

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.05.06	(73) Titular(es): MERCK PATENT GMBH FRANKFURTER STRASSE 250 64293 DARMSTADT DE
(30) Prioridade(s): 2003.06.04 DE 10325508	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.03.01	
(45) Data e BPI da concessão: 2011.06.22 186/2011	(72) Inventor(es): HELMUT FIEBIG DE HELGA KAHLERT DE MARTIN WALD DE ANDREAS NANDY DE OLIVER CROMWELL DE
	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **DERIVADOS DO PHL P 5A COM UMA ALERGENICIDADE REDUZIDA E UMA REACTIVIDADE MANTIDA COM AS CÉLULAS T**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO É RELATIVA À PRODUÇÃO E À UTILIZAÇÃO DE VARIANTES DOS ALERGÉNIOS DO GRUPO 5 DA POIDEAE, CARACTERIZADAS POR UMA REDUZIDA REACTIVIDADE COM AS IGE EM COMPARAÇÃO COM OS ALERGÉNIOS CONHECIDOS DO TIPO SELVAGEM E, AO MESMO TEMPO, POR UMA REACTIVIDADE EM GRANDE MEDIDA MANTIDA COM OS LINFÓCITOS T. É POSSÍVEL UTILIZAR ESTAS VARIANTES HIPOALERGÉNICAS DE ALERGÉNIOS NA IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA (HIPOSENSIBILIZAÇÃO) DE DOENTES COM ALERGIA AO PÓLEN DAS GRAMÍNEAS OU NA IMUNOTERAPIA PREVENTIVA DE ALERGIAS AOS PÓLENES DAS GRAMÍNEAS.

RESUMO

"DERIVADOS DO PHL P 5A COM UMA ALERGENICIDADE REDUZIDA E UMA REACTIVIDADE MANTIDA COM AS CÉLULAS T"

A presente invenção é relativa à produção e à utilização de variantes dos alergénios do grupo 5 da *Pooideae*, caracterizadas por uma reduzida reactividade com as IgE em comparação com os alergénios conhecidos do tipo selvagem e, ao mesmo tempo, por uma reactividade em grande medida mantida com os linfócitos T. É possível utilizar estas variantes hipoalergénicas de alergénios na imunoterapia específica (hipossensibilização) de doentes com alergia ao pólen das gramíneas ou na imunoterapia preventiva de alergias aos pólenes das gramíneas.

DESCRIÇÃO

"DERIVADOS DO PHL P 5A COM UMA ALERGENICIDADE REDUZIDA E UMA REACTIVIDADE MANTIDA COM AS CÉLULAS T"

A presente invenção é relativa à produção e à utilização de variantes do alergénio principal Phl p 5a do pólen do rabo-de-gato (*Phleum pratense*), que apresentam uma menor reactividade com as IgE do que o alergénio conhecido do tipo selvagem, assim como uma reactividade em grande medida mantida com os linfócitos T, caracterizadas por uma região, que corresponde à região da sequência de aminoácidos 94 - 113 do Phl p 5a, ou as regiões que correspondem às regiões das sequências de aminoácidos 94 - 113 e 175 - 198 do Phl p 5a, faltar(em) comparativamente aos alergénios conhecidos do tipo selvagem.

É possível utilizar estas variantes de alergénios hipoalergénicas na imunoterapia específica (hipossensibilização) de doentes com alergia ao pólen das gramíneas, ou na imunoterapia preventiva das alergias ao pólen das gramíneas.

Antecedentes da invenção

As alergias do tipo 1 são significativas a nível mundial. Até 20% da população nos países industrializados padecem de problemas como rinite alérgica, conjuntivite e bronquite asmática. Estas alergias são provocadas pelos alergénios que se encontram no ar (aeroalergénios), libertados por fontes de diferentes origens, tais como pólenes das plantas, ácaros, cães ou gatos. Até 40% destes indivíduos alérgicos do tipo 1 mostram em torno uma reactividade IgE específica aos alergénios dos pólenes das gramíneas

(Freidhoff *et al.*, 1986, "J. Allergy Clin. Immunol." 78, 1.190-2.002).

