, mientras que los restos N82, S99, y S117 varían ligeramente, como se muestra en la Fig. 3.

La próxima etapa era seleccionar una mutación apropiada para cada resto. Como ejemplo, S99 es un resto de aminoácido poco hidrófilo y neutro. La mutación que interferiría la unión con IgE sería por tanto de naturaleza “opuesta”, es decir, grande y/o cargado, por ejemplo, Ser por Lys, Arg, Asp, Tyr, y Val. De manera similar E101 y N28 pueden sustituirse por un resto con la carga opuesta (Lys, Arg) o con un resto hidrófobo (Tyr, Ile, o Trp). Las sustituciones en los restos D25, N43, G46, N47, K80, N82, S84, S117, y K119 podría diseñarse en correspondencia. La Tabla 1 enumera las sustituciones potenciales, que darían como resultado, mutantes de Bet v 1 hipoalergénicos de acuerdo con la presente divulgación expuestos en la SEQ ID NO: 39.

Tabla 1. Mutantes de Bet v 1 ts

	EPÍTOPOS MUTANTES				
Bet v 1 ts	mutante 1	mutante 2	mutante 3	mutante 4	mutante 5
S99 hidrófila pequeña	K cargada grande	R cargada grande	D cargada	Y hidrófoba grande	V hidrófoba grande
E101 cargada	K cargada muy opuestamente	R cargada muy opuestamente	Y hidrófoba grande	I hidrófoba grande	W hidrófoba grande
K80 cargada	Y hidrófoba grande	E cargada opuestamente	W hidrófoba grande	I hidrófoba grande	L hidrófoba grande
S84 hidrófila pequeña	K cargada grande	R cargada grande	D cargada	E cargada	Y hidrófoba grande
N82 hidrófila	K cargada grande	R cargada grande	Y hidrófoba grande	E cargada	L hidrófoba
S117 hidrófila pequeña	K cargada grande	R cargada grande	D cargada	Y hidrófoba grande	L hidrófoba grande
K119 cargada	E cargada opuestamente	Y hidrófoba	L hidrófoba	W hidrófoba	I hidrófoba

(continuación)

	Segmentos: V2-E6; R70-D75; N78-S84; E96-K103; K115-H121 **MUTANTES MONOMÉRICOS**				
Bet v 1 ts	mutante 1	mutante 2	mutante 3	mutante 4	mutante 5
D25 cargada	K cargada muy opuestamente	R cargada muy opuestamente	Y hidrófoba grande	H cargada grande	L hidrófoba grande
N28 hidrófila	K cargada grande	R cargada grande	Y hidrófoba grande	I hidrófoba grande	W hidrófoba grande
N43 hidrófila	Y hidrófoba grande	H cargada grande	I hidrófoba grande	L hidrófoba grande	E cargada
G46 si cadena lateral	P cadena principal	V hidrófoba	D cargada	T hidrófila	L hidrófoba
N47 hidrófila	E cargada grande	L hidrófoba	I hidrófoba	Y hidrófoba grande	P cadena principal
Y158 hidrófoba grande	D cargada	E cargada	L hidrófoba	P cadena principal	I hidrófoba

Los Bet v 1 modificados hipoalergénicos de acuerdo con la presente invención son útiles como vacunas. La vacunación de alergia convencional se lleva a cabo típicamente como múltiples inmunizaciones subcutáneas durante un largo periodo de tiempo, por ejemplo, uno o dos años. Con el fin de minimizar el riesgo de reacciones anafilácticas, el esquema de inmunización se aplica en dos fases, una fase inicial de dosificación creciente y una fase de mantenimiento. La fase de dosificación creciente comienza con dosis mínimas, que se aumentan después lentamente, normalmente durante un periodo de 16 semanas hasta alcanzar la dosis de mantenimiento. La fase de mantenimiento normalmente comprende inyecciones cada seis semanas. Dicho régimen de vacunación es tedioso para el paciente, necesita el compromiso a largo plazo. Además, esto impone un alto impacto en la estabilidad de la vacuna, en términos de seguridad y reproductibilidad. Los pacientes tienen que controlarse estrictamente, a menudo hospitalizarse, después de cada inmunización.

Como la capacidad de liberación de histamina de los hipoalergénicos de acuerdo con la presente invención está sustancialmente reducida, la fase de dosificación creciente se podría acortar significativamente con respecto a la vacunación contra la alergia convencional, o mejor aún, podría no ser necesario un esquema de dosificación creciente. Los hipoalergénicos recombinantes modificados de acuerdo con la presente invención no presentan ninguna variación entre los lotes. Por lo tanto, el control estrecho de la respuesta a la dosis y las posibles reacciones secundarias no es necesario.

Por lo tanto, la presente invención se refiere adicionalmente al uso de un polipéptido Bet v 1 hipoalergénico descrito anteriormente al detalle como una vacuna y a una composición vacunal que comprende al menos un polipéptido Bet v 1 recombinante de la invención y al menos un diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, tampón, hidróxido de aluminio, y similares. La presente divulgación se refiere adicionalmente a un procedimiento de vacunación contra la alergia al polen de abedul, comprendiendo dicho procedimiento la administración a un sujeto que sufre alergia al polen de abedul de un polipéptido hipoalergénico o una composición vacunal como se ha definido anteriormente en una cantidad y utilizando un programa de vacunación eficaz para la inducción de la producción de anticuerpos protectores contra el polen de abedul.

Un “sujeto” de vacunación es un ser humano (adulto, niño o adolescente) o un animal. Preferentemente, el animal es cualquier animal doméstico tal como un perro, gato, caballo, vaca, oveja o cerdo.

Por ejemplo, un hipoalergénico de acuerdo con la presente invención se formula como las formulaciones vacunales convencionales, tales como las vacunas adsorbidas en hidróxido de aluminio, utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica (Niederberger y col., PNAS, 101(2):14677-82, 2004). De manera alternativa y preferentemente, sin embargo, los hipoalergénicos de acuerdo con la presente invención se pueden administrar por otras vías y esquemas de vacunación adecuados, tales como la administración oromucosa o sublingual, utilizando procedimientos y formulaciones conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación de Patente europea EP 1812059.

Los Bet v 1 modificados hipoalergénicos se podrían utilizar en concentraciones, por ejemplo, de, 0,5 µg/ml, 5 µg/ml o 50 µg/ml. Las dosis ejemplares pueden variar entre 0,05 µg y 2 µg durante una posible fase ascendente, y entre 3-

15 µg durante la fase de mantenimiento, preferentemente 5-15 µg, más preferentemente aproximadamente 10 µg, dependiendo de la gravedad de la alergia, la edad, y la historia médica del paciente. Una dosis adecuada la decide fácilmente el médico de familia con el tratamiento y la prevención de la alergia.

La publicación de patente internacional WO 04/047794 desvela una forma de dosificación sólida de dispersión rápida para la administración sublingual de una vacuna contra la alergia, y la solicitud de patente de EE. UU. 2009/0297564 desvela una formulación de vacuna líquida para la administración oromucosa.

Los Bet v 1 modificados hipoalergénicos de acuerdo con la presente invención son particularmente adecuados para la administración sublingual utilizando gotas sublinguales. Para este fin, los polipéptidos hipoalergénicos se proporcionan en solución salina. Un intervalo de dosificación eficaz y seguro para la administración de los polipéptidos, así como el régimen de dosificación capaz de dar lugar una respuesta inmunitaria que se desea se determina durante el desarrollo clínico de los candidatos vacunales de acuerdo con la presente invención, utilizando procedimientos y esquemas conocidos en la técnica.

