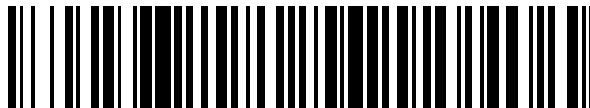


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 206**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/35** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12N 15/01** (2006.01)

**A61K 39/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2009 PCT/FI2009/050549**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2009 WO09153414**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2009 E 09765980 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2303323**

54 Título:  **$\beta$ -lactoglobulinas modificadas para inmunoterapia de alergia a la leche**

30 Prioridad:

**18.06.2008 FI 20085601**

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

**21.11.2019**

73 Titular/es:

**DESENTUM OY (100.0%)**

**Kivipylväänkuja 5**

**02940 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**ROUVINEN, JUHA;**

**TAKKINEN, KRISTIINA;**

**NIEMI, MERJA;**

**JYLHÄ, SIRPA;**

**SÖDERLUND, HANS y**

**LAUKKANEN, MARJA-LEENA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 732 206 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

$\beta$ -lactoglobulinas modificadas para inmunoterapia de alergia a la leche.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de las enfermedades alérgicas (hipersensibilidad) y, en particular, a la tecnología de ingeniería de proteínas para producir polipéptidos alergénicos modificados (hipoalérgenos) para su uso en inmunoterapias.

**Antecedentes de la invención**

10 Las enfermedades alérgicas, por ejemplo, asma, rinitis, eccema y alergias alimentarias están alcanzando proporciones epidémicas en el mundo. Estas reacciones de hipersensibilidad de tipo I se basan en la formación de anticuerpos de inmunoglobulina E (IgE) contra, en principio, antígenos inocuos, alérgenos.

15 Las moléculas de inmunoglobulina E son producidas por las células B. Cada célula B inmadura expresa una forma monomérica de IgM en su superficie, pero todos estos anticuerpos son idénticos en la secuencia de aminoácidos y, por lo tanto, en la especificidad de unión a antígeno. Al unirse a los anticuerpos de IgM, el antígeno multivalente extraño reticula los receptores de células B (Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ ) en la superficie de las células B inmaduras. Esto desencadena la proliferación de células B, la diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos, la formación de memoria y la presentación de antígenos a células T. Las células T proporcionan ayuda para que las células B maduren, lo que incluye tanto el cambio de isotipo como la activación de mutaciones somáticas para mejorar la afinidad y la selectividad de los anticuerpos secretados. Se ha observado que en la alergia las células T auxiliares se diferencian de las células Th2 que producen citocinas (IL-4 e IL-13) que causan el cambio del isotipo de anticuerpo de IgM a IgE (el tipo de cadena pesada de anticuerpo cambia de  $\mu$  a  $\epsilon$ ; el tipo de cadena ligera no se modifica) (Alam *et al.*, 2003; Chaplin 2003).

20 Entonces, la célula B madura es capaz de secretar anticuerpos IgE que pueden unirse tanto a antígenos (alérgenos) como también a receptores Fc $\epsilon$ RI de alta afinidad en una superficie de basófilos o mastocitos. La reticulación de complejos de Fc $\epsilon$ RI en la superficie celular desencadena la granulación de mediadores biológicos como la histamina y los mediadores de lípidos que causan reacciones inflamatorias (Prussin *et al.*, 2003).

25 Tal como se describió anteriormente, la reticulación de los receptores de superficie celular aparece en dos etapas. En primer lugar, cuando el antígeno (alérgeno) reticula receptores de Ig $\alpha$ /Ig $\beta$  en la superficie de células B inmaduras, y en segundo lugar, cuando el alérgeno reticula los receptores Fc $\epsilon$ RI en la superficie de mastocitos. Además, se produce una reticulación similar en la activación de células presentadoras de antígeno (APC) como las células dendríticas (Gould *et al.* 2008). En estos casos, es posible la reticulación, cuando el antígeno (alérgeno) es multivalente, teniendo múltiples sitios de unión (epítomos) para anticuerpos.

30 La primera estructura de inmunocomplejo tridimensional de alérgeno y anticuerpo de IgE se publicó recientemente (Niemi *et al.*, 2007). En esta estructura, la  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) dimérica de leche de vaca (Bos d 5) está unida a dos fragmentos de IgE/Fab. Sorprendentemente, el epítomo de unión a IgE de BLG cubría un área plana en la superficie del alérgeno, lo cual es inusual porque, según las estructuras cristalinas, la mayoría de los epítomos de IgG conocidos se ubicaban en las áreas que sobresalían de los antígenos. Los fragmentos de IgE/Fab se ubicaban en el mismo lado, lo que hace posible, en principio, que la BLG dimérica pueda unir dos anticuerpos de IgE idénticos que conducen a la granulación de mastocitos.

35 Esta observación novedosa sobre el papel de la dimerización para la alergenicidad de BLG lleva a los inventores adicionalmente a investigar cuán común es la dimerización (u otro tipo de oligomerización) entre los alérgenos. Se notificó que algunos alérgenos eran oligoméricos, pero se notificó que la mayoría de los alérgenos eran monoméricos. También se comprendió pronto que hay datos controvertidos en la bibliografía. En los casos correspondientes, tales como los informes que consideran el alérgeno de abedul Bet v 1, se informó que el alérgeno existía como monómero y, a veces, como dímero. De hecho, BLG es un ejemplo bien estudiado de un dímero transitorio, una proteína que puede existir como monómero o dímero en disolución (Nooren *et al.*, 2003). Sakurai y Goto (2002) también han estudiado el equilibrio monómero-dímero de BLG como modelo de interacción proteína-proteína. Termodinámicamente, la constante de disociación del dímero es tan alta que en disolución, BLG puede existir tanto como monómero como dímero. Naturalmente, los factores ambientales, como el pH o la concentración de sal, afectan al equilibrio. Sin embargo, en condiciones fisiológicas en el cuerpo, BLG es casi totalmente monomérico. El elemento clave de la presente invención es que la dimerización transitoria en muchos casos es una característica crítica de los alérgenos, y esta dimerización transitoria puede obstaculizarse mediante mutagénesis dirigida.

40 Los dímeros transitorios son difíciles de observar porque una constante de disociación alta del dímero reduce la fracción dimérica a insignificante en concentraciones celulares normales (10-100 nM). Sin embargo, mediante la colocalización dentro de una célula puede aumentar la concentración localmente (hasta 1 mM), y la interacción entre monómeros puede aumentar de insignificante a sustancial (Kuriyan *et al.*, 2007). Un ejemplo de colocalización es la unión de antígenos (alérgenos) en la superficie de células B inmaduras o mastocitos. Esto significaría que la

homodimerización débil del alérgeno en la superficie de la célula puede ser suficiente para la transducción de señales que conduce a sensibilización o reacción alérgica.

La importancia de la dimerización de alérgenos ha sido muy poco estudiada previamente. Schöll *et al.* han estudiado el papel de la dimerización del alérgeno de polen de abedul Bet v 1 para la reticulación. Las pruebas cutáneas en ratones alérgicos a Bet v 1 fueron positivas con el dímero de Bet v 1, pero se mantuvieron negativas cuando se usó el monómero. Además, el monómero era menos capaz de activar las células B de memoria murinas para la producción de IgE *in vivo*. En este estudio, se preparó la forma monomérica de Bet v 1 con la adición de glicerol al 4% (Schöll *et al.*, 2005). Sin embargo, el problema es que el efecto del aditivo es solo temporal porque el glicerol se diluye gradualmente y se alcanza el equilibrio normal de monómero/dímero. Más tarde, según el análisis de modelado molecular, se sugirió que la no alergenicidad de la proteína T1, un miembro de la familia de proteínas de Bet v 1 posiblemente se basaba en evitar la dimerización de la proteína T1 (Ghosh D *et al.*, 2008). Verdino *et al.* sugirieron en 2002 que la interrupción del ensamblaje del dímero del alérgeno Phl p 7 disminuiría la reticulación. Sin embargo, en el caso de Phl p 7, en la práctica es muy difícil crear una variante monomérica estable, porque dos cadenas polipeptídicas están muy fuertemente asociadas entre sí formando un dímero muy estable (Verdino *et al.* 2002).

También se ha investigado la influencia de la estructura cuaternaria en la alergenicidad e inmunogenicidad del alérgeno de cucaracha Per a 3. La forma hexamérica indujo una liberación de leucotrienos más fuerte de los basófilos que la forma monomérica. Desafortunadamente, la preparación de formas monoméricas y hexaméricas de Per a 3 no se describió en el artículo (Bellinghausen *et al.*, 2007). Otro estudio sobre el alérgeno de cucaracha Bla g 2 mostró que el Bla g 2 de tipo natural dimérico indujo más liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa de los mastocitos que un mutante de Bla g 2 monomérico (Li *et al.* 2008). Sin embargo, los autores concluyeron que Bla g 2 existiría como dímero en condiciones fisiológicas.

En el documento de de Halleux *et al.*, 2006, se describe que se espera que una forma monomérica de Der p 1 sería menos propensa a desencadenar reacciones anafilácticas en la inyección a pacientes sensibilizados. Sin embargo, los experimentos que muestran tales resultados no están descritos.

## 25 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra ejemplos de dímeros de alérgenos simétricos encontrados en las estructuras cristalinas dibujadas en la misma escala. Se muestra un monómero como modelo de cinta color gris claro, el segundo monómero como un modelo de cinta color gris oscuro. El alérgeno dimérico se muestra en dos orientaciones. En la imagen de la izquierda, el eje simétrico doble se dirige hacia el espectador, en la imagen de la derecha, el eje está en el mismo plano que el papel. La imagen en la esquina superior izquierda muestra la estructura cristalina del inmunocomplejo BLG-D1/IgE (Fab) (Bos d 5) en el que se muestran fragmentos de IgE como modelos de superficie color gris. Las coordenadas para los alérgenos se obtuvieron del banco de datos de proteínas y las coordenadas para los dímeros se crearon con el servidor PISA. La figura se creó mediante el programa PYMOL (DeLano 2002). Che a 3 contiene cuatro cadenas polipeptídicas. Dos de las cadenas polipeptídicas forman un dímero obligado (dos monómeros forman juntos la estructura compacta; el monómero no puede formar una estructura estable solo (Nooren *et al.*, 2003)). Dos dímeros obligados forman un dímero transitorio. Api m 4 contiene ocho cadenas polipeptídicas. Cuatro de ellos forman un tetrámero obligado estable. Dos de los tetrámeros forman una estructura transitoria. Otros ejemplos representan estructuras de dímeros transitorios en las que la unidad monomérica consiste en una única cadena polipeptídica.