No caso das substâncias que desencadeiam a alergia do tipo 1, estas serão proteínas, glicoproteínas ou polipéptidos. Estes alergénios reagem, após absorção através das mucosas, com as moléculas de IgE ligadas na superfície dos mastócitos das pessoas sensibilizadas. Se duas moléculas IgE forem interligas por um alergénio, isto levará à libertação de mediadores (por exemplo, histamina, prostaglandinas) e citocinas através das células efectoras e, com isso, aos respectivos sintomas clínicos.

Em função da frequência relativa com que as diferentes moléculas de alergénios reagem com os anticorpos IgE de indivíduos alérgicos, é feita a distinção entre alergénios principais e alergénios secundários.

No caso do rabo-de-gato (*Phleum pratense*), identificou-se até à data o Phl p 1 (Petersen *et al.*, 1993, "J. Allergy Clin. Immunol." 92: 789 - 796), o Phl p 5 (Matthiesen e Löwenstein, 1991, "Clin. Exp. Allergy" 21: 297 - 307; Petersen *et al.*, 1992, "Int. Arch. Allergy Immunol." 98: 105 - 109), o Phl p 6 (Petersen *et al.*, 1995, "Int. Arch. Allergy Immunol." 108, 49 - 54), o Phl p 2/3 (Dolecek *et al.*, 1993, FEBS 335 (3), 299 - 304), o Phl p 4 (Haavik *et al.*, 1985, "Int Arch. Allergy Appl. Immunol." 78: 260 - 268; Valenta *et al.*, 1992, "Int. Arch. Allergy Immunol." 97: 287 - 294, Fischer *et al.*, 1996, "J Allergy Clin. Immunol." 98: 189 - 198) e o Phl p 13 (Suck *et al.*, 2000, "Clin. Exp. Allergy" 30: 324 - 332; Suck *et al.*, 2000, "Clin. Exp. Allergy" 30: 1.395 - 1.402) como alergénios principais.

Os alergénios principais do rabo-de-gato (*Phleum pratense*) dominantes são o Phl p 1 e o Phl p 5, encontrando-se o Phl p 5 em duas formas, 5a e 5b, diferentes em termos da respectiva massa molecular, que são codificadas por genes independentes. As sequências de aminoácidos derivadas tanto do Phl p 5a como do Phl p 5b puderam ser determinadas por meio da técnica do ADN recombinante. O Phl p 5a é uma proteína de cerca de 32 kDa e reage com os anticorpos IgE de 85 - 90% dos indivíduos alérgicos ao pólen das gramíneas. O Phl p 5a existe numa série de variantes homólogas, que se distinguem entre si por mutações pontuais e que, provavelmente, correspondem a diferentes formas alélicas. Os pólenes das espécies de gramíneas aparentadas, como, por exemplo, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, entre outras, contêm alergénios que são homólogos do Phl p 5a e que são denominados em conjunto alergénios do grupo 5. A grande homologia estrutural destes alergénios do grupo 5 das variedades de gramíneas leva a uma correspondente elevada reactividade cruzada das moléculas com os anticorpos IgE dos indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas.

Uma preparação clássica para o tratamento terapêutico eficaz de alergias é representada pela hipossensibilização ou pela imunoterapia específica (Fiebig, 1995, "Allergo J." 4 (6): 336 - 339, Bousquet et al., 1998, "J. Allergy Clin. Immunol." 102 (4): 558 - 562). Neste caso, injecta-se por via subcutânea no doente extractos de alergénios naturais em doses crescentes. Em todo o caso, existe neste método o risco de reacções alérgicas ou até mesmo de choque anafilático. De modo a minimizar estes riscos, utiliza-se preparados inovadores na forma de alergóides. Trata-se neste caso de extractos de alergénios quimicamente modificados, que apresentam uma reactividade com as IgE

claramente reduzida, mas contudo uma reactividade idêntica com as células T, em comparação com o extracto não manipulado (Fiebig, 1995, "Allergo J." 4 (7): 377 - 382).

Outra grande optimização terapêutica seria possível com alergénios produzidos de forma recombinante. Determinados cocktails, eventualmente personalizados para corresponder ao modelo de sensibilização individual do doente, de alergénios altamente puros produzidos de forma recombinante poderiam libertar extractos de fontes naturais de alergénios, visto estes conterem, além dos diversos alergénios, um grande número de coproteínas imunogénicas mas não alergénicas.