Se determina una dosis única máxima tolerada de un hipoalergénico de acuerdo con la presente invención en un estudio en sujetos alérgicos masculinos y femeninos, que están expuestos a dosis sublinguales crecientes. Cuando se alcanza la máxima dosis tolerada de la dosis predefinida, el estudio se adapta a un estudio de variación de dosis con dosificación diaria, en el que los niveles se diferencian en un factor de 2 a 4. La dosis inicial está en un intervalo de 10-100 µg, y el estudio proporciona la dosis sublingual máxima tolerada, que puede ser hasta de 20 mg.

Después se estudian el escalado de la dosis y la variación de dosis en un amplio intervalo de dosis administrados diaria o semanalmente. la seguridad del intervalo de dosis de vacunación se ensayó preliminarmente con un Ensayo de punción cutánea antes de la administración de las dosis múltiples. Estos estudios proporcionan primariamente parámetros inmunológicos, y secundariamente, la eficacia eventual después del desafío con polen de abedul.

Las vacunas con polipéptidos hipoalergénicos de acuerdo con la presente invención deberían dar lugar a una respuesta de linfocitos T detectable como un cambio del tipo TH2 a TH1. La producción de anticuerpos IgG debería ser demostrable antes de meter el ensayo de desafío alergénico.

Finalmente, se llevó a cabo un estudio en pacientes alérgicos, como estudio de desensibilización controlado por placebo, aleatorio, con doble ocultación en sujetos masculinos y femeninos alérgicos expuestos a varias dosis sublinguales durante 3-6 meses, con un seguimiento de hasta 12 meses inicialmente. Los sujetos se desafiarán con el alérgeno antes de comenzar el estudio, así como cada seis meses en delante de manera con ocultación doble.

El estudio demostrará una diferencia estadística y clínicamente significativa entre los grupos que reciben el placebo y una vacuna hipoalergénica de acuerdo con la presente invención, cuando se desafían con el alérgeno nativo.

Ejemplos

Se dan los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. Diseño de las mutaciones en Bet v 1

El objetivo del diseño del hipoalergénico es conseguir un alérgeno mutante cuya capacidad para unirse y entrecruzarse con los anticuerpos IgE en la superficie de los mastocitos está reducida fuertemente pero que aún mantiene una estructura similar al alérgeno de tipo silvestre. Esto debería favorecer la inducción de IgG y otros anticuerpos que tendrían la capacidad para unirse al alérgeno de tipo silvestre y el alérgeno mutante.

El conocimiento del epítopo de IgE simplificaría enormemente el diseño. Sin embargo, no está disponible la estructura del Bet v 1 formando un complejo con el anticuerpo IgE. El uso de los péptidos en la exploración de epítopos tampoco se puede realizar (Niemi y col., Structure (15): 1413-21, 2007). El único procedimiento para sugerir un epítopo es estudiar la superficie molecular del alérgeno Bet v 1 y ensayar el posible acierto preparando mutantes. En primer lugar, los inventores identificaron un supuesto epítopo (Fig. 1) en la superficie molecular del Bet v 1 . En segundo lugar, los inventores seleccionaron dichos restos de este supuesto epítopo que como mutado mantendría una estructura tridimensional similar al alérgeno del tipo silvestre y siga teniendo la capacidad para disminuir la unión a los anticuerpos IgE. El supuesto epítopo incluye los restos de aminoácidos K80, N82, S84, S99, E101, S117, y K119.

La tercera etapa es seleccionar la mutación de cada resto. Como ejemplo, S99 es un resto poco hidrófilo y neutro, serina. La mutación que interferiría la unión con IgE sería por tanto “opuesta”, es decir, grande y/o cargado, por ejemplo, S99K (serina por lisina), S99R (serina por arginina), S99D (serina por ácido aspártico), S99Y (serina por tirosina), y S99V (serina por valina). En el caso de E101, las mutaciones que interfieren la unión con IgE se podría incluir la utilización de restos con una carga opuesta (Lys, Arg) o la utilización de restos hidrófobos (Tyr, Ile, Trp).

Finalmente, para introducir la característica de prohibición de la dimerización en las variantes polipeptídicas del monómero, se utilizó un diseño de mutación, basándose en la estructura cristalina de Bet v 1 (código PDB 1BV1). El modelo del Bet v 1 dimérico se creó con el servidor PISA. La interfaz monómero-monómero se estudió utilizando un

programa de gráficos moleculares. Los mutantes se diseñaron en esta interfaz utilizando el mismo principio utilizado en los mutantes de epítopo. Como ejemplo, N28 en la interfaz monómero-monómero es un resto hidrófilo de tamaño medio. La mutación, que interfiere la formación del dímero, sería de esta manera un resto muy grande cargado (lisina, arginina) o hidrófobo (tirosina, isoleucina, triptófano).

Ejemplo 2. Clonación de moléculas de Bet v 1 recombinante

Para producir el tipo silvestre (ts) y el mutante de las moléculas de Bet v 1 recombinante (rBet v 1) se clonaron los ADNc que codifican estas proteínas particulares en un plásmido de expresión bacteriana (Fig. 2). Primero, los ADNc de rBet v 1 diseñados en el Ejemplo 1, con el codón de optimización para la producción en *Escherichia coli* en el vector pUC57 (ts y N28K-E101K) se pidieron a GenScript Corporation (USA). Los ADNc contenían un sitio de restricción *Nco*I en el extremo 5' y *Hind*III en el extremo 3'. Los ADNc se clonaron como fragmentos *Nco*I-*Hind*III en el vector de expresión bacteriana pKKtac que codifica la secuencia de señal (peIB) de pectato liasa de *Erwinia carotovora* (Takkinen y col., Protein Eng. (4): 837-841, 1991) y se transformaron los plásmidos de expresión en la cepa *E. coli* XL-1 Blue. Las secuencias de ADN del rBet v 1 y el mutante N28K-E101K se verificaron por secuenciación de ADN (analizador genético ABI 3100, Applied Biosystems), y se representan en el presente documento como SEQ ID NO: 1-2.

Ejemplo 3. Producción de moléculas de Bet v 1 recombinante

El vector de expresión del rBet v 1 tipo silvestre se transformó en la cepa BL21 de E. coli y el vector de expresión del Bet v 1 N28K-E101K mutante en la cepa RV308 de *E. coli* para la expresión bacteriana. Las colonias únicas de rBet v 1 ts y Bet v 1 N28K-E101K mutante se inocularon en 5 ml de SB o TB, 100 µg/ml de ampicilina y un 1 % de glucosa, respectivamente, y se cultivaron durante 16 h a +37 ºC con agitado a 220 rpm. Los cultivos se diluyeron a 1:50 en 3 x 300 ml de SB o TB con 100 µg/ml de ampicilina y se cultivó a +37 ºC hasta alcanzar una DO600 de 4. La expresión proteica se indujo con la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM, y se cultivaron las células durante 16 h a TA con agitado a 170 rpm. Las células se recolectaron por centrifugación durante 15 min a 5000 g a +4 ºC, y la fracción periplásmica de las células se aislaron por un procedimiento de choque osmótico descrito por Boer y col. (Protein Expression & Purification, 2007(51): 216-226). El aglomerado celular equivalente de 900 ml del cultivo se re-suspendió en 300 ml, 30 mM de Tris/HCl, un 20 % de sacarosa, pH 8,0, y 1 mM de EDTA, y se incubó durante 20 minutos con agitado sobre hielo. La suspensión se centrifugó durante 20 min a 8000 g a 4 ºC. Después de esto, el aglomerado se re-suspendió en 75 ml de 5 mM de $MgSO_4$ enfriado en hielo y agitado durante 20 min a 4 ºC sobre hielo, y se recolectó el líquido del choque osmótico por centrifugación a 8000 g durante 20 min a 4 ºC.