La figura 2 muestra las posiciones de los mutantes diseñados en la zona de contacto monómero-monómero de Bos d 5 dimérico ( $\beta$ -lactoglobulina) y alérgeno Bet v 1. La figura se creó con el programa PYMOL.

La figura 3, un ejemplo de mutantes sugeridos en la zona de contacto monómero-monómero de 12 dímeros de alérgeno simétricos.

La figura 4 muestra una presentación esquemática del vector de expresión bacteriano utilizado para la construcción y producción de mutantes de BLG monoméricos.

La figura 5 muestra el resultado de inhibición obtenido del ELISA competitivo del fragmento Fab D1 de IgE con subtipo de IgG1 humana que uniéndose a  $\beta$ -lactoglobulina biotinilada inmovilizada se ha inhibido por  $\beta$ -lactoglobulina nativa soluble así como por mutantes de BLG H146P, R148P y S150P monoméricos.

La figura 6 muestra los espectros de CD de la  $\beta$ -lactoglobulina nativa soluble, así como los mutantes de BLG H146P, R148P y S150P monoméricos.

La figura 7 muestra las muestras de control (A) y la liberación de histamina derivada del alérgeno (BLG y sus mutantes) (B) de los basófilos sensibilizados y separados. Según el protocolo del fabricante, la liberación espontánea debe dar valores < 5% y la muestra de control positivo > 5% de la liberación total de histamina.

La figura 8 muestra la unión de Fab D1 y scFv D1 a la BLG dimérica y sus mutantes monoméricos analizados por ELISA.

La figura 9 muestra un diagrama de flujo de trabajo para la búsqueda de zonas de contacto monómero-monómero y el diseño de mutantes de hipoalérgeno capaces de prevenir la formación de dímeros.

### Abreviaturas

	BLG	$\beta$ -lactoglobulina
5	ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
	ADN	ácido desoxirribonucleico
	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	EIA	inmunoensayo enzimático
	ELISA	ensayo de inmunoadsorción enzimática
10	Fab	fragmento con unión a antígeno específica
	IgG	inmunoglobulina G
	IgE	inmunoglobulina E
	IgM	inmunoglobulina M
	RMN	resonancia magnética nuclear
15	PCR	reacción en cadena de la polimerasa

### Descripción detallada de la invención

Tal como se describió anteriormente, la capacidad para formar dímeros u oligómeros parece tener un papel significativo para la inmunogenicidad (activación de células B) y alergenicidad (desencadenamiento de basófilos, mastocitos) de los alérgenos. Si se reduce la formación de homodímeros simétricos estables o incluso transitorios y el alérgeno existiera solo en forma monomérica, esto ofrecería una base para desarrollar una nueva generación de hipoalérgenos: alérgenos monoméricos. Las variantes monoméricas tendrían propiedades ventajosas al considerar la inmunoterapia específica. Los alérgenos monoméricos no desencadenarían la desgranulación de mastocitos o basófilos. Además, las variantes monoméricas se unirían a los anticuerpos de IgE específicos de alérgeno evitando la unión de alérgenos nativos. Esto haría posible el uso de grandes cantidades de variantes monoméricas como vacuna para la alergia para inducir la producción de anticuerpos de IgG protectores, o para competir con alérgenos naturales. También haría posible reducir la unión de alérgenos diméricos naturales a mastocitos o basófilos mediante competición basándose en una mayor concentración de los alérgenos monoméricos hipoalérgicos que no causan la formación de complejos de Fc $\epsilon$ RI reticulados.

Por lo tanto, basándose en este descubrimiento de la importancia de la dimerización, particularmente de la dimerización transitoria, en la alergenicidad, el objeto de la invención es proporcionar un método para seleccionar un candidato hipoalérgico para la inmunoterapia. El método comprende las etapas de:

a) alterar el área superficial de un polipéptido alergénico seleccionado del grupo que consiste en: Api m 1 y Api m 4, en donde dicha área superficial es una zona de contacto monómero-monómero con un área de menos de 850 Å<sup>2</sup> en relación con la formación de dímeros con el fin de inactivar o reducir la capacidad natural del polipéptido para formar dímeros en el que el área superficial de dicho polipéptido en relación con la formación de dímeros se altera por mutagénesis dirigida del ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido para producir sustituciones de aminoácidos a dicho polipéptido; y

b) someter a prueba *in vitro* al polipéptido alterado obtenido de la etapa a) para la capacidad de activar la liberación de histamina u otros mediadores de reacciones alérgicas de leucocitos basófilos o mastocitos humanos, en donde aquellos polipéptidos alterados que no activan la liberación de histamina o dichos otros mediadores o activan la liberación de histamina o dichos otros mediadores menos que el polipéptido de origen se consideran candidatos de hipoalérgeno para inmunoterapia, y

c) comprobar *in vitro* que un anticuerpo de IgE específico para dicho polipéptido alergénico todavía se une al polipéptido alterado obtenido en la etapa a) y sometido a prueba en la etapa b) para confirmar que dicho polipéptido alterado tiene una estructura similar a la nativa, capacidad para prevenir la reticulación de los complejos IgE-Fc $\epsilon$ RI en un mastocito o anticuerpos de superficie basófilos, y potencial inmunogénico para desarrollar anticuerpos de IgG protectores.

El término inmunoterapia, tal como se usa en el presente documento, define al menos tres modos de tratamiento:

a) terapia de desensibilización usando a lo largo del tiempo dosis múltiples de baja concentración de variantes monoméricas de alérgenos;

b) usar unas pocas dosis de concentraciones relativamente altas de variantes monoméricas para inducir una respuesta de IgG hacia el alérgeno nativo (es decir, un esquema de vacunación de alergia); y

5 c) usar la variante monomérica como agente terapéutico para curar los síntomas de alergia compitiendo con el alérgeno nativo para unirse a la IgE.

#### Dímeros transitorios

No hay ningún estudio experimental publicado sobre la formación de dímeros transitorios de alérgenos. Sin embargo, es posible evaluar la frecuencia de dímeros transitorios buscando estructuras cristalinas disponibles. En un experimento de cristalización típico, la concentración de proteína es de aproximadamente 10 mg/ml, que corresponde a una concentración de 0,5 mM para una proteína de 20 kDa. Esto aumentaría considerablemente la fracción de posible forma dimérica de proteína. Sin embargo, debe observarse que la disolución de cristalización también contiene una fracción monomérica que puede cristalizar. Además, el pH muy alto o bajo, los precipitantes y los aditivos pueden afectar la cristalización. Para dímeros transitorios, el área de la zona de contacto del dímero es preferiblemente de aproximadamente o por debajo de 850 Å<sup>2</sup>, ya que para aquellos dímeros que se pronostica que serán transitorios, el área es de 530 Å<sup>2</sup>(BLG), 620 Å<sup>2</sup> (Der p 1) u 820 Å<sup>2</sup> (Bet v 1). Los dímeros más fuertes parecen tener zonas de contacto de dímeros mucho mayores, tal como 1139 Å<sup>2</sup> para Bla g 2.

Por lo tanto, tal como se describió anteriormente, la expresión "dímeros transitorios" significa que:

20 a) la dimerización de alérgenos depende de la concentración, a concentraciones fisiológicas (10-100 nM) existen esencialmente como monómeros;

b) se necesita un aumento mediado por colocalización de la concentración local para la dimerización *in vivo*; tras la unión a complejos de receptores IgE-FcεRI en mastocitos o basófilos, los alérgenos monoméricos forman dímeros transitorios;

25 c) en los dímeros transitorios, las subunidades monoméricas no están unidas covalentemente y las subunidades monoméricas pueden plegarse de manera independiente; y

d) el área superficial de la zona de contacto monómero-monómero del área de dímeros transitorios es relativamente pequeña (menos de 850 Å<sup>2</sup>).

El banco de datos de proteínas ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) contiene en este momento (febrero de 2008) las coordenadas de 54 estructuras de alérgenos. Se han determinado nueve estructuras usando RMN y estas no pueden usarse en la evaluación. Las 45 estructuras alergénicas restantes se estudiaron utilizando el servidor PISA del Instituto Europeo de Bioinformática ([www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)) (Krissinel E *et al.*, 2007). PISA utiliza los datos de cristales para predecir el estado oligomérico (estructura cuaternaria) y también puede usarse para evaluar las zonas de contacto proteína-proteína. PISA es capaz de predecir bien la estructura de dímeros estables. Sin embargo, debido a la menor zona de contacto monómero-monómero, predice que BLG sería monomérico.

35 Sin embargo, PISA es útil en este estudio porque proporciona zonas de contacto proteína-proteína. En principio, es difícil distinguir zona de contacto dimerica de contactos cristalinos. Sin embargo, los complejos homodiméricos verdaderos son casi siempre simétricos, existe un eje de simetría rotacional entre monómeros (Blundell *et al.*, 1996). El servidor PISA puede utilizarse para buscar zonas de contacto y encontrar posibles ejes de simetría rotacional entre los monómeros.