Perspectivas realísticas de se conseguir uma hipossensibilização segura com produtos de expressão recombinantes são possíveis com alergénios recombinantes que sofreram mutação de forma dirigida, nos quais são delectados de forma específica os epítomos IgE, sem afectar os epítomos das células T essenciais à terapia (Schramm *et al.*, 1999, "J. Immunol." 162: 2.406 - 2.414).

Outra possibilidade de influenciar em termos terapêuticos o equilíbrio afectado das células auxiliares T nos indivíduos alérgicos consiste no tratamento com ADN capaz de expressão, que codifique os alergénios relevantes (vacinação imunoterapêutica com ADN). A primeira prova experimental da influência específica de alergénios na resposta imunitária por uma vacina de ADN deste tipo foi apresentada em roedores, através da injeção de ADN que codifica alergénios (Hsu *et al.*, 1996, "Nature Medicine" 2 (5): 540 - 544).

O objectivo na base da presente invenção consistiu então na preparação de novas variantes do alergénio do grupo 5 Phl p 5a ao nível proteico e do ADN, que, mantendo em grande medida a reactividade com as células T, se distinguissem por uma reduzida actividade com as IgE e, por isso, se adequassem à imunoterapia específica e à vacinação imunoterapêutica com ADN.

Figuras

Figura 1: Alinhamento de regiões relevantes de sequências de ADNc homólogas do Phl p 5a de espécies da *Pooideae*: *Lolium perenne* (Lol p), *Poa pratensis* (Poa p) *Triticum aestivum* (Tri a) e *Hordeum vulgare* (Hor v)

Numeração: posições dos nucleótidos das inserções de ADN

Sequências dos Phl p 5a, Poa p 5 e Lol p 5: sequências de ADNc da base de dados "GenBank" do National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, EUA

As sequências Hor v e Tri a: sequências EST da base de dados EST do Institute for Genomic Research (TIGR), Rockville, EUA

Moldura preta: identidade da sequência em relação ao Phl p 5a (em relação ao GenBank AJ555152)

Moldura a ponteadado: deleção correspondendo aos aminoácidos 94 - 113 (em relação ao GenBank Aj555152)

Moldura a tracejado: deleção correspondendo aos aminoácidos 175 - 198 (em relação ao GenBank AJ555152)

Figura 2: Alinhamento de sequências de aminoácidos homólogas do Phl p 5a (regiões relevantes das sequências, derivadas de sequências de ADN) de espécies da *Pooideae*: *Lolium perenne* (Lol p), *Poa pratensis* (Poa p) *Triticum aestivum* (Tri a) e *Hordeum vulgare* (Hor v)

Numeração: posições dos nucleótidos das inserções de ADN

Sequências dos Phl p 5a, Poa p 5 e Lol p 5: sequências de ADNc da base de dados "GenBank" do National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, EUA

As sequências Hor v e Tri a: sequências EST da base de dados EST do Institute for Genomic Research (TIGR), Rockville, EUA

Moldura a preto: identidade da sequência em relação ao Phl p 5a (em relação ao GenBank AJ555152)

Moldura a ponteadado: deleção correspondendo aos aminoácidos 94 - 113 (em relação ao GenBank AJ555152)

Moldura a tracejado: deleção correspondendo aos aminoácidos 175 - 198 (em relação ao GenBank AJ555152)

Figura 3: SDS-PAGE de mutantes de deleção purificados na forma de proteínas de fusão histidina

- 1) Marcador
- 2) rPhl p 5a wt (His)
- 3) Phl p 5a DM-D94 - 113 (His)
- 4) Phl p 5a DM-D94 - 113, 175 - 198 (His)
- 5) Phl p 5a DM-D175 - 198 (His)
- 6) Marcador

Figura 4: SDS-PAGE das proteínas de não fusão purificadas Phl p 5a DM-D94 - 113, 175 - 198 e rPhl p 5a wt (em cima) e teste de identidade com anticorpos aPhl p 5 (em baixo)

O aPhl p 5 mAb alfa-1D11 liga a região 175 - 198 (apenas o rPhl p 5a wt é positivo)