Ejemplo 4. Purificación de moléculas del Bet v 1

Las fracciones periplásmicas del rBet v 1 de tipo silvestre y el mutante N28K-E101K se suplementaron con 1 M de NaCl y se llevó a cabo la primera etapa de purificación cromatográfica para ambas proteínas expresadas mediante una columna de fenil-Sepharose (GE Healthcare) con 10 mM de NaH_2PO_4, 1 M NaCl, tampón a pH 5,0 utilizando un caudal de 2 ml/min. La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 20 mM de Tris-HCl, pH 9,3, con un 7,5 % de isopropanol. Las fracciones que contenían el Bet v 1 de tipo silvestre o el mutante N28K-E101K se agruparon y concentraron. El Bet v 1 de tipo silvestre se purificó adicionalmente mediante una columna de cromatografía de exclusión por tamaño Bio-Gel P60 con un largo de lecho de 460 mm y 1 x tampón PBS con un caudal de 0,3 ml/min. En el caso del mutante rBet v 1 N28K-E101K se necesitó una etapa adicional de cromatografía en resina de amilosa para deshacerse de la contaminación por proteína de unión a maltosa de *E. coli* antes de la cromatografía por exclusión de tamaño.

La concentración proteica de las fracciones de rBet v 1 agrupado se determinó a 280 nm.

Ejemplo 5. Análisis de rBet v 1 y el mutante N28K-E101K por espectrometría de masas

Se llevaron a cabo los experimentos espectrométricos de masas con el espectrómetro de masas 4.7 T BrukerBioAPEX-II ESI FT-ICR (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, USA) equipado con una fuente ESI convencional (Apollo-IITM). El espectro de masas nativo: las muestras de alérgeno desaladas de 3 µM en 10 mM de tampón de acetato amónico (pH 6,9) se infundieron directamente con un caudal de 1,5 ml/min con nitrógeno seco que sirva como secante (200 ºC, 6 mbar) y nebulización del gas. Todos los parámetros del instrumento se optimizaron para mantener las interacciones no covalentes en la fase gaseosa y para maximizar la transmisión iónica a un m/z de 2000-3000. Se emplearon los mismos ajustes de parámetros del instrumento siempre para evitar cualquier tendencia entre diferentes muestras. Normalmente, se registraban y procesaban 500-1000 dominios transitorios con 128-kword co-añadidos por datos de 512 kword antes de la transformación rápida de Fourier y al cálculo de la magnitud. La calibración de masas se hizo externamente con respecto a los iones de un ES Tuning Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). El espectro desnaturalizado se midió normalmente en una solución de acetonitrilo/agua/ácido acético. Todos los datos se adquirieron y se procesaron con el software Bruker XMASS 7.0.8. El espectro de masas ESI FT-ICR nativo muestra que el Bet v 1 recombinante mutante N28K-E101K se pliega de manera similar al Bet v 1 recombinante de tipo silvestre (Figura 7).

Ejemplo 6. Inhibición de la unión del suero IgE a los polipéptidos Bet v 1 recombinante y Bet v 1 N28K-E101K analizada por un ELISA de competición

La unión de una muestra de suero IgE de una persona alérgica al polen de abedul (E3) al rBet v 1 biotinilado inmovilizado en pocillos con estreptavidina se inhibía aumentando las cantidades de los mutantes rBet v 1 y rBet v 1 N28K-E101K. Primero se biotiniló un rBet v 1 disponible en el comercio (de tipo silvestre, Biomay) utilizando Sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El rBet v 1 biotinilado (0,5 µg/pocillo) se inmovilizó en pocillos con estreptavidina (SA) (Roche Diagnostics Gmbh) seguido por una etapa de lavado y la adición del suero de E3 (dilución 1:6). Después de 2 horas de incubación a TA en un agitador y una etapa de lavado, se añadieron diferentes cantidades (4, 1, 0,25, 0,0625, 0,0156, y 0,0039 µg) de rBet v 1 y se incubó durante 2 h a TA en un agitador. Después de una etapa de lavado, la detección de las moléculas de IgE unidas se llevó a cabo utilizando una dilución de 1:1000 de un anticuerpo anti-IgE humana conjugado con AFOS (Southern Biotech Associates Inc.) incubando durante 1 h a TA en un agitador. Finalmente, se añadió la solución de sustrato, p-nitrofenilfosfato (Sigma) y se midieron los valores de absorbancia a 405 nm (Varioscan, Thermo Electron Corporation).

El resultado de la unión del suero con IgE a los polipéptidos rBet v 1 analizados por ELISA de competición se muestran en la Fig. 5. Los polipéptidos rBet v 1, ts y N28-E101K mutante, se utilizaron para la competición por la unión del suero de una persona alérgica al Bet v 1 (E3) al rBet v 1 inmovilizado (Biomay). Tanto las moléculas de rBet v 1 de tipo silvestre (uno comercial de Biomay y un producto propio) inhibían la unión de la IgE al Bet v 1 inmovilizado. El Bet v 1 N28K-E101K mutante presentaba una inhibición reducida en comparación con los rBet v 1 de control, indicando que las mutaciones E101K y N28K afecta al epítopo de IgE y la dimerización de Bet v 1.

Ejemplo 7. Ensayo de liberación de histamina

La actividad biológica de los polipéptidos Bet v 1 recombinantes purificados se analizaron por el procedimiento de sensibilización pasiva de basófilos naturales y un desafío posterior con las moléculas de alérgeno. El ensayo de liberación de histamina se llevó a cabo como un servicio externo en RefLab ApS, Copenhague, Dinamarca, que tienen un procedimiento de ensayo de liberación de histamina acreditado. La inducción de la liberación de histamina *in vitro* de leucocitos basófilos por un Bet v 1 recombinante comercial (Biomay, Austria) y se midieron las dos proteínas Bet v 1 recombinantes, de ts y N28K-E101K. Se ensayó cada uno de los tres alérgenos en el ensayo de transferencia pasiva como un estudio de dosis respuesta con un intervalo de concentración de: 20-0,06 ng por duplicado con el suero de una persona alérgica (E3) a Bet v 1.

El resultado del ensayo de liberación de histamina se muestra en la Fig. 6. El Bet v 1 N28K-E101K era 100 veces menos biológicamente activo en comparación con la referencia, el Bet v 1 recombinante comercial (Biomay) y rBet v 1 de tipo silvestre.

Será obvio para un experto en la técnica que, como los avances tecnológicos, el concepto inventivo puede llevarse a cabo de distintas formas. La invención y sus realizaciones no se limitan a los ejemplos descritos anteriormente, sino que pueden variar dentro del ámbito de las reivindicaciones.