40 Se han analizado 45 estructuras cristalinas de alérgenos. 35 alérgenos (78%) existían en las formas cristalinas en las que se encontró que los alérgenos formaban homooligómeros simétricos, principalmente dímeros. Dos de los dímeros simétricos eran muy débiles. Sin embargo, la fracción de homooligómeros entre los alérgenos fue muy alta, lo que evidencia que la capacidad de formar oligómeros es una propiedad muy común entre los alérgenos. Algunos de los dímeros de los alérgenos encontrados se muestran en la figura 1. Se encontró que diez alérgenos existían en forma monomérica en cristales.

#### Detección de zonas de contacto monómero-monómero y diseño de mutaciones hipoadérgicas.

1) Si no hay disponible una estructura tridimensional del alérgeno de interés, entonces i) el alérgeno se cristaliza, ii) su estructura se determina utilizando difracción de rayos X, y iii) se utilizan las coordenadas de la estructura cristalina tridimensional resuelta para analizar visualmente el empaquetamiento molecular de alérgeno utilizando software de gráficos moleculares (tal como PYMOL (DeLano 2002), O (Jones *et al.* 1991) y XTALVIEW (McRee, 1999)). Alternativamente, pueden usarse programas informáticos tal como PISA (Krissinel *et al.* 2007; [http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)) para analizar el empaquetamiento molecular de alérgenos en el cristal. En el análisis, el objetivo es encontrar un eje de simetría rotacional entre las moléculas de alérgeno. En la mayoría de los casos es un eje de simetría doble. (Se dice que un objeto que se puede girar alrededor de un eje y

repite su forma al menos una vez durante la rotación tiene un eje de simetría rotacional. El eje a lo largo del cual se realiza la rotación es un elemento de simetría denominado eje de rotación. Se dice que un objeto que aparece idéntico después de una rotación de 180°, dos veces en una rotación de 360°, tiene un eje de rotación de 2 veces). Si se encuentra un eje de simetría rotacional entre los monómeros de un alérgeno, esto es una indicación de que el alérgeno es capaz de formar homooligómero simétrico al menos en altas concentraciones de proteínas.

2. Si se conoce la estructura cristalina tridimensional, es posible proceder directamente a la etapa iii) en 1).

3. Cuando se ha encontrado el eje, el programa de gráficos moleculares, como PYMOL, puede utilizarse para analizar la zona de contacto monómero-monómero entre los monómeros de alérgeno. En la tabla 2, se muestra el área de las zonas de contacto monómero-monómero detectadas de numerosos alérgenos. En la siguiente etapa, la zona de contacto monómero-monómero puede usarse para detectar residuos de aminoácidos cuya sustitución dificultaría la formación de dímeros. En la figura 3, se muestra una lista de mutaciones sugeridas para aminoácidos en zonas de contacto monómero-monómero de diferentes alérgenos. Las sustituciones típicas de aminoácidos serían la mutación de pequeños residuos con unos más grandes. Además, los residuos hidrofóbicos (como fenilalanina o leucina) podrían reemplazarse por residuos hidrófilos (ácido glutámico, lisina). Otras sustituciones preferibles se discuten a continuación.

4. Si no se ha encontrado un eje de simetría rotacional entre los monómeros, es posible i) cristalizar el alérgeno en una forma de cristal diferente (utilizando diferentes condiciones de cristalización, por ejemplo, cambiando el pH, la proteína o la concentración del precipitante). Alternativamente, los monómeros pueden acoplarse computacionalmente mediante restricciones simétricas. Esto puede hacerse utilizando el software ROSETTA (Andre *et al.*, 2007).

5. Preferiblemente, la capacidad reducida de las proteínas mutantes para formar dímeros se someterá a prueba, por ejemplo, determinando la constante de disociación para el dímero. Sin embargo, es importante verificar que la variante monomérica esté plegada como una proteína nativa reteniendo las propiedades de unión a los anticuerpos de IgE.

6. En principio, si no se conoce la estructura tridimensional del alérgeno, los residuos de proteína también pueden mutarse de manera aleatoria. De nuevo, se someterá a prueba la posible formación reducida de dímeros y el plegamiento de la variante monomérica (véase también la figura 9).

#### Desarrollo de hipoalérgenos monoméricos

La variante monomérica estable de alérgeno podría prepararse mutando los residuos de aminoácidos en la zona de contacto del dímero. Como ejemplo, en la figura 2 se muestra la zona de contacto monómero-monómero de BLG. Los residuos de aminoácidos mutados en la figura 3 (His 146, Arg 148, Ser 150) disminuyen la forma dimérica y aumentan la monomérica de BLG en disolución.

Preferiblemente, las variantes monoméricas pueden obtenerse mediante la mutación de algunos residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1-5) en la superficie relacionada con la formación de dímeros u oligómeros en residuos voluminosos (por ejemplo, Arg, Tyr, Lys, Trp pueden mutarse a Ala o Pro). Los residuos mutados son preferiblemente aquellos cuyas cadenas laterales apuntan al exterior hacia el disolvente, causando un cambio mínimo en la estructura básica del alérgeno. Un experto en la materia puede alterar fácilmente el área superficial de un polipéptido alergénico aplicando técnicas de ingeniería genética convencionales. Se pueden introducir mutaciones en el ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido, por ejemplo, mediante métodos basados en PCR y otros métodos para mutagénesis dirigida, así como mediante mutagénesis aleatoria o mediante genes sintéticos de tamaño completo. Estos métodos se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al*, John Wiley & Sons: 1992).

#### Ensayo de liberación de histamina

La histamina es un mediador importante en una alergia de "tipo inmediato" después de la administración de alérgenos y se encuentra en la fase inicial de una reacción anafiláctica. Por lo tanto, el potencial de los hipoalérgenos para inmunoterapias puede someterse a prueba fácilmente mediante diferentes ensayos de liberación de histamina.

Los hipoalérgenos de la presente invención tienen una actividad alérgica reducida en comparación con los alérgenos de tipo natural correspondientes. Según la invención, el término "actividad alérgica" denota la capacidad de un compuesto o composición para inducir una reacción alérgica en un mamífero sensibilizado, por ejemplo en un paciente alérgico a la leche. Una reacción alérgica puede ser desgranulación de mastocitos, reacción cutánea positiva y/o reacción nasal. La actividad alérgica se define preferiblemente en pruebas *in vitro* o *in vivo* adecuadas. La actividad alérgica puede determinarse en una prueba de pinchazo en la piel tal como se describe en van Hage-Hamsten *et al.* (1999) o en Pauli *et al.* (2000).

Preferiblemente, la actividad alérgica del hipoalérgeno es menos del 50% de la actividad alérgica del alérgeno de tipo natural. Más preferiblemente, la actividad alérgica del hipoalérgeno es inferior al 25% del alérgeno de tipo natural. En la realización más preferida, el hipoalérgeno no tiene sustancialmente actividad alérgica. En general, la liberación de histamina inducida por el hipoalérgeno de la invención se reduce significativamente en comparación con la liberación de histamina inducida por el polipéptido alergénico de tipo natural correspondiente. Una prueba *in vitro*

preferida para determinar la liberación de histamina es el ensayo de liberación de histamina en basófilos tal como se describe en Vrtala *et al.*, (1997) (véase también el ejemplo 3). Preferiblemente, la liberación de histamina se reduce en al menos el 25%, más preferiblemente en al menos el 50%, más preferiblemente en al menos el 75%, determinada a esa concentración de alérgeno a la cual el alérgeno de tipo natural correspondiente muestra la máxima liberación de histamina.

La presente invención se describe adicionalmente en el siguiente ejemplo, que no pretende limitar el alcance de la invención.

## Sección experimental

### Ejemplo 1

#### 10 Detección de la zona de contacto monómero-monómero de $\beta$ -lactoglobulina

Basado en Sakurai y Goto (2002) y confirmado por la estructura de inmunocomplejo tridimensional del alérgeno y el anticuerpo de IgE publicado recientemente por Niemi *et al.*, 2007, se ha mostrado que la zona de contacto monómero-monómero de  $\beta$ -lactoglobulina comprende, entre otros, los aminoácidos Asp33, Ala34, Arg40, His146, Arg148 y Ser150.

#### 15 Ejemplo 2

#### Características de los mutantes de $\beta$ -lactoglobulina monoméricos recombinantes

En este ejemplo, se construyeron los mutantes de  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) monoméricos recombinantes que contenían sustituciones de aminoácidos y se caracterizaron sus propiedades de unión a anticuerpo de IgE anti-BLG (D1). Sakurai y Goto (2002) han estudiado el equilibrio monómero-dímero de BLG como modelo de interacción proteína-proteína.

#### 20 I. Construcción de mutantes de $\beta$ -lactoglobulina monoméricos

Para la construcción de mutantes de BLG monoméricos se realizaron las siguientes sustituciones de aminoácidos: H146P, R148P, S150P y H146P/R148P/S150P (mutante triple) (SEQ ID NO: 1-4). Anteriormente, el ADNc que codifica para la BLG dimerica recombinante se clonó en el vector de expresión bacteriano pKktac. Las sustituciones de aminoácidos se sometieron a amplificación por PCR utilizando el cebador A de extremo 5' y los cebadores B-E de extremo 3' (tabla I). Se usó el cebador B para H146P, el cebador C para R148P, el cebador D para S150P y el cebador E para la sustitución de H146P/R148P/S150P. La amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando las condiciones de "touch-down": primero 2 min a 95°C, luego 25 ciclos de 1 min a 94°C para la desnaturalización, 30 s a 70°C y disminuyendo 0,7°C por ciclo para el apareamiento y 2 min a 70°C para alargamiento seguido de 20 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 55°C y 2 min a 72°C seguido de 1 ciclo de 10 min a 72°C.

30 Los ADNc amplificados resultantes de los mutantes de BLG monoméricos se clonaron en el vector de expresión bacteriano (pKktac) utilizando sitios de clonación *Nco*I y *Hind*III (figura 4) y luego se transformaron en *E. coli* RV308. Los mutantes de BLG monoméricos que contenían la etiqueta de hexahistidinilo C-terminal se produjeron de manera bacteriana a gran escala (1 litro) para la purificación por IMAC. Debido a que los mutantes de BLG recombinantes se secretaron en el espacio periplásmico de *E. coli* pero no en los medios de cultivo, los periplasmas se aislaron y luego se sometieron a una columna de Sepharose con níquel inmovilizado. Los mutantes de BLG monoméricos purificados eran de una pureza sustancial.