O aPhl p 5a mAb alfa-3B2 liga um epítipo comum às duas moléculas Phl p 5a (as duas proteínas positivas)

(mAb: anticorpo monoclonal)

Figura 5: SEC analítica do mutante de deleção Phl p 5a DM-D94 - 113, 175 - 198 e do tipo selvagem do Phl p 5a recombinante (proteínas de não fusão purificadas)

Coluna: Superdex 75 HR10/30 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)

Agente de controlo da fluidez: PBS

Seta: volume excluído

Figura 6: Focagem isoeléctrica não desnaturante do mutante de deleção Phl p 5a DM-D94 - 113, 175 - 198 e do tipo selvagem do Phl p 5a recombinante (proteínas de não fusão purificadas)

1) marcador IEF

2) rPhl p 5a wt

3) Phl p 5a DM-D94 - 113, 175 - 198

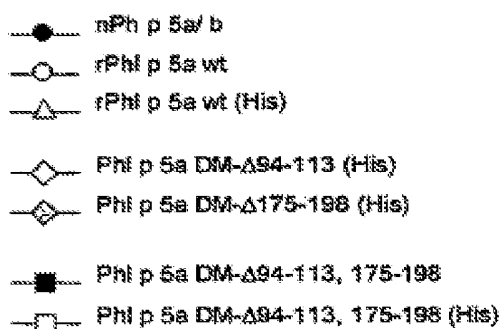
pI rPhl p 5a wt = 8.7

pI rPhl p 5a DM-D94 - 113, 175 - 198 = 6.4

Figura 7: Teste das tiras para testar a capacidade de ligação a IgE dos mutantes de deleção Phl p 5a (não desnaturante)

P: Soros de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas clinicamente definidos

Figura 8: Detecção da reduzida reactividade com as IgE dos mutantes de deleção Phl p 5a, por meio do teste de inibição EAST com dois soros individuais representativos (a e b) e um *pool* de soros (c)



P: Soros de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas clinicamente definidos

Figura 9: Detecção da hipoalergenicidade do mutante de deleção, do Phl p 5a, Phl p 5a DM-D94 - 113, 175 - 198 por meio do teste de activação de basófilos com os basófilos de seis indivíduos diferentes alérgicos aos pólenes das gramíneas (P)

Descrição detalhada da invenção

Mutagénes e clonagem de sequências de ADNc

O ponto de partida para as variantes do Phl p 5a hipoalergénicas - particularmente preferidas de acordo com a invenção - é o ADNc de uma isoforma do tipo selvagem do Phl p 5a, que foi isolado com *primers* (iniciadores) específicos através da reacção em cadeia de polimerase (PCR) a partir do ADNc total dos pólenes do rabo-de-gato (*Phleum pratense*) (NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EUA) número do GenBank AJ555152) (SEQ ID NO 1). A partir da sequência de ADNc, foi possível derivar a sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO 2. O Phl p 5a, composto por 284 aminoácidos, foi expresso em *E. coli* a nível citosólico como proteína solúvel e, em seguida, purificado. Esta forma do tipo selvagem recombinante do Phl p 5a (rPhl p 5a wt) reage com os anticorpos anti-Phl p 5 monoclonais e com os anticorpos IgE dos indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas, que apresentavam uma reactividade com o Phl p 5a natural purificado (nPhl p 5a).

A partir do ADNc descrito do rPhl p 5a wt, produziu-se uma série de diferentes variantes de deleção (mutantes de deleção) através de processos de restrição/de ligação e PCR, e fez-se a sua ligação ao vector de expressão pProExHTa (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Delectou-se secções

com um comprimento de 6 a 72 bp, distribuídas ao longo de toda a sequência da molécula de ADNc, tendo-se assim induzido as respectivas deleções nas cadeias polipeptídicas das proteínas expressas em *E. coli*.

Estudou-se as variantes de deleção do Phl p 5a por meio de *Immunoblotting*, relativamente à sua capacidade de ligação aos anticorpos IgE de um *pool* de soros representativo de indivíduos alérgicos ao pólen das gramíneas.