Ejemplo 8. Ensayo de punción cutánea

Los ensayos de punción cutánea (SPT) con tres voluntarios con dos diagnosticados de alergia al polen de abedul y una persona no atópica se llevaron a cabo con polipéptidos Bet v 1 recombinantes y los controles relevantes después de la aprobación del comité de ética del Hospital Central de la Universidad de Helsinki. Las endotoxinas de las preparaciones polipeptídicas de Bet v 1 recombinante se retiraron con el Gel de Eliminación de Endotoxinas Detoxi-Gel (Thermo: N.º de cat. L00350C). Las preparaciones polipeptídicas de Bet v 1 se esterilizaron por filtrado mediante un Costar SPIN-X (N.º de cat. 8160) y se almacenaron en alícuotas a -20 ºC.

Se llevó a cabo el SPT utilizando el Bet v 1a recombinante de ts (Biomay) y el mutante N28K-E101K a las concentraciones de 50 y 5 µg/ml y un extracto de polen comercial (AlkAbello). El cloruro sódico (al 0,9 %) y dihidrocloruro de histamina (AlkAbello) servían como controles negativo y positivo, respectivamente. Antes de la punción de la piel, se colocaban las lancetas en los tubos que contenían los reactivos de la punción cutánea. Las respuestas se medían después de 15 minutos y después de 6 y 20 horas. El diámetro de la respuesta cutánea al dihidrocloruro de histamina de cada uno de los individuos ensayados era de 5 mm después de 15 min y este valor se seleccionó como una respuesta positiva (+) (Tabla 2) Las reacciones cutáneas inducidas por el mutante N28K-E101K de Bet v 1 con la concentración de 50 µg/ml era leve en comparación con las reacciones inducidas por el Bet v 1 de ts a la misma concentración. Las reacciones inducidas por los Bet v 1 de ts y el mutante N28K-E101K con las concentraciones de 5 µg/ml eran comparables. Notablemente, en el caso de ambos pacientes alérgicos, las reacciones cutáneas inducidas por el mutante N28K-E101K de Bet v 1 desaparecían en un tiempo sorprendentemente corto en comparación con el Bet v 1 de ts.

Tabla 2. Resultados del ensayo de punción cutánea

Paciente 1	15 min	6 h	20 h
Dihidrocloruro de histamina (10 mg/ml)	+	+	-
Extracto de polen de abedul 10HEP (AlkAbello)	+	+	-
rBet v 1 ts (50 µg/ml)	++	++	+
rBet v 1 ts (5 µg/ml)	+	+	-
rBet v 1 N28K+E101K (50 µg/ml)	++	-	-
rBet v 1 N28K+E101K (5 µg/ml)	+	-	-
Paciente 2			
Dihidrocloruro de histamina (10 mg/ml)	+	+	-
Extracto de polen de abedul 10HEP(AlkAbello)	+	+	-
rBet v 1 ts (50 µg/ml)	+++	+++	++
rBet v 1 ts (5 µg/ml)	+	+	+
rBet v 1 N28K+E101K (50 µg/ml)	+	-	-
rBet v 1 N28K+E101K (5 µg/ml)	+	-	-
Persona no atópica			
Dihidrocloruro de histamina (10 mg/ml)	+	-	-
Extracto de polen de abedul 10HEP (AlkAbello)	-	-	-
rBet v 1 ts (50 µg/ml)	-	-	-
rBet v 1 ts (5 µg/ml)	-	-	-
rBet v 1 N28K+E101K (50 µg/ml)	-	-	-
rBet v 1 N28K+E101K (5 µg/ml)	-	-	-
+ diámetro de la respuesta cutánea≥ 5 mm ++ diámetro de la respuesta cutánea≥ 8 mm +++ diámetro de la respuesta cutánea≥ 11 mm			

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Teknologian tutkimuskeskus VTT

<120> Nuevo hipoalergénico

<130> 2101747PC

<150> FI20115374
<151> 18-04-2011

<150> USP61/476488
<151> 18-04-2011

<160> 47

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 480

<212> ADN
<213> *Betula verrucosa*

<400> 1

ggcgtgttta actatgaaac cgaaaccacc agcgtgattc cggcggcgcg tctgtttaaa 60

gcgtttattc tggatggcga taacctgttt ccgaaagtgg cgccgcaggc gattagcagc 120

gtggaaaaca ttgaaggcaa cggcggcccg ggcaccatta agaaaatcag cttcccggaa 180

ggctttccgt tcaaatacgt gaaagatcgt gtggatgaag tggatcatac caacttcaaa 240

tacaactaca gcgtgattga aggcggcccg attggcgata ccctggaaaa aattagcaac 300

gaaattaaaa ttgtggcgac cccggatggc ggcagcattc tgaaaattag caacaaatat 360

cataccaaag gcgatcatga agtgaaagcg gaacaggtga aagcgagcaa agaaatgggc 420

gaaaccctgc tgcgtgcggt ggaaagctat ctgctggcgc atagcgatgc gtataactaa 480

<210> 2
<211> 480
<212> ADN
<213> *Betula verrucosa*

<400> 2

ggcgtgttta actatgaaac cgaaaccacc agcgtgattc cggcggcgcg tctgtttaaa 60

gcgtttattc tggatggcga taaactgttt ccgaaagtgg cgccgcaggc gattagcagc 120

gtggaaaaca ttgaaggcaa cggcggcccg ggcaccatta agaaaatcag cttcccggaa 180

ggctttccgt tcaaatacgt gaaagatcgt gtggatgaag tggatcatac caacttcaaa 240

tacaactaca gcgtgattga aggcggcccg attggcgata ccctggaaaa aattagcaac 300

aaaattaaaa ttgtggcgac cccggatggc ggcagcattc tgaaaattag caacaaatat 360

cataccaaag gcgatcatga agtgaaagcg gaacaggtga aagcgagcaa agaaatgggc 420

gaaaccctgc tgcgtgcggt ggaaagctat ctgctggcgc atagcgatgc gtataactaa 480

<210> 3
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<220>
<221> epítopo
<222> (2)..(6)

<220>
<221> epítopo
<222> (70)..(75)

<220>
<221> epítopo
<222> (78)..(84)

<220>
<221> epítopo
<222> (96)..(103)

<220>
<221> epítopo
<222> (115)..(121)

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Arg Glu Thr Leu Leu
130 135 140

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

<210> 11
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 13

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

Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys

20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 14

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

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

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

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

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

Tyr Ser Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Val Gly Asp Thr Leu Glu