#### II. Caracterización de los mutantes de $\beta$ -lactoglobulina monoméricos

Las propiedades de unión del anticuerpo de IgE anti-BLG (D1) a los mutantes de BLG monoméricos purificados se analizaron mediante ELISA competitivo.

40 Primero, se incubaron cantidades crecientes de la BLG nativa no biotinilada (nBLG) y mutantes de BLG monoméricos con el fragmento Fab D1 de IgE, y luego las mezclas de reacción se aplicaron a pocillos de placas de microtitulación de estreptavidina recubiertos con BLG biotinilada. La figura 5 muestra el resultado del ELISA competitivo. En el caso de BLG nativa y mutantes de BLG H146P, R148P y S150P monoméricos utilizados como competidor la unión del Fab D1 de IgE a la  $\beta$ -lactoglobulina biotinilada podría inhibirse.

#### 45 III. Mediciones de dicroísmo circular

El dicroísmo circular (CD) puede usarse para determinar si una proteína se pliega adecuadamente y para comparar además estructuras de diferentes mutantes de la misma proteína. Para mediciones de dicroísmo circular (CD), el tampón de todos las rBLG se intercambió por Hepes 5 mM (pH 7,4) usando diálisis. El espectro de UV lejano de la BLG nativa (nBLG, Sigma), y de los mutantes de BLG H146P, R148P y S150P monoméricos se midió con el espectropolarímetro Jasco J-715 a +20°C, controlado con un termostato Peltier (Jasco PTC-348WI) usando una celda de cuarzo de 1 mm. Las concentraciones de las proteínas eran de 1 mg/ml para nBLG, 0,50 mg/ml para H146P, 0,20 mg/ml para R148P y 0,23 mg/ml para el mutante de BLG S150. Los espectros de CD mostrados son promedios de

tres mediciones (figura 6). Según los espectros de CD, los mutantes de BLG monoméricos recombinantes (excepto el mutante triple) muestran una estructura similar en comparación con la BLG nativa (nBLG).

Ejemplo 3

Funcionalidad de mutantes de BLG monoméricos para la liberación de histamina

- 5 La inducción de la liberación *in vitro* de histamina a partir de leucocitos basófilos por nBLG y mutantes de BLG monoméricos se analizó mediante EIA de liberación de histamina utilizando basófilos separados y sensibilizados, seguido de ELISA de histamina (LD-BA).

Se usó sangre completa (25 ml) de un donante alérgico no lácteo para el aislamiento de los leucocitos. Los glóbulos rojos se lisaron mezclándolos con un tampón de lisis (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4), incubando 15 min en hielo y luego centrifugando con 450 x g durante 10 min a TA. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se lisó de nuevo como anteriormente. Finalmente, el sedimento de células blancas se lavó una vez con PBS estéril y NaCl al 0,9% (p/v) y se contó el número de células mediante un hemocitómetro. Luego, las moléculas de IgE unidas se separaron de los basófilos incubándolos en un tampón de separación de 5 ml (ácido láctico 13,4 mM, NaCl 140 mM, KCl 5 mM, pH 3,9) durante 3,5 min. Las células separadas se lavaron con tampón Hepes [Hepes 20 mM, NaCl 132 mM, KCl 6 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2 mM, glucosa 5,5 mM, albúmina de suero humano al 0,5% (p/v, Sigma A3782), pH 7,4]. Finalmente, se resuspendieron las células en 600 µl de tampón Hepes y se dividieron en dos tubos: tubo de P3 (+) (400 µl) y tubo de control negativo (-) (200 µl). Para la sensibilización de las células por suero de IgE alérgico a la leche, se incubaron con la siguiente mezcla de sensibilización: 100 µl de suero de P3 alérgico a la leche (+) o 50 µl de suero de un donante no alérgico (-), EDTA 4 mM en un volumen total de 0,5 ml durante 90 min a +37°C. Después de la sensibilización, se añadieron 2 ml de tampón Hepes a las células y se lavaron dos veces con tampón Hepes. Se permitió que las células se recuperaran en tampón Hepes con CaCl<sub>2</sub> 1 mM durante 30 min a +37°C. Los volúmenes de muestra se ajustaron con un tampón Hepes con CaCl<sub>2</sub> 1 mM tal como sigue: 8 ml de células de P3 (+) y 4 ml de células de control negativo (-) (aproximadamente 2,2 x 10<sup>5</sup> células/ml).

El ensayo de liberación de histamina se realizó usando un kit complementario para la liberación de histamina (Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, n.º de catálogo BA 10-1100). Para la liberación total de histamina, se mezclaron 30 µl de células separadas y sensibilizadas con 270 µl de tampón de liberación y se incubaron durante 10 min a 90°C. Las muestras se centrifugaron durante 10 min con 700 x g y se extrajeron 50 µl del sobrenadante para la acilación. Para la liberación de histamina inducida por alérgenos, se diluyeron los alérgenos (nBLG, rBLG y sus mutantes) a las concentraciones de 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml y 0,001 mg/ml en el tampón de liberación (V<sub>tot</sub> = 500 µl). Luego se mezclaron 150 µl de cada dilución de alérgeno y 150 µl de suspensión celular o 150 µl de tampón de liberación y 150 µl de suspensión celular (para liberación espontánea) o 150 µl de antisuero de anti-IgE (1 µg/ml) y 150 µl de suspensión celular (como control positivo) y se incubaron durante 60 min a +37°C. Con el fin de detener la reacción de liberación, se incubaron las muestras durante 10 min en hielo y luego se centrifugaron durante 10 min con 700 x g. Para la acilación de la histamina liberada, se utilizaron 50 µl del sobrenadante transparente.

35 La histamina liberada se midió mediante ELISA de histamina (Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, número de catálogo BA 10-1000). En el ELISA, la histamina se derivatizó cuantitativamente a N-acilhistamina que se unió a la fase sólida de la placa de microtitulación. La histamina liberada y acilada y la acilhistamina unida a la fase sólida compitieron por un número fijo de sitios de unión a IgE de antisuero. Cuando el sistema estuvo en equilibrio, se retiraron el antígeno libre y los complejos de antígeno libre-antisuero mediante la etapa de lavado. El anticuerpo unido a la histamina en fase sólida se detectó mediante anticuerpo anti-cabra conjugado con peroxidasa. La reacción del sustrato TMB/peroxidasa se monitorizó a 450 nm. La cantidad de anticuerpo unido a la histamina en fase sólida era inversamente proporcional a la concentración de histamina liberada de la muestra. La acilación de las muestras y el inmunoensayo se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, n.º de catálogo BA 10-1000). Las concentraciones de histamina de las muestras se leyeron directamente a partir de la curva patrón y el resultado de la histamina total se multiplicó por el factor 5. Con respecto a la concentración total de histamina (100%), las concentraciones de histamina inducidas por alérgeno también se calcularon en tanto por ciento.

La figura 7A muestra que la condición global de las células utilizadas para el ensayo de liberación de histamina. Según el protocolo del fabricante, la liberación espontánea debe dar valores < 5% y la muestra de control positivo > 5% de la liberación total de histamina. En la figura 7 B se muestra la liberación de histamina de la nBLG y los mutantes de BLG monoméricos recombinantes. La nBLG dimérica desencadenó la liberación de histamina de alto nivel, mientras que los mutantes monoméricos mostraron niveles de liberación de histamina notablemente más bajos. Estos resultados demuestran que los mutantes de BLG monoméricos se comportan en un ensayo funcional tal como se esperaba.

ELISA de tipo sándwich

55 Se recubrieron los pocillos de placa de microtitulación (Nunc) con 1 µg de Fab D1 anti-BLG durante 16 horas a +4°C. Para la prevención de la unión inespecífica a los pocillos, se bloquearon con 200 µl de BSA-PBS al 0,5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron las BLG (nativa o mutantes monoméricos recombinantes) a los pocillos a las concentraciones de 100, 10 y 1 µg/ml en BSA-PBS al 0,5% y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la etapa de lavado, se añadió scFv D1 anti-BLG que contenía etiqueta de myc (dilución 1:1000) a los



pocillos, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. El scFv D1 unido se detectó utilizando anticuerpo anti-myc de ratón (clon 9E10, ATCC n.º CRL-1729) y anticuerpo de Ig anti-ratón conjugado con AFOS (Bio-Rad). Como control negativo, en este ensayo se utilizó un mutante triple de BLG (T18Y, E45Y, L57Y).

5 Esta configuración de ELISA de tipo sándwich muestra que los mutantes de BLG H146P, H148P y S150P recombinantes son monoméricos de una manera dependiente de la concentración. A alta concentración (100 µg/ml), los mutantes de BLG se comportan como dímeros, pero a concentraciones más bajas (10 µg/ml) hay monómeros que no pudieron ser reconocidos mediante el ELISA de tipo sándwich en el que el fragmento Fab D1 se recubrió en los pocillos y se usó la fusión de scFv D1-myc para la detección, mientras que la BLG nativa dimérica todavía se detectó  
10 claramente a la concentración de 10 µg/ml. Esto demuestra que en altas concentraciones los mutantes de rBLG forman dímeros transitorios mientras que en bajas concentraciones los mutantes de BLG están como monómeros, por lo tanto, estos no pueden ser reconocidos por el anticuerpo específico de BLG en un ELISA de tipo sándwich.