Neste processo, descobriu-se de forma surpreendente duas variantes de deleção do Phl p 5a (a Phl p 5a DM-Δ94 - 113, deleção dos aminoácidos 94 - 113, e a Phl p 5a DM-Δ175 - 198, deleção dos aminoácidos 175 - 198 do rPhl p 5a wt), que apresentam uma reduzida ligação aos anticorpos IgE (*pool* de soros representativo).

Estas duas deleções do Phl p 5a serviram de ponto de partida para a construção de um mutante de deleção duplo, que contém as duas deleções activas (o Phl p 5a DM-Δ94 - 113, 175 - 198).

A construção por engenharia genética dos Phl p 5a DM-Δ94 - 113, Phl p 5a DM-Δ175 - 198 e Phl p 5a DM-Δ94 - 113, 175 - 198, e a sua caracterização bioquímica e imunológica encontram-se seguidamente descritas.

Na construção da variante de deleção Phl p 5a DM-Δ94 - 113 (a SEQ ID NO 3, sequência do ADNc (795 bp), e a SEQ ID NO 4, sequência de aminoácidos (264 aa)) produziu-se primeiro dois fragmentos a partir do ADNc do rPhl p 5a wt. O fragmento "F1-93", que codifica os aminoácidos 1 - 93 do rPhl p 5a wt, foi produzido por PCR com os *primers* 1 e 5, e o fragmento "F114-284" com os *primers* 4 e 6 (relativamente

às sequências dos *primers*, ver a Tab. 1). Utilizou-se os fragmentos "F1-93" e "F114-284" noutra PCR, utilizando os *primers* 1 e 4 como matriz, o que resultou na amplificação de todo o ADNc que codifica a variante de deleção Phl p 5a DM-Δ94 - 113. A base da ligação dos fragmentos "F1-93" e "F114-284" por PCR foi um dos dois fragmentos da região comum da sequência. Esta região da sequência foi originada pela amplificação do fragmento "F114-284" por PCR, por meio de um oligonucleótido *sense* particular, que continha na região 5' uma sequência adicional de ADN codificadora dos aminoácidos 88 - 93 (Tab. 1).

A sequência de ADNc que codifica a variante de deleção Phl p 5a DM-Δ175 - 198 (a SEQ ID NO 5, sequência de ADNc (783 bp), e a SEQ ID NO 6, sequência de aminoácidos (260 aa)) foi gerada por restrição e posterior ligação de dois fragmentos de ADNc produzidos em separado. Produziu-se o fragmento 5'-terminal "F1-174" com os *primers* 1 e 2 e o fragmento 3'-terminal "F199-284" com os *primers* 3 e 4 através de PCR. Digeriu-se os fragmentos de ADNc com a enzima de restrição SpeI e fez-se depois a sua ligação (ver a Tab. 1). Replicou-se o produto de ligação mediante a utilização dos *primers* 1 e 4 através de PCR.

O ADNc da variante de deleção Phl p 5a DM-Δ94 - 113, 175 - 198 (a SEQ ID NO 7, sequência de ADNc (723 bp), e a SEQ ID NO 8, sequência de aminoácidos (240 aa)) também foi produzido a partir de dois fragmentos de ADNc. Gerou-se o fragmento 5'-terminal com os *primers* 1 e 5 e com o ADNc do rPhl p 5a wt como matriz, e o fragmento 3'-terminal com os *primers* 4 e 6 com o ADNc do Phl p 5a DM-Δ175 - 198 como matriz. Através da região comum da sequência correspondendo aos aminoácidos 88 - 93 da proteína rPhl p 5a wt, ligou-se

os fragmentos por meio de uma terceira PCR aos *primers* 1 e 4, e amplificou-se o produto.

Os ADNc que codificam os alergénios modificados foram ligados através das interfaces de restrição *EheI* e *HindIII* no vector de expressão pProExHT (Invitrogen, Carlsbad, EUA), e em seguida totalmente sequenciados.

A reactividade cruzada imunológica dos alergénios do grupo 5 da *Pooideae*, como, por exemplo, *Poa pratensis* e *Lolium perenne*, tem por base uma sequência de aminoácidos muito semelhante. Assume-se que os respectivos genes tenham origem num gene progenitor comum. Tanto no caso das sequências das deleções $\Delta 94 - 113$ e $\Delta 175 - 198$ da sequência proteica do Phl p 5a wt (referência: GenBank AJ555152) como das regiões de flanco da sequência existem regiões homólogas da sequência nos alergénios do grupo 5 da *Pooideae*. A grande homologia das regiões em questão da sequência é detectável tanto ao nível da sequência de ADN como da sequência de aminoácidos (Fig. 1 e Fig. 2).