85 90 95

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

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

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

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

<210> 15
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn

145 150 155

<210> 16
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 21

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

Arg Met Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Lys Leu Val Pro Lys
            20                  25                  30
```

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 26

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

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

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

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

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

Tyr Ser Tyr Ser Met Ile Glu Gly Gly Ala Leu Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

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

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

Lys Ala Glu His Met Lys Ala Ile Lys Glu Lys Gly Glu Ala Leu Leu
130 135 140

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

<210> 27
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 27

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

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

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

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

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

Tyr Ser Tyr Ser Met Ile Glu Gly Gly Ala Leu Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

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

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

Lys Ala Glu His Met Lys Ala Ile Lys Glu Lys Gly Glu Ala Leu Leu
130 135 140

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

<210> 28
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 28

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

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

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

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

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

Tyr Ser Tyr Ser Met Ile Glu Gly Gly Ala Leu Gly Asp Thr Leu Glu
                85                  90                  95

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

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp Gln Glu Met
        115                 120                 125

Lys Ala Glu His Met Lys Ala Ile Lys Glu Lys Gly Glu Ala Leu Leu
    130                 135                 140

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

<210> 29
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 29

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

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

Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly

35 40 45

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

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

Tyr Ser Tyr Ser Met Ile Glu Gly Gly Ala Leu Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

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

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

Lys Ala Glu His Met Lys Ala Ile Lys Glu Lys Gly Glu Ala Leu Leu
130 135 140

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

<210> 30
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 30

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

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

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

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

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

Tyr Ser Tyr Ser Met Ile Glu Gly Gly Ala Leu Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

Lys Ile Cys Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser

100 105 110

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

Lys Ala Glu His Met Lys Ala Ile Lys Glu Lys Gly Glu Ala Leu Leu
130 135 140

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

<210> 31
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 31

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

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

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

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

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

Tyr Ala Tyr Ser Met Ile Glu Gly Gly Ala Leu Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

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

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

Lys Ala Glu His Met Lys Ala Ile Lys Glu Lys Gly Glu Ala Leu Leu
130 135 140

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

<210> 32
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 32

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

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

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

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

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

Tyr Ser Tyr Ser Met Ile Glu Gly Gly Ala Leu Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

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

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

Lys Ala Glu His Met Lys Ala Ile Lys Glu Lys Gly Glu Ala Leu Leu
130 135 140

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

<210> 33
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 33

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

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

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

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

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

Tyr Ser Tyr Ser Met Ile Glu Gly Gly Ala Leu Gly Asp Thr Leu Glu
85 90 95

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

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

Lys Ala Glu His Met Lys Ala Ile Lys Glu Lys Ala Glu Ala Leu Leu
130 135 140

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

<210> 34
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asn His Glu Met
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Ile Lys Ala Ser Lys Glu Lys Ala Glu Ala Leu Phe
130 135 140

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

<210> 35
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asn His Glu Met
115 120 125

Lys Ala Glu Gln Ile Lys Ala Ser Lys Glu Lys Ala Glu Ala Leu Phe
130 135 140

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

<210> 36
<211> 159
<212> PRT

<213> *Betula verrucosa*

<400> 36

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

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

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

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

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

Tyr Ser Phe Ser Val Ile Glu Gly Gly Ala Val Gly Asp Ala Leu Glu
                85                  90                  95

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

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Phe His Thr Lys Gly Asp His Glu Ile
        115                 120                 125

Asn Ala Glu Gln Ile Lys Ile Glu Lys Glu Lys Ala Glu Gly Leu Leu
    130                 135                 140

Lys Ala Val Glu Ser Tyr His Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
145                 150                 155
```

<210> 37
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 37

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

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

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

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

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

Tyr Ser Phe Ser Val Ile Glu Gly Gly Ala Val Gly Asp Ala Leu Glu
85 90 95

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

Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Phe His Thr Lys Gly Asp His Glu Ile
115 120 125

Asn Ala Glu Gln Ile Lys Ile Glu Lys Glu Lys Ala Val Gly Leu Leu
130 135 140

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

<210> 38
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 38

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

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

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

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

Lys Tyr Met Lys His Arg Val Asp Glu Ile Asp His Ala Asn Phe Lys
65 70 75 80

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

Lys Ile Ser Tyr Glu Ile Lys Ile Val Ala Ala Pro Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Ile Leu Lys Ile Thr Ser Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp Ile Ser Leu
115 120 125

Asn Glu Glu Glu Ile Lys Ala Gly Lys Glu Lys Gly Ala Gly Leu Phe
130 135 140

Lys Ala Val Glu Asn Tyr Leu Val Ala His Pro Asn Ala Tyr Asn
145 150 155

<210> 39
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> X es D, K, R, Y, H, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> X es N, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> X es N, Y, H, I, L, o E

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (46).. (46)
<223> X es G, P, V, D, T, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> X es N, E, L, I, Y, o P

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (80)..(80)
<223> X es K, Y, E, W, I, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (82)..(82)
<223> X es N, K, R, Y, E, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (84)..(84)
<223> X es S, K, R, D, E, o Y

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (99)..(99)
<223> X es S, K, R, D, Y, o V

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (101)..(101)

<223> X es E, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (117)..(117)
<223> X es S, K, R, D, Y, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (119)..(119)
<223> X es K, E, Y, L, W, o I

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (158)..(158)
<223> X es Y, D, E, L, P, o I

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 40
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> X es D, K, R, Y, H, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> X es N, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> X es N, Y, H, I, L, o E

<220>
<221> MESC_FEATURE

<222> (46).. (46)
<223> X es G, P, V, D, T, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> X es N, E, L, I, Y, o P

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (80)..(80)
<223> X es K, Y, E, W, I, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (82)..(82)
<223> X es N, K, R, Y, E, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (84)..(84)
<223> X es S, K, R, D, E, o Y

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (99)..(99)
<223> X es S, K, R, D, Y, o V

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> X es K, R, Y, I o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (117)..(117)
<223> X es S, K, R, D, Y o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (119)..(119)
<223> X es K, E, Y, L, W, o I

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (158)..(158)
<223> X es Y, D, E, L, P, o I

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> X es D, K, R, Y, H, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> X es N, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> X es N, Y, H, I, L, o E

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (46).. (46)
<223> X es G, P, V, D, T, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> X es N, E, L, I, Y, o P

<220>
<221> MESC_FEATURE

<222> (80)..(80)
<223> X es Y, E, W, I, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (82)..(82)
<223> X es N, K, R, Y, E, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (84)..(84)
<223> X es S, K, R, D, E, o Y

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (99)..(99)
<223> X es S, K, R, D, Y, o V

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> X es E, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (117)..(117)
<223> X es S, K, R, D, Y, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (119)..(119)
<223> X es K, E, Y, L, W, o I

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (158)..(158)
<223> X es Y, D, E, L, P, o I

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 43
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> X es D, K, R, Y, H, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> X es N, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> X es N, Y, H, I, L, o E

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (46).. (46)
<223> X es G, P, V, D, T, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> X es N, E, L, I, Y, o P

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (80)..(80)
<223> X es K, Y, E, W, I, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (82)..(82)
<223> X es K, R, Y, E, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (84)..(84)
<223> X es S, K, R, D, E, o Y

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (99)..(99)
<223> X es S, K, R, D, Y, o V

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> X es E, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (117)..(117)
<223> X es S, K, R, D, Y, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (119)..(119)
<223> X es K, E, Y, L, W, o I

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (158)..(158)
<223> X es Y, D, E, L, P, o I

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 44
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> X es D, K, R, Y, H, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> X es N, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> X es N, Y, H, I, L, o E

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (46).. (46)

<223> X es G, P, V, D, T, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> X es N, E, L, I, Y, o P

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (80)..(80)
<223> X es K, Y, E, W, I, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (82)..(82)
<223> X es N, K, R, Y, E, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (84)..(84)
<223> X es K, R, D, E, o Y

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (99)..(99)
<223> X es S, K, R, D, Y, o V

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> X es E, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (117)..(117)
<223> X es S, K, R, D, Y, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (119)..(119)
<223> X es K, E, Y, L, W, o I

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (158)..(158)
<223> X es Y, D, E, L, P, o I

<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 45
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> X es D, K, R, Y, H, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> X es N, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> X es N, Y, H, I, L, o E

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (46).. (46)

<223> X es G, P, V, D, T, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> X es N, E, L, I, Y, o P

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (80)..(80)
<223> X es K, Y, E, W, I, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (82)..(82)
<223> X es N, K, R, Y, E, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (84)..(84)
<223> X es S, K, R, D, E, o Y