Ejemplo 4

15 Las coordenadas de las estructuras cristalinas tridimensionales resueltas de los alérgenos Bos d 5, Bet v 1, Bet v 2, Equ c 1, Api m 1, Phl p 1, Der p 1, Der p 2, Fel d 1, Api g 1, Che a 3 y Apl m 5 se utilizaron para analizar visualmente el empaquetamiento molecular de alérgenos usando software de gráficos moleculares (PYMOL (DeLano 2002), O (Jones *et al.* 1991) y XTALVIEW (McRee, 1999)). En el análisis, el objetivo era encontrar un eje de simetría rotacional entre las moléculas de alérgeno y la zona de contacto monómero-monómero correspondiente (véase la figura 1). En la figura 3 se muestra un ejemplo de mutantes sugeridos en la zona de contacto monómero-monómero encontrada de 12 dímeros de alérgeno simétricos.

20 Tabla I: Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de los mutantes de BLG monoméricos.

A: 5' -GCGCCGACATCATAACGGTTC -3'

B: 5' -ACCTGAAGCTTAATGGTGATGGTGATGATGAATATGGCACTGTTCTT  
CCAGCTGGGTCGGGTAAAGCTCAGACGAATCGGCATCGGCAGC -3'

C: 5' -ACCTGAAGCTTAATGGTGATGGTGATGATGAATATGGCACTGTTCTT  
CCAGCTGGGTCGGGTAAAGCTC AGCGGAATATGCATC -3'

D: 5' -ACCTGAAGCTTAATGGTGATGGTGATGATGAATATGGCACTGTTCTT  
CCAGCTGGGTCGGGTAAACGGC AGACGAATATG -3'

E: 5' -ACCTGAAGCTTAATGGTGATGGTGATGATGAATATGGCACTGTTCTT  
CCAGCTGGGTCGGGTAAACGGCAGCGGAATCGGCATCGGCAGC -3'

Tabla 2. Zonas de contacto monómero-monómero detectadas en alérgenos.

alérgeno	estado de oligomerización	zona de contacto monómero-monómero (Å <sup>2</sup> )	código PDB	especie	nombre común	tipo de alérgeno
Pru p 3	4	4010	2B5S	<i>Prunus Persica</i>	melocotón	alimentos
Asp f 6	4	3360	1KKC	<i>Aspergillus fumigatus</i>		hongos (mohos)
Phl p 7	2	2569	1K9U	<i>Phleum pratense</i>	fleo	hierba poales
Gly m lectina	4	2380	1SBF	<i>Glycine max</i>	haba de soja	alimentos
Rat n 1	4	2334	2A2G	<i>Rattus norvegicus</i>	rata (orina)	animales
Phl p 1	2	1368	1N10	<i>Phleum pratense</i>	fleo	hierba Poales
Fel d 1	2	1239	2EJN	<i>Felis domesticus</i>	gato	
Bla g 2	2	1149	1YG9	<i>Blatella germanica</i>	cucaracha alemana	insectos

## ES 2 732 206 T3

Equ c 1	2	1025	1EW3	<i>Equus caballus</i>	caballo domestico	animales
Mala s 13	2	994	2J23	<i>Malassezia sympodialis</i>		hongos
Bet v 1	2	822	1BV1	<i>Betula verrucosa</i>	abedul	árbol Fagales
Bos d 4	2	761	1F6S	<i>Bos domesticus</i>	ganado doméstico	alimentos
Api m 2	2	732	1FCU	<i>Apis mellifera</i>	abeja melífera	insectos
Phl p 6	2	709	1NLX	<i>Phleum pratense</i>	fleo	hierba Poales
Der p 2	2	673	1KTJ	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	ácaro del polvo doméstico europeo	ácaros
Der p 1	2	616	2AS8	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	ácaro del polvo doméstico europeo	ácaros
The l lipasa	2	610	1DT3	<i>Thermomyces (Humicola) lanuginosa</i>		
Api m 4	8	590	2MLT	<i>Apis mellifera</i>	abeja melífera	insectos
Hev b 8	2	586	1G5U	<i>Hevea brasiliensis</i>	caucho (látex)	otros
Api g 1	2	569	2BK0	<i>Apium graveolens</i>	apio	alimentos
Gal d 4	2	563	193L	<i>Gallus domesticus</i>	pollo	alimentos
Phl p 5	2	542	1L3P	<i>Phleum pratense</i>	fleo	hierba Poales
Bos d 5	2	528	1BEB	<i>Bos domesticus</i>	ganado doméstico	alimentos
Bet v 2	2	525	1CQA	<i>Betula verrucosa</i>	abedul	árbol Fagales
Gal d 3	2	522	1AIV	<i>Gallus domesticus</i>	pollo	alimentos
Api m 1	2	496	1POC	<i>Apis mellifera</i>	abeja melífera	insectos
Phl p 2	2	413	1WHO	<i>Phleum pratense</i>	fleo	hierba Poales
Mus m 1	2	389	1MUP	<i>Mus musculus</i>	ratón (orina)	animales
Zea m 1	2	379	2HCZ	<i>Zea mays</i>	maíz	polen
Asp o 21	2	328	2GUY	<i>Aspergillus oryzae</i>		hongos (mohos)
Che a 3	4	303	2OPO	<i>Chenopodium album</i>	cenizo	mala hierba de Caryophyllales
Jun a 1	2	231	1PXZ	<i>Juniperus ashei</i>	cedro	árbol de Cupressaceae
Der f 2	2	202	1XWV	<i>Dermatophagoides farinae</i>	ácaro del polvo doméstico americano	ácaros
Mala s 6	2	161	2CFE	<i>Malassezia sympodialis</i>		hongos
Hev b 6.02	2	142	1Q9B	<i>Hevea brasiliensis</i>	caucho (látex)	otros

### Referencias

Alam R & Gorska M: Lymphocytes. J. All. Clin. Immunol. 111 (2003) S476-S485.

André I, Bradley P, Wang C & Baker D: Prediction of the structure of symmetrical protein assemblies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (2007) 17656-17661.

- 5 Bellinghausen I, Häringer B, Lafargue B, Strand D, König B, Decker H & Saloga J: Allergological implication of the quaternary hexameric structure of the cockroach allergen Per a 3. Clin. Exp. Allergy 38 (2007) 539-548.

Blundell TL & Srinivasan N: Symmetry, stability, and dynamics of multidomain and multicomponent protein systems. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 14243-14248.

Chaplin DD: Overview of the immune response. J. All. Clin. Immunol. 111 (2003) S442-S459.

- de Halleux et al., 2005, *J. Allergy Clin Immunol* 117(3):571-576.
- DeLano, W.L. (2002) The PyMol Molecular Graphics System (<http://www.pymol.org>)
- Ghosh D & Gupta-Bhattacharya S: Structural insight into protein T1, the non-allergenic member of the Bet v 1 allergen family - An in silico analysis. *Mol. Immunol.* 45 (2008) 456-462.
- 5 Gould HJ & Sutton BJ: IgE in allergy and asthma today. *Nature Rev. Immunol.* 8 (2008) 205-217.
- Jones TA, Zou J-Y, Cowan SW & Kjeldgaard: Improved methods for building protein models on electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* 47 (1991) 110-119.
- Krissinel E & Henrick K: Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 372 (2007) 774-797.
- 10 Kuriyan J & Eisenberg D: The origin of protein interactions and allostery in colocalization. *Nature* 450 (2007) 983-990.
- Mi Li, Alla Gustchina, Jerry Alexandratos, Alexander Wlodawer, Sabina Wünschmann, Christopher L. Kepley, Martin D. Chapman, and Anna Pomés: Crystal structure of a dimerized cockroach allergen *bla g 2* complexed with a monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* (2008) <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M800937200>; published on June 2, 2008.
- 15 McRee DE: XtalView/Xfit-a versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. *J. Struct. Biol.* 125 (1999) 156-165.
- Niemi M, Jylhä S, Laukkanen M-L, Söderlund H, Mäkinen-Kiljunen S, Kallio JM, Hakulinen N, Haahtela T, Takkinen K & Rouvinen J: Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the  $\beta$ -lactoglobulin allergen. *Structure*, 15 (2007) 1413-1421.
- 20 Nooren IMA & Thornton JM: Structural characterization and functional significance of transient protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* 325 (2003) 991-1018.
- Pauli G, Purohit A, Oster J-P, de Blay F, Vrtala S, Niederberger V, Kraft D & Valenta R: Comparison of genetically engineered hypoallergenic rBet v 1 derivatives with rBet v 1 wild-type by skin prick and intradermal testing: results obtained in a French population. *Clin. Exp. Allergy* 30 (2000) 1076-1084.
- 25 Prussin C & Metcalfe DD: IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. All. Clin. Immunol.* 111 (2003) S486-S494.
- Sakurai K, and Goto, Y. Manipulating monomer-dimer equilibrium of bovine  $\beta$ -lactoglobulin by amino acid substitution. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25735-25740.
- Schöll I, Kalkura N, Shedziankova Y, Bergmann A, Verdino P, Knittelfelder R, Kopp T, Hantusch B, Betzel C, Dierks K, Scheiner O, Boltz-Nitulescu G, Keller W & Jensen-Jarolim E: Dimerization of the major birch pollen allergen Bet v 1 is important for its *In vivo* IgE-cross-linking potential in mice. *J. Immunol.* 175 (2005) 6645-6650.
- 30 Van Hage-Hamsten M, Kronqvist M, Zetterström O, Johansson E, Niederberger V, Vrtala S, Grönlund H, Grönneberg R & Valenta R: Skin test evaluation of genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v 1: Results obtained with a mix of two recombinant Bet v 1 fragments and recombinant Bet v 1 trimer in a Swedish population before the birch pollen season. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104 (1999) 969-977.
- 35 Verdino P, Westritschnig K, Valenta R & Keller W: The cross-reactive calcium-binding pollen allergen, Phl p 7, reveals a novel dimer assembly. *EMBO J.* 21 (2002) 5007-5016.
- Vrtala S, Hirtenlehner K, Vangelista L, Pastore A, Eichler HG, Sperr WR, Valent P, Ebner C, Kraft D & Valenta R: Conversion of the major birch pollen allergen, Bet v 1, into two nona-naphylactic T cell epitope-containing fragments: candidates for a novel form of specific immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 1673-1681.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> Valtion teknillinen tutkimuskeskus
  - 5 <120> Método para producir hipolárgenos novedosos para inmunoterapia
  - <130> 47548
  - <160> 4
  - 10 <170> PatentIn versión 3.1
  - <210> 1
  - <211> 162
  - 15 <212> PRT
  - <213> Bos taurus
  - <220>
  - 20 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <223> Secuencia de aminoácidos de beta-lactoglobulina H146P recombinante
  - <400> 1
- Leu Ile Val Thr Gln Thr Met Lys Gly Leu Asp Ile Gln Lys Val Ala  
 1 5 10 15
- Gly Thr Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp Ile Ser Leu Leu  
 20 25 30
- Asp Ala Gln Ser Ala Pro Leu Arg Val Tyr Val Glu Glu Leu Lys Pro  
 35 40 45
- Thr Pro Glu Gly Asp Leu Glu Ile Leu Leu Gln Lys Trp Glu Asn Gly  
 50 55 60
- 25 Glu Cys Ala Gln Lys Lys Ile Ile Ala Glu Lys Thr Lys Ile Pro Ala  
 65 70 75 80
- Val Phe Lys Ile Asp Ala Leu Asn Glu Asn Lys Val Leu Val Leu Asp  
 85 90 95
- Thr Asp Tyr Lys Lys Tyr Leu Leu Phe Cys Met Glu Asn Ser Ala Glu  
 100 105 110
- Pro Glu Gln Ser Leu Ala Cys Gln Cys Leu Val Arg Thr Pro Glu Val  
 115 120 125
- Asp Asp Glu Ala Leu Glu Lys Phe Asp Lys Ala Leu Lys Ala Leu Pro  
 130 135 140
- Met Pro Ile Arg Leu Ser Phe Asn Pro Thr Gln Leu Glu Glu Gln Cys  
 145 150 155 160
- His Ile
- 30 <210> 2
  - <211> 162
  - <212> PRT