Tabela 1: Disposição dos *primers* da PCR utilizados na produção das variantes de deleção

Primer	SEQ ID NO	Sentido	Sequência (5'→3')
1	9	sense	gcc gat cta ggc tac ggc ccg gcc
2	10	antisense	aac ata <u>act agt</u> ggc agc gac ctt gaa ggc ggc gtc
3	11	sense	atc ta <u>act agt</u> acg ggc ggc gcc tac gaga
4	12	antisense	aac ata aag ctt tca gac ttt gta gcc acc agt
5	13	antisense	gga gct gga ttc ggc ggc gcc ctt ggg
6	14	sense	gcc gcc gaa tcc agc tcc ggc ggc acg cct gag gcc aag tac gac

Os pontos de restrição *SpeI* estão identificados a sublinhado

Expressão e purificação de moléculas Phl p 5a recombinantes

A expressão das proteínas recombinantes ocorreu na forma de proteínas de fusão histidina com um ponto de clivagem de protease integrado (vector de expressão pProExHT; Invitrogen, Carlsbad, EUA), com vista à clivagem opcional da parte de fusão histidina (His) na *Escherichia coli* (estirpe JM109). O rPhl p5a wt e os mutantes de deleção foram primeiro purificados pela ligação específica dos radicais histidina N-terminais numa matriz de quelato de Ni²⁺ (*Immobilized-Metal-Ion-Affinity Chromatography*), IMAC) e, em seguida, por filtração em gel preparativa (*Size-Exclusion Chromatography*, SEC). A pureza das proteínas eluídas foi controlada por SDS-PAGE e SEC analítica. Os resultados mostraram que o rPhl p 5a wt (His), o Phl p 5a DM-Δ94 - 113 (His); o Phl p 5a DM-Δ175 - 198 (His) e o Phl p 5a DM-Δ94 - 113, 175 - 198 (His) puderam ser preparados com uma maior pureza e de forma monomérica (Fig. 3). A identidade das proteínas foi detectada por anticorpos monoclonais específicos do Phl p 5a.

Realizou-se o teste da reactividade com as IgE por meio de tecnologias de ligação a IgE (*Immunoblotting*, teste das tiras, teste de inibição EAST e teste de activação de basófilos) e estudou-se ainda a reactividade com as células T, com as substâncias de teste sem a parte de fusão histidina.

Neste intuito, produziu-se as variantes de deleção em paralelo com a proteína comparativa rPhl p 5a wt primeiro como proteínas de fusão. Em seguida, clivou-se porém a parte de fusão histidina de forma enzimática (TEV-Protease, Invitrogen, Carlsbad, EUA), ficando somente uma glicina como resto da sequência de clivagem de protease na

terminação N da proteína alvo. Tanto a parte histidina clivada como a protease utilizada na clivagem foram completamente separadas por IMAC. Após uma SEC preparativa, testou-se a pureza e a conformação das proteínas eluídas por meio de SDS-PAGE e SEC analítica, como representado para o rPhl p 5a wt e o mutante Phl p 5a DM- Δ 94 - 113, 175 - 198 nas Figuras 4 ou 5. Preparou-se todas as proteínas de forma pura e monomérica. Um estudo realizado por focagem isoelétrica não desnaturante (IEF) das proteínas de não fusão mostrou sempre uma grande homogeneidade em termos da carga de superfície (ver a Fig. 6, por exemplo, para o Phl p 5a DM- Δ 94 - 113, 175 - 198).

Detectou-se a identidade das proteínas recombinantes através dos anticorpos anti-Phl p 5 monoclonais (Allergopharma, Reinbek, Alemanha) alfa-1D11 ou alfa-3B2 (ver a Fig. 4, por exemplo, para o Phl p 5a DM- Δ 94 - 113, 175 - 198) e do sequenciamento N-terminal.