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (99)..(99)
<223> X es K, R, D, Y, o V

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> X es E, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (117)..(117)
<223> X es S, K, R, D, Y, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (119)..(119)
<223> X es K, E, Y, L, W, o I

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (158)..(158)
<223> X es Y, D, E, L, P, o I

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 46
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> X es D, K, R, Y, H, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> X es N, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> X es N, Y, H, I, L, o E

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (46)..(46)

<223> X es G, P, V, D, T, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> X es N, E, L, I, Y, o P

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (80)..(80)
<223> X es K, Y, E, W, I, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (82)..(82)
<223> X es N, K, R, Y, E, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (84)..(84)
<223> X es S, K, R, D, E, o Y

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (99)..(99)
<223> X es S, K, R, D, Y, o V

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> X es E, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (117)..(117)
<223> X es K, R, D, Y, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (119)..(119)
<223> X es K, E, Y, L, W, o I

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (158)..(158)
<223> X es Y, D, E, L, P, o I

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 47
<211> 159
<212> PRT
<213> *Betula verrucosa*

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> X es D, K, R, Y, H, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> X es N, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> X es N, Y, H, I, L, o E

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (46).. (46)
<223> X es G, P, V, D, T, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> X es N, E, L, I, Y, o P

<220>

<221> MESC_FEATURE
<222> (80)..(80)
<223> X es K, Y, E, W, I, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (82)..(82)
<223> X es N, K, R, Y, E, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (84)..(84)
<223> X es S, K, R, D, E, o Y

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (99)..(99)
<223> X es S, K, R, D, Y, o V

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> X es E, K, R, Y, I, o W

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (117)..(117)
<223> X es S, K, R, D, Y, o L

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (119)..(119)
<223> X es E, Y, L, W, o I

<220>
<221> MESC_FEATURE
<222> (158)..(158)
<223> X es Y, D, E, L, P, o I

<400> 47

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

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

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

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

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

Tyr Xaa Tyr Xaa Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu

85 90 95

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido Bet v 1 recombinante hipoalergénico del polen de abedul basado en una matriz de secuencia de aminoácidos de tipo silvestre como se representa en la SEQ ID NO: 3 o de cualquier otra isoforma de Bet v 1 de tipo silvestre del mismo seleccionado de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4-38, comprendiendo dicho polipéptido

(1) una primera sustitución de aminoácidos en una posición del resto de aminoácido E101, en el que la primera sustitución de aminoácidos es E101K, y
(2) una segunda sustitución de aminoácidos en una posición del resto de aminoácido N28, en el que la segunda sustitución de aminoácidos es N28K.

2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la matriz de una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre es como se representa en la SEQ ID NO: 3.

3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 39, en el que la sustitución de aminoácidos en la posición 28 es K y la sustitución de aminoácidos en la posición 101 es K.

4. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41, en el que la sustitución de aminoácidos en la posición E101 es K y la sustitución de aminoácidos en la posición N28 es K.

5. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 40.

6. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que tiene una capacidad de liberación de histamina que está reducida al menos 20x en comparación con la capacidad de liberación de histamina del Bet v 1 de tipo silvestre.

7. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene una capacidad de liberación de histamina que está reducida al menos 100 x en comparación con la capacidad de liberación de histamina del Bet v 1 de tipo silvestre.

8. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que existen juntas al menos dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos.

9. Una composición de vacuna que comprende al menos un polipéptido hipoalergénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

10. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la vacuna es para su administración sublingual.

11. Un polipéptido Bet v 1 recombinante del polen de abedul basado en la matriz de secuencia de aminoácidos de tipo silvestre como se representa en la SEQ ID NO: 3 o cualquier otra isoforma del Bet v 1 de tipo silvestre del mismo seleccionado de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4-38, comprendiendo dicho polipéptido sea naturalmente o por mutación

(1) una primera sustitución de aminoácidos en una posición del resto de aminoácido E101, en el que la primera sustitución de aminoácidos es E101K, y
(2) una segunda sustitución de aminoácidos en una posición del resto de aminoácido N28, en el que la segunda sustitución de aminoácidos es N28K,

para su uso en una vacuna.