ES 2 732 206 T3

<213> Bos taurus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Secuencia de aminoácidos de beta-lactoglobulina R148P recombinante

<400> 2

Leu Ile Val Thr Gln Thr Met Lys Gly Leu Asp Ile Gln Lys Val Ala  
1 5 10 15

Gly Thr Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp Ile Ser Leu Leu  
20 25 30

Asp Ala Gln Ser Ala Pro Leu Arg Val Tyr Val Glu Glu Leu Lys Pro  
35 40 45

Thr Pro Glu Gly Asp Leu Glu Ile Leu Leu Gln Lys Trp Glu Asn Gly  
50 55 60

10 Glu Cys Ala Gln Lys Lys Ile Ile Ala Glu Lys Thr Lys Ile Pro Ala  
65 70 75 80

Val Phe Lys Ile Asp Ala Leu Asn Glu Asn Lys Val Leu Val Leu Asp  
85 90 95

Thr Asp Tyr Lys Lys Tyr Leu Leu Phe Cys Met Glu Asn Ser Ala Glu  
100 105 110

Pro Glu Gln Ser Leu Ala Cys Gln Cys Leu Val Arg Thr Pro Glu Val  
115 120 125

Asp Asp Glu Ala Leu Glu Lys Phe Asp Lys Ala Leu Lys Ala Leu Pro  
130 135 140

Met His Ile Pro Leu Ser Phe Asn Pro Thr Gln Leu Glu Glu Gln Cys  
145 150 155 160

His Ile

<210> 3

<211> 162

15 <212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

20 <223> Secuencia de aminoácidos de beta-lactoglobulina S150P recombinante

<400> 3

# ES 2 732 206 T3

Leu Ile Val Thr Gln Thr Met Lys Gly Leu Asp Ile Gln Lys Val Ala  
 1 5 10 15

Gly Thr Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp Ile Ser Leu Leu  
 20 25 30

Asp Ala Gln Ser Ala Pro Leu Arg Val Tyr Val Glu Glu Leu Lys Pro  
 35 40 45

Thr Pro Glu Gly Asp Leu Glu Ile Leu Leu Gln Lys Trp Glu Asn Gly  
 50 55 60

Glu Cys Ala Gln Lys Lys Ile Ile Ala Glu Lys Thr Lys Ile Pro Ala  
 65 70 75 80

Val Phe Lys Ile Asp Ala Leu Asn Glu Asn Lys Val Leu Val Leu Asp  
 85 90 95

Thr Asp Tyr Lys Lys Tyr Leu Leu Phe Cys Met Glu Asn Ser Ala Glu  
 100 105 110

Pro Glu Gln Ser Leu Ala Cys Gln Cys Leu Val Arg Thr Pro Glu Val  
 115 120 125

Asp Asp Glu Ala Leu Glu Lys Phe Asp Lys Ala Leu Lys Ala Leu Pro  
 130 135 140

Met His Ile Arg Leu Pro Phe Asn Pro Thr Gln Leu Glu Glu Gln Cys  
 145 150 155 160

His Ile

5

- <210> 4
- <211> 162
- <212> PRT
- <213> Bos taurus

10

- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <223> Secuencia de aminoácidos de beta-lactoglobulina H146P / R148P / S150P (triple mutante) recombinante

15

<400> 4

Leu Ile Val Thr Gln Thr Met Lys Gly Leu Asp Ile Gln Lys Val Ala  
 1 5 10 15

Gly Thr Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp Ile Ser Leu Leu  
 20 25 30

# ES 2 732 206 T3

Asp Ala Gln Ser Ala Pro Leu Arg Val Tyr Val Glu Glu Leu Lys Pro  
35 40 45

Thr Pro Glu Gly Asp Leu Glu Ile Leu Leu Gln Lys Trp Glu Asn Gly  
50 55 60

Glu Cys Ala Gln Lys Lys Ile Ile Ala Glu Lys Thr Lys Ile Pro Ala  
65 70 75 80

Val Phe Lys Ile Asp Ala Leu Asn Glu Asn Lys Val Leu Val Leu Asp  
85 90 95

Thr Asp Tyr Lys Lys Tyr Leu Leu Phe Cys Met Glu Asn Ser Ala Glu  
100 105 110

Pro Glu Gln Ser Leu Ala Cys Gln Cys Leu Val Arg Thr Pro Glu Val  
115 120 125

Asp Asp Glu Ala Leu Glu Lys Phe Asp Lys Ala Leu Lys Ala Leu Pro  
130 135 140

Met Pro Ile Pro Leu Pro Phe Asn Pro Thr Gln Leu Glu Glu Gln Cys  
145 150 155 160

His Ile

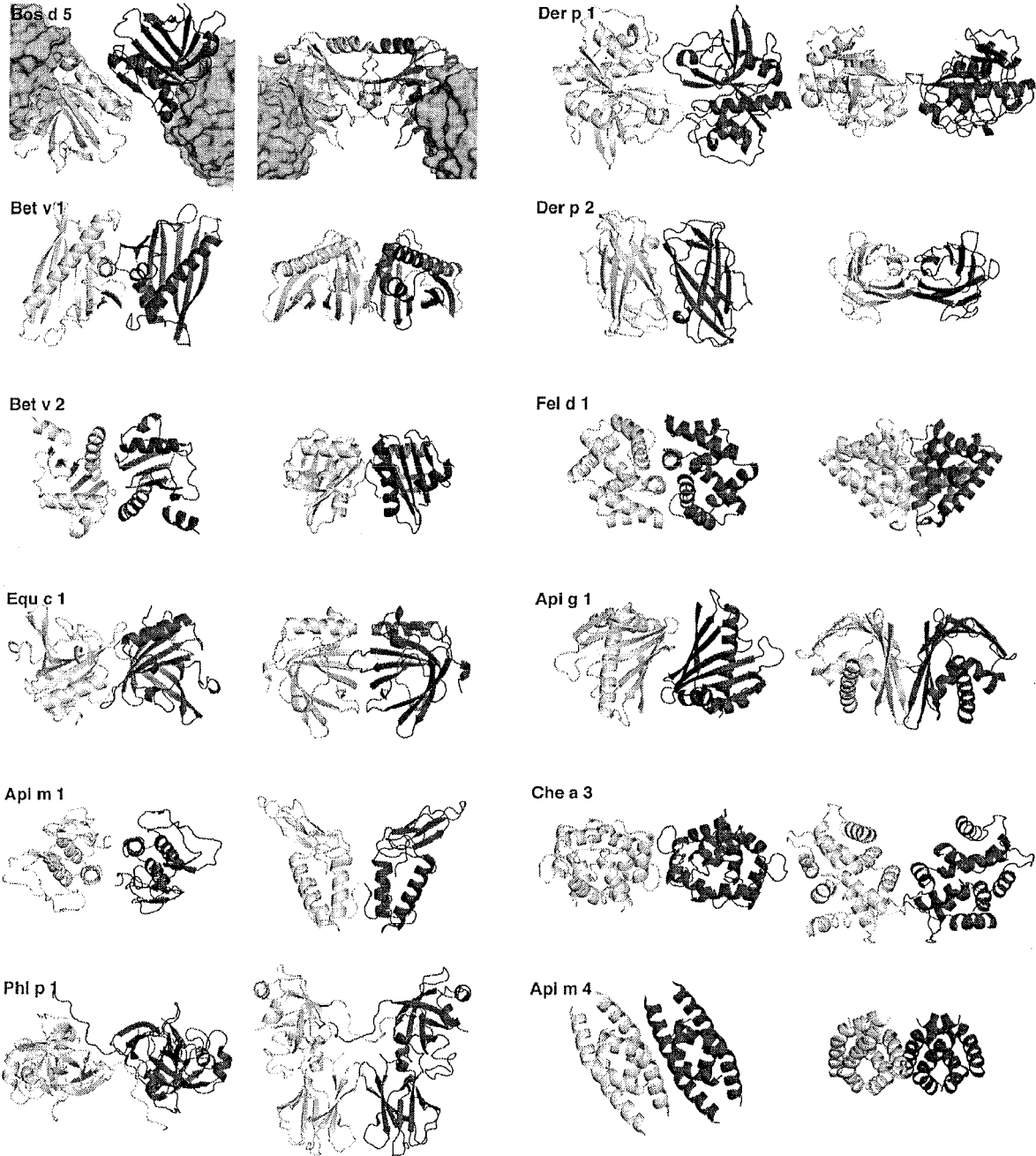
**REIVINDICACIONES**

1. Método para seleccionar candidatos de hipoalérgenos para inmunoterapia que comprende las etapas de:

- 5 a) alterar el área superficial de un polipéptido alergénico seleccionado del grupo que consiste en: Api m 1 y Api m 4, en donde dicha área superficial es una zona de contacto monómero-monómero con un área de menos de 850 Å<sup>2</sup> en relación con la formación de dímeros con el fin de inactivar o reducir la capacidad natural del polipéptido para formar dímeros, en donde el área superficial de dicho polipéptido en relación con la formación de dímeros se altera mediante mutagénesis dirigida del ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido para producir sustituciones de aminoácidos a dicho polipéptido;
- 10 b) someter a prueba *in vitro* el polipéptido alterado obtenido de la etapa a) para su capacidad de activar la liberación de histamina u otros mediadores de reacciones alérgicas de leucocitos basófilos o mastocitos humanos, en donde esos polipéptidos alterados que no activan la liberación de histamina o dichos otros mediadores o activan la liberación de histamina o dichos otros mediadores menos que el polipéptido de origen se consideran candidatos de hipoalérgeno para inmunoterapia; y
- 15 c) comprobar *in vitro* que un anticuerpo de IgE específico para dicho polipéptido alergénico todavía se une al polipéptido alterado obtenido de la etapa a) y sometido a prueba en la etapa b) para confirmar que dicho polipéptido alterado tiene una estructura similar a la nativa, capacidad para prevenir la reticulación de los complejos IgE-FcεRI en un mastocito o anticuerpos de superficie basófilos y potencial inmunogénico para desarrollar anticuerpos de IgG protectores.



**Figura 1**



**Figura 2**

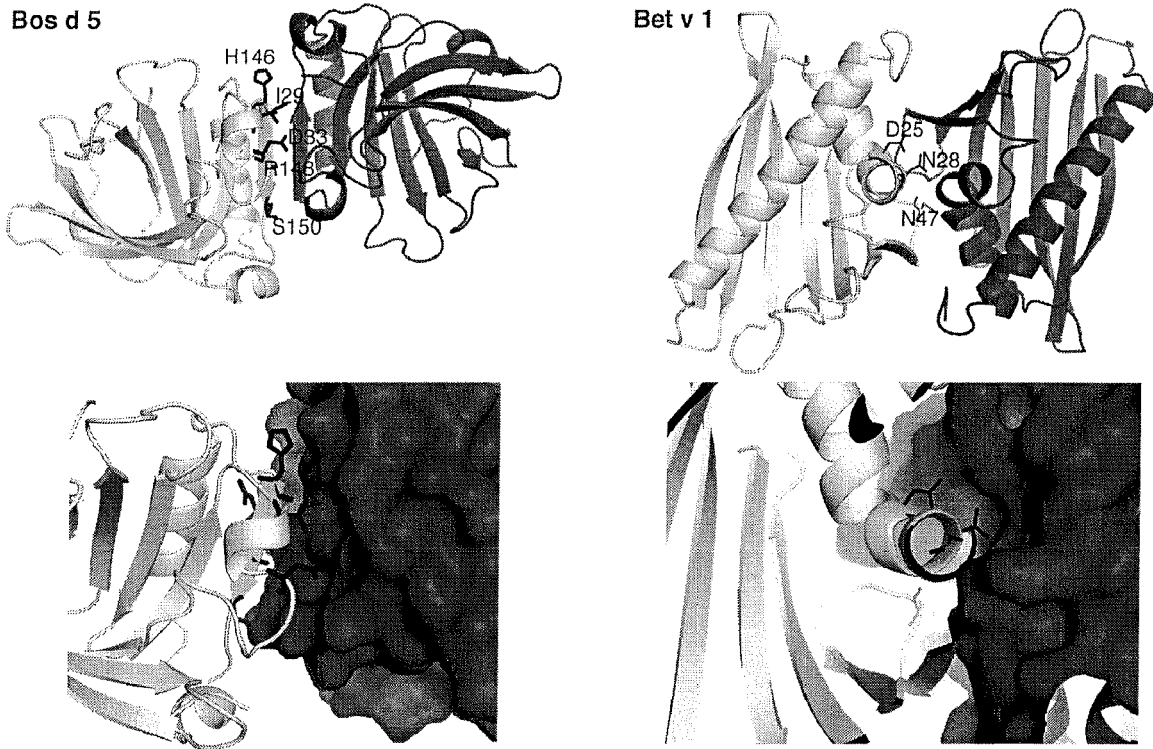
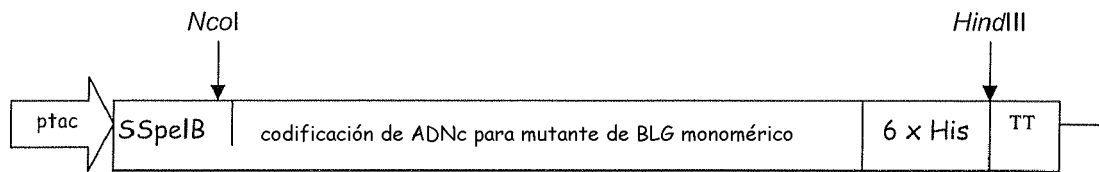


Figura 3

Tipo de alérgeno	Fuente de alérgeno	Alérgeno	Código PDB	Zona de contacto monómero-monómero [Å <sup>2</sup> ]	Mutaciones hipoalergénicas designadas
alimentos	leche de vaca	Bos d 5	1BEB	528	H146P, R148P, S150P, I29K, D33K, D33E
árbol fagales	polen de álamo	Bet v 1	1BV1	822	N28K, N28R, D25K, D25R, N47Y, N47W
árbol fagales	polen de álamo	Bet v 2	1CQA	525	A81V, A81Y, A83V, A83Y, A83R, A80K
animales	caballo	Equ c 1	1EW3	1025	F127K, F127R, V125K, V125R, V108K, V108R
insectos	abeja melífera	Api m 1	1POC	496	M86K, M86R, F82K, F82R, I1Y, Y3K
hierba poales	fleco	Phi p 1	1N10	1368	I11K, I11R, A13Y, G8T, F217K, F189R
ácaros	ácaro del polvo doméstico	Der p 1	1AS8	618	N168Y, H72W, H72V, Y165E, Y165P, G164T
ácaros	ácaro del polvo doméstico	Der p 2	1KTJ	673	Y75K, Y75R, N93Y, N93K, N93R, T91Y
animales	gato	Fel d 1	2EJN	1239	Y135K, Y135R, F85E, F85D, L132R, L132E
alimentos	apio	Api g 1	1BK0	569	V105Y, V105E, K115R, V103Y, V103R, A78P
mala hierba	cenizo	Che a 3	2OPO	303	R49Y, G59K, G59T, A53Y, F62K, F82R
insectos	abeja melífera	Api m 4	2MLT	590	S18Y, S18K, S18R, P14K, P14E, T37Y