Fig. 1

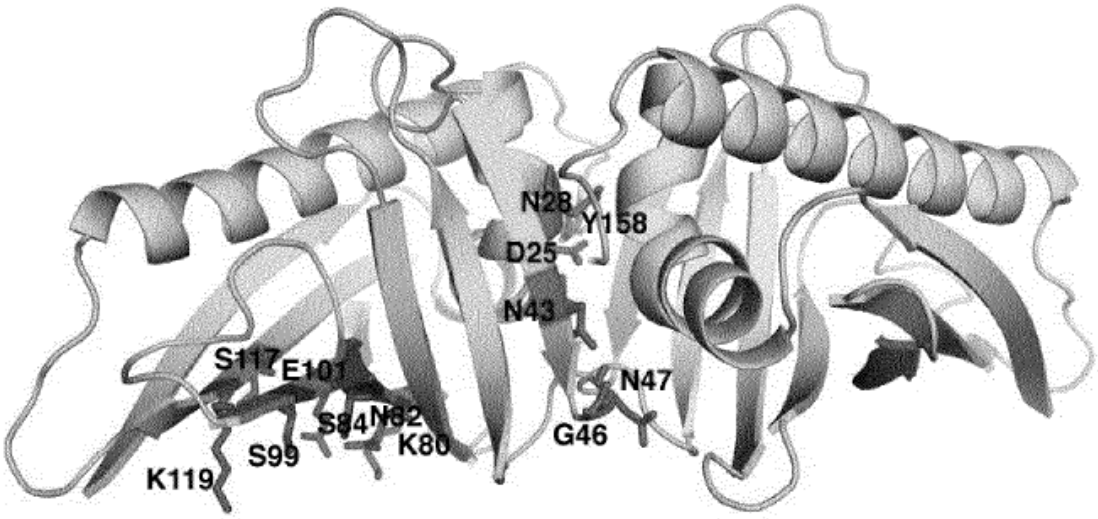


Fig. 2

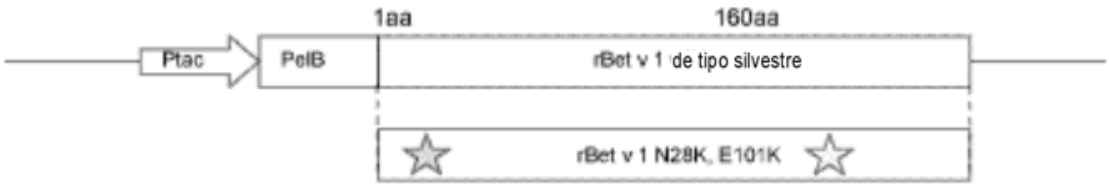

1aa
160aa
Ptac
PelB
rBet v 1 de tipo silvestre
rBet v 1 N28K, E101K

Fig. 3

```
           1        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110       120       130
           |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
    1.0101 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVKA
    1.0102 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVKA
    1.0103 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVKA
    1.2501 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVKA
    1.1501 GVFNYETERTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVKA
    1.1502 GVFNYETERTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVKA
    1.2801 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGLPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVKA
    1.3001 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVKA
    1.2901 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLVPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPMGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVKA
    1.2301 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFFLDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFRYYKDRVDEVDHTNFKYSYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEYKE
    1.0501 GVFNYETERTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGIPFKYYKGRVDEVDHTNFKYSYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPMGGSILKINNKYHTKGDHEVKA
    1.0601 GVFNYEIERTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYSYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPMGGSILKINNKYHTKGDHEVKA
    1.0602 GVFNYEIERTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYSYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPMGGSILKINNKYHTKGDHEVKA
    1.0801 GVFNYETERTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYSYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPMGGSILKINNKYHTKGDHEVKA
    1.1701 GVFNYETERTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGIPFKYYKDRVDEVDHANFKYSYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVKA
    1.0401 GVFNYEIETTSVIPARRLFKRFILDGDNLVPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKINFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPDGGCVLKISNKYHTKGNHEVKA
    1.0402 GVFNYEIETTSVIPARRLFKRFILDGDNLVPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKINFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPDGGCVLKISNKYHTKGNHEVKA
    1.0701 GVFNYESETTSVIPARRLFKRFILEGDNLIPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKINFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPDGGCVLKISNKYHTKGNHEVKA
    1.1001 GVFNYETERTSVIPARRMFKRFILDGDKLVPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKINFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPDGGCVLKISNKYHTKGNHEVKA
    1.2401 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPVGDTLEKISNEIKIVATPDGGCVLKISNKYHTKGNHEVKA
    1.2601 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGGCVLKISNKYHTKGNHEVKA
    1.2701 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPGGLPFKYYKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGGCVLKISNKYHTKGNHEVKA
    1.2201 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYYKDRVDEVAHKNFKYSYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGRSILKISNKYHTKGDHEVKA
    1.0201 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILEGDTLIPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKITFPEGSPFKYYKERVDEVDHANFKYSYSMIEGGALGDTLEKICNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEMKA
    1.0901 GVFNYESETTSVIPARRLFKRFILEGDTLIPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKITFPEGSPFKYYKERVDEVDHANFKYSYSMIEGGALGDTLEKICNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEMKA
    1.0301 GVFNYESETTSVIPARRLFKRFILEGDTLIPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKITFPEGSPFKYYKERVDEVDHANFKYSYSMIEGGALGDTLEKICNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDQEMKA
    1.1401 GVFNYESETTSVIPARRLFKRFILDGDNLIPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKITFPEGSPFKYYKERVDEVDHANFKYSYSMIEGGALGDTLEKICNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEMKA
    1.1402 GVFNYESETTSVIPARRLFKRFILDGDNLIPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKITFPEGSPFKYYKERVDEVDHANFKYSYSMIEGGALGDTLEKICNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEMKA
    1.1901 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLIPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKITFPEGSPFKYYKERVDEVDHANFKYAYSMIEGGALGDTLEKICNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEMKA
    1.2001 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLIPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKITFPEGSPFKYYKERVDEVDHANFKYSYSMIEGGALGDTLEKICNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEMKA
    1.1801 GVFNYETETTSVIPARRLFKRFILDGDNLIPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKITFPEGSPFKYYKERVDEVDHANFKYSYSMIEGGALGDTLEKICNEIKLVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEMKA
    1.1101 GVFDYEGETTSVIPARRLFKRFILDGDNLIPKVRPQIVSCVENIEGNGGPGTIKKITFPEGSPFKYYKERVDEVDHVNFKYSYSVIEGGAVGDTLEKICNEIKIVPRPGGGSILKISNKYHTKGNHEMKA
    1.1201 GVFDYEGETTSVIPARRLFKRFILDGDNLIPKVRPQRVSCVENIEGNGGPGTIKKITFPEGSPFKYYKERVDEVDRVNFKYSYSVIEGGAVGDTLEKICNEIKIVPRPGGGSILKISNKYHTKGNHEMKA
    1.1601 GVFNYETETPSVIPARRLFKRFILDGDKLLPKVRPEAVSSVENIEGNGGPGTIKKITFPEGSPFKYYKERVDEVDRVNFKYSFSVIEGGAVGDALEKVCNEIKIVARPDGGSILKISNKFHTKGDHEINA
    1.2101 GVFNYETERTSVIPARRLFKRSILDGDNLFPKVRPQRISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGSPFKYYKERVDEVDRVNFKYSFSVIEGGAVGDALEKVCNEIKIVARPDGGSILKISNKFHTKGDHEINA
    1.1301 GVFNYEDERTSVIRPARLFKSFVLDADNLIPKVRPENVSSRENIEGNGGPGTIKKITFPEGSHFKYMKHRVDEIDHANFKYCYSIIEGGPLGDTLEKISYEIKIVARPGGGSILKITSKYHTKGDISLNE
Consensus GVFNYEtEtTSVIpaRRLFKaF!LDgDnL.PKVRP#a!SSvENIEGNGGPGTIKKItFPEGspFKYvK.RVDE!Dh.NFKYs%SvIEGGpvGDtLEK!snEIKIVRtPdGGs!LKIsnK%HTKG#he.ka

           131     140       150       159
           |-------+---------+--------|
    1.0101 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.0102 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.0103 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.2501 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.1501 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.1502 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.2801 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.3001 EQVKASKEMRETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.2901 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.2301 EQIKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.0501 EQIKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.0601 EQIKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.0602 EQIKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.0801 EQIKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.1701 EQIKASKEMGETLLRAVERYLLAHSDAYN
    1.0401 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.0402 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.0701 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.1001 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.2401 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.2601 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.2701 EQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.2201 EQIKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYN
    1.0201 EHMKAIKEKGEALLRAVESYLLAHSDAYN
    1.0901 EHMKAIKEKGEALLRAVESYLLAHSDAYN
    1.0301 EHMKAIKEKGEALLRAVESYLLAHSDAYN
    1.1401 EHMKAIKEKGEALLRAVESYLLAHSDAYN
    1.1402 EHMKAIKEKGEALLRAVESYLLAHSDAYN
    1.1901 EHMKAIKEKGEALLRAVESYLLAHSDAYN
    1.2001 EHMKAIKEKGEALLRAVESYLLAHSDAYN
    1.1801 EHMKAIKEKAEALLRAVESYLLAHSDAYN
    1.1101 EQIKASKEKAEALFRAVESYLLAHSDAYN
    1.1201 EQIKASKEKAEALFRAVESYLLAHSDAYN
    1.1601 EQIKIEKEKAEGLLKAVESYHLAHSDAYN
    1.2101 EQIKIEKEKAVGLLKAVESYLLAHSDAYN
    1.1301 EEIKAGKEKGAGLFKAVENYLVAHPNAYN
Consensus EqiKasKEkge.LlrAVEsYLlAHs$AYN
```

Fig. 4

A (rBet v 1TS)

```
GGCGTGTTTAACTATGAAACCGAAACCACCAGCGTGATTCCGGCGGCGCGTC
TGTTTAAAGCGTTTATTCTGGATGGCGATAACCTGTTTCCGAAAGTGGCGCCGCAGGCGA
TTAGCAGCGTGGAAAACATTGAAGGCAACGGCGGCCCGGGCACCATTAAGAAAATCAGCT
TCCCGGAAGGCTTTCCGTTCAAATACGTGAAAGATCGTGTGGATGAAGTGGATCATACCA
ACTTCAAATACAACTACAGCGTGATTGAAGGCGGCCCGATTGGCGATACCCTGGAAAAAA
TTAGCAACGAAATTAAAATTGTGGCGACCCCGGATGGCGGCAGCATTCTGAAAATTAGCA
ACAAATATCATACCAAAGGCGATCATGAAGTGAAAGCGGAACAGGTGAAAGCGAGCAAAG
AAATGGGCGAAACCCTGCTGCGTGCGGTGGAAAGCTATCTGCTGGCGCATAGCGATGCGT
ATAACTAA
```