**Figura 4**

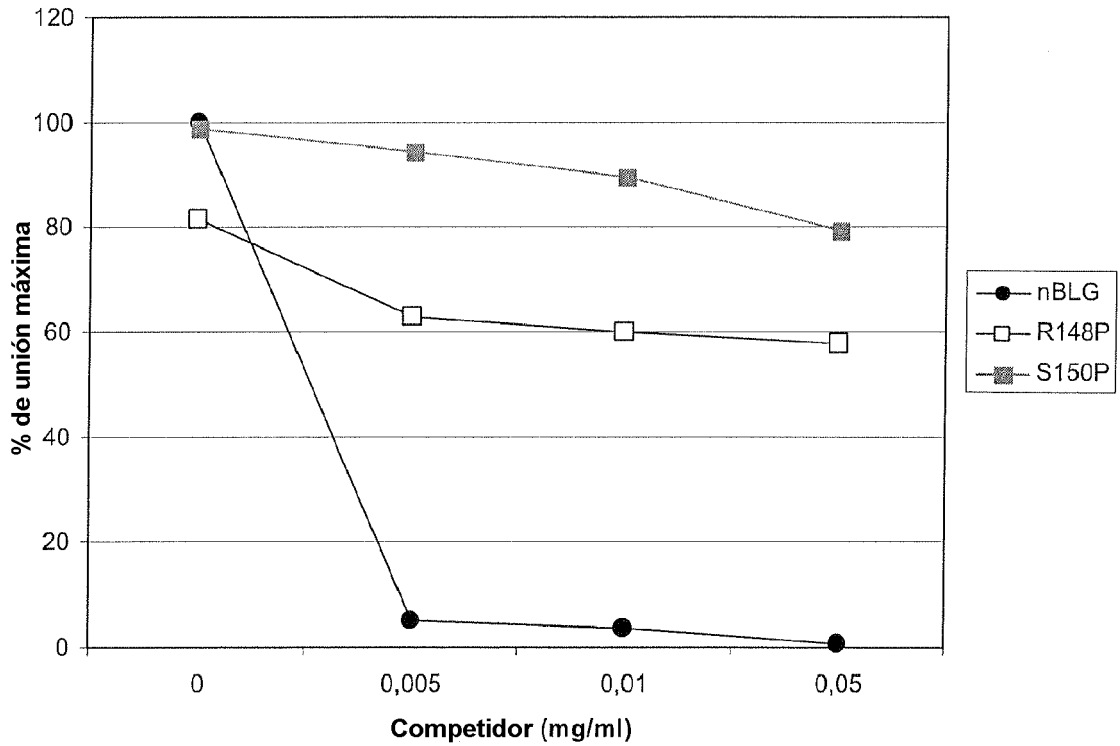
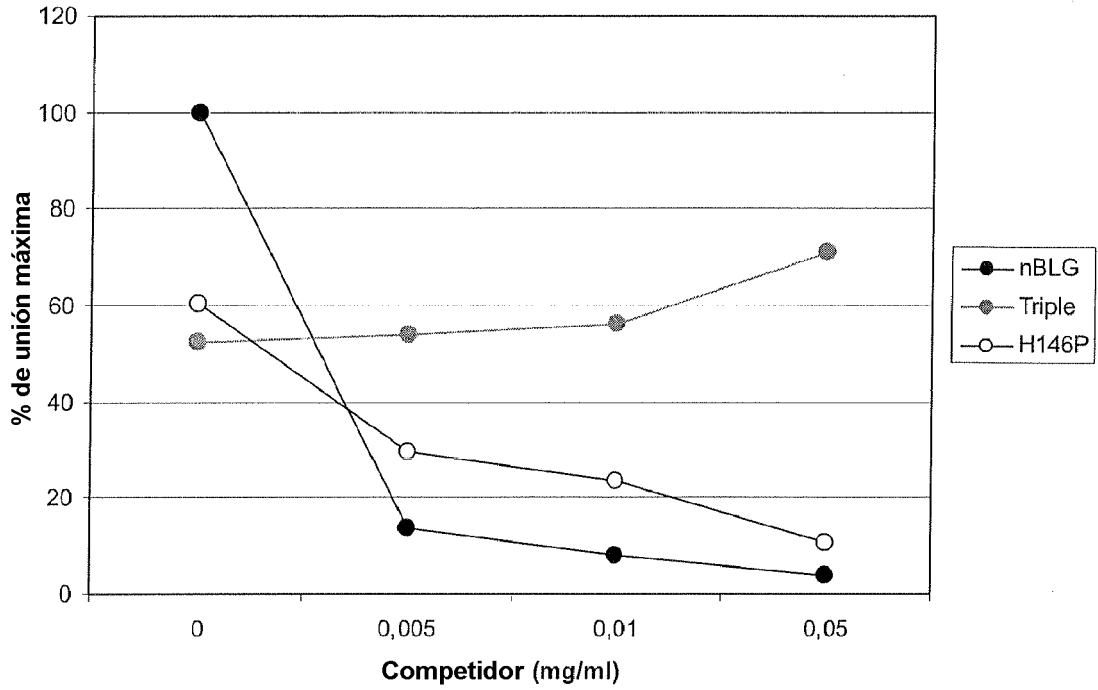
ptac: promotor.

SSpelB: secuencia señal de pectato liasa de *Erwinia carotovora*

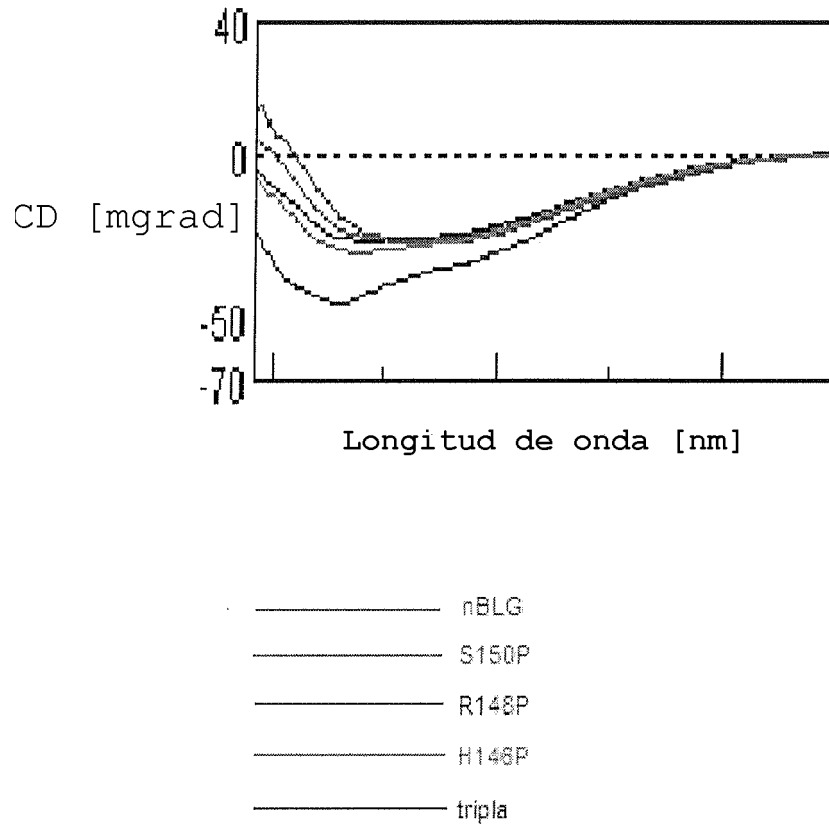
6 x His: etiqueta de hexahistidinilo C-terminal

TT: terminador de transcripción

**Figura 5**

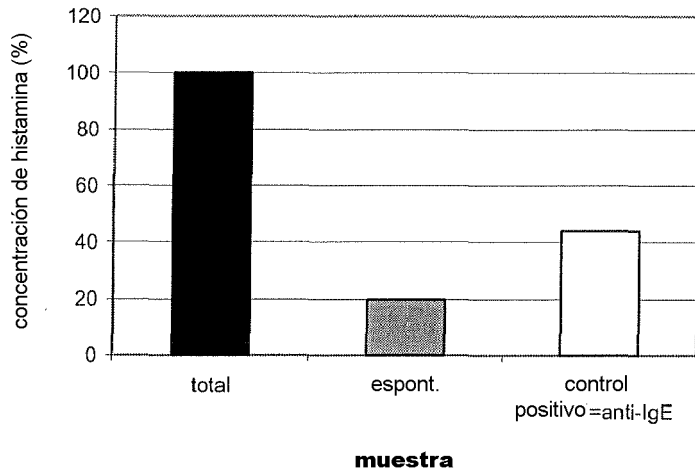


**Figura 6**



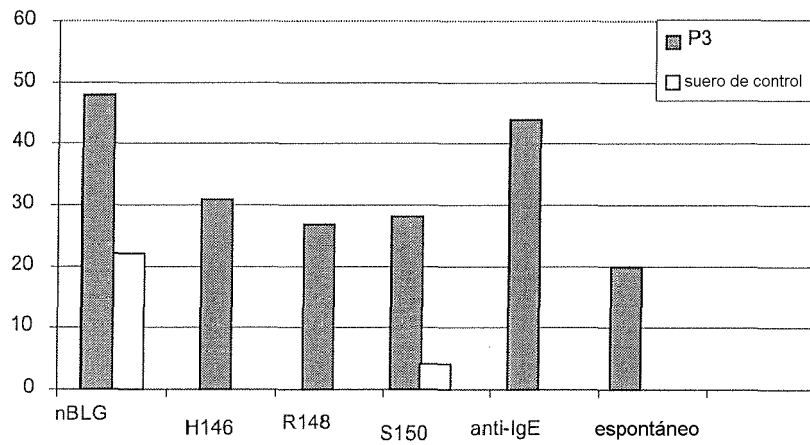
**Figura 7**

A.

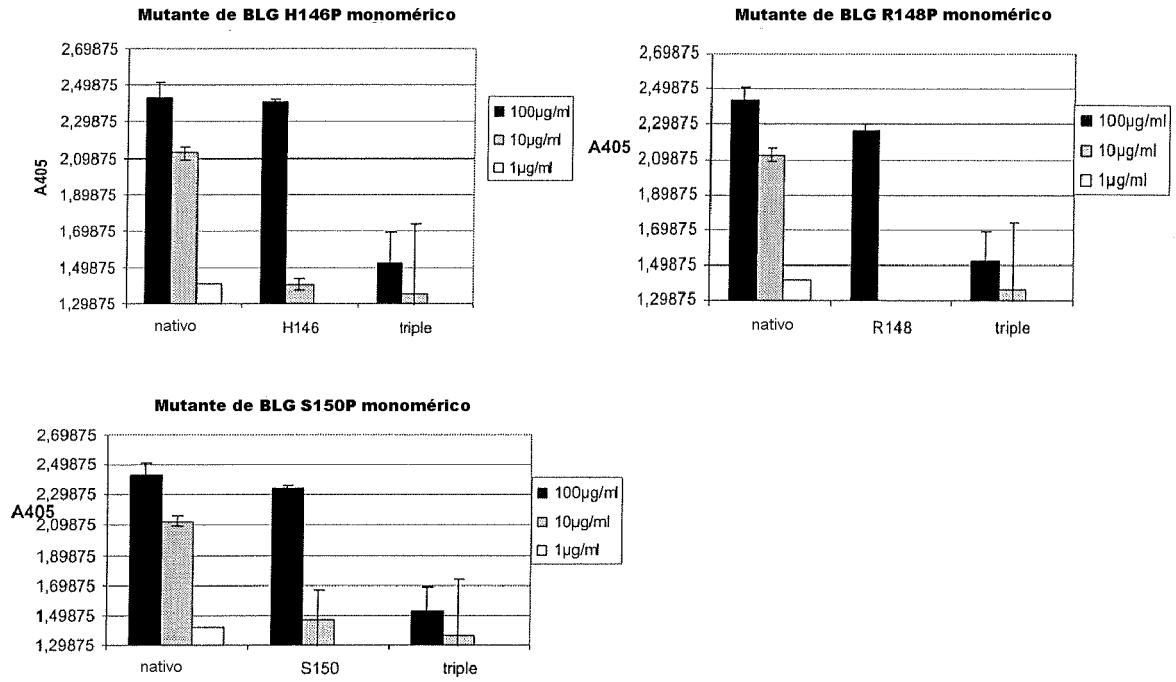


B.

% de la histamina total



**Figura 8**





**Figura 9**