B (Bet v 1 N28K + E101K)

```
GGCGTGTTTAACTATGAAACCGAAACCACCAGCGTGATTCCGGCGGCGCGTC
TGTTTAAAGCGTTTATTCTGGATGGCGATAAACTGTTTCCGAAAGTGGCGCCGCAGGCGA
TTAGCAGCGTGGAAAACATTGAAGGCAACGGCGGCCCGGGCACCATTAAGAAAATCAGCT
TCCCGGAAGGCTTTCCGTTCAAATACGTGAAAGATCGTGTGGATGAAGTGGATCATACCA
ACTTCAAATACAACTACAGCGTGATTGAAGGCGGCCCGATTGGCGATACCCTGGAAAAAA
TTAGCAACAAAATTAAAATTGTGGCGACCCCGGATGGCGGCAGCATTCTGAAAATTAGCA
ACAAATATCATACCAAAGGCGATCATGAAGTGAAAGCGGAACAGGTGAAAGCGAGCAAAG
AAATGGGCGAAACCCTGCTGCGTGCGGTGGAAAGCTATCTGCTGGCGCATAGCGATGCGT
ATAACTAA
```

Fig. 5

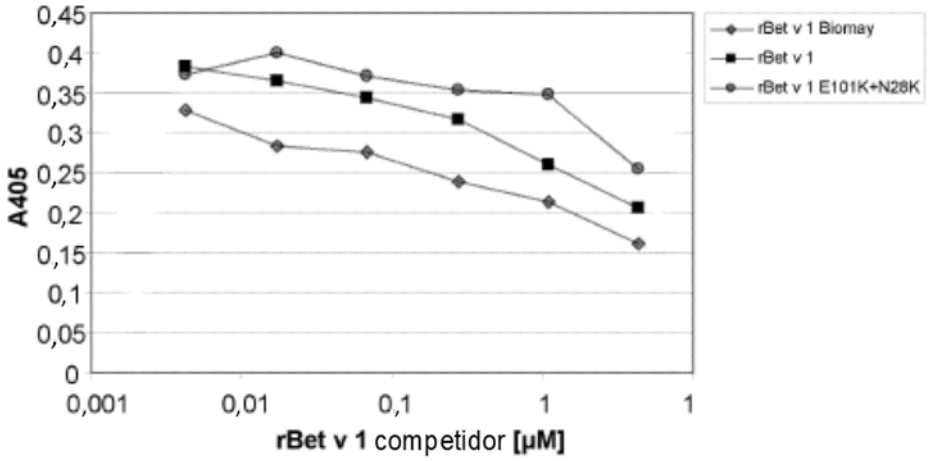

0,45
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
A405
0,001
0,01
0,1
1
1
rBet v 1 competidor [µM]
rBet v 1 Biomay
rBet v 1
rBet v 1 E101K+N28K

Fig. 6

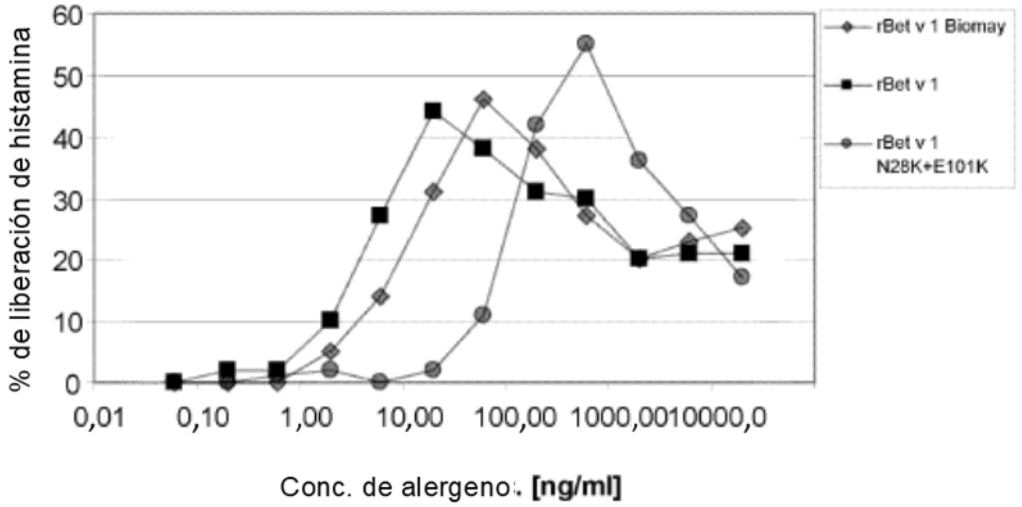
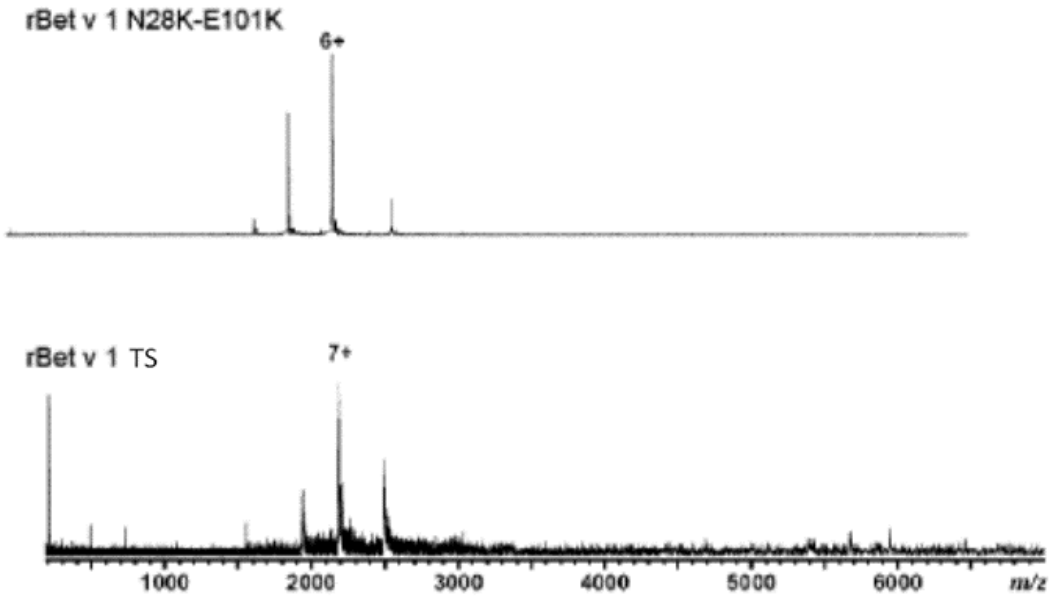

% de liberación de histamina
60
50
40
30
20
10
0
0,01
0,10
1,00
10,00
100,00
1000,00
10000,0
Conc. de alergeno. [ng/ml]
rBet v 1 Biomay
rBet v 1
rBet v 1
N28K+E101K

Fig. 7


rBet v 1 N28K-E101K
6+
rBet v 1 TS
7+
1000
2000
3000
4000
5000
6000
m/z