Deteção da reduzida ligação às IgE das variantes de deleção do Phl p 5a

Um método de teste simples para determinar a reactividade das moléculas alergénicas com as IgE consiste no estudo da ligação específica às IgE a partir de soros de indivíduos alérgicos a proteínas de teste de ligação a membrana, através do teste das tiras.

Neste intuito, liga-se as substâncias de teste, com a mesma concentração e a mesma quantidade, lado a lado numa tira de membrana de nitrocelulose sob condições não desnaturantes. Uma série destas tiras de membrana pode ser incubada em paralelo com diferentes soros de indivíduos alérgicos. Após uma etapa de lavagem, os anticorpos IgE ligados de forma específica ficam visíveis na membrana através de uma

reacção de coloração, permitida por um conjugado de anti-hIgE/fosfatase alcalina.

A reactividade com as IgE por parte das proteínas recombinantes Phl p 5a wt (His), Phl p 5a DM- Δ 94 - 113 (His), Phl p 5a DM- Δ 175 - 198 (His) e Phl p 5a DM- Δ 94 - 113, 175 - 198 (His) foi estudada de forma comparativa no teste das tiras, recorrendo a 43 soros individuais de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas (Fig. 7).

Todos os 43 soros de indivíduos alérgicos continham os anticorpos IgE específicos do Phl p 5a, que reagiram fortemente com o Phl p 5a natural (nPhl p 5a, não mostrado aqui) e com o equivalente recombinante rPhl p 5a wt (His).

De forma surpreendente, tornou-se claro que os anticorpos IgE específicos do Phl p 5a de todos os 43 soros de indivíduos alérgicos não se ligam, ou apenas de forma muitíssimo reduzida, à variante de deleção Phl p 5a DM- Δ 94 - 113, 175 - 198 (His). A reduzida ligação às IgE deve-se tanto à deleção Δ 94 - 113 como à deleção Δ 175 - 198. A variante de deleção Phl p 5a DM- Δ 175 - 198 (His) mostra neste teste, em 35 dos 43 soros de indivíduos alérgicos, uma reduzida capacidade de ligação às IgE facilmente reconhecível. Em alguns testes, a influência da deleção dos aminoácidos 175 - 198 era tão grande, que se impediu quase totalmente a ligação às IgE (Ex.: P3, P20, P28)

A influência da deleção Δ 94 - 113 na reactividade de ligação às IgE é menos fortemente vincada, mas do mesmo modo claramente visível. A variante de deleção Phl p 5a DM- Δ 94 - 113 (His) foi ligada de forma claramente mais fraca pela IgE de 19 dos 43 soros de indivíduos alérgicos do que a referência rPhl p 5a wt (His) (Ex.: P31, P37,

P42). Em todo o caso, a redução da ligação às IgE foi em muitos testes individuais menos drasticamente vincada do que a redução provocada pelo Δ 175 - 198.

Assim, torna-se claro que as duas deleções contribuem para a redução de toda a reactividade de ligação às IgE do mutante de deleção Phl p 5a DM- Δ 94 - 113, 175 - 198 (His).

Ao contrário do teste das tiras, é possível testar, com o teste de inibição East (*Enzyme Allergosorbent Test*), as interacções de alérgénios/IgE em solução, podendo-se em princípio excluir um mascarar prejudicial dos epítomos da substância de teste através da imobilização na membrana. Realiza-se o teste de inibição EAST como se segue. Reveste-se placas de microtítulo com alérgénios, neste caso o Phl p 5 natural (nPhl p 5a/b, mistura do Phl p 5a e do Phl p 5b). Após remoção das moléculas de alérgénios não ligadas, através de lavagem, bloqueia-se a placa para impedir ligações posteriores não específicas, com albumina de soro bovino. Incuba-se os anticorpos IgE de indivíduos alérgicos, como *pool* representativo de soros individuais (*pool* de soros) ou como soro individual, com uma diluição apropriada com as placas de microtítulo revestidas com alérgénios. Quantifica-se por fotometria a quantidade dos anticorpos IgE ligados a alérgénios através de uma enzima ligada a dois anticorpos (conjugado de anti-hIgE/fosfatase alcalina), através da transformação de um substrato num produto final corado. Inibe-se com especificidade em termos de substância a ligação dos anticorpos IgE através de um alérgénio solúvel ou da substância a ser testada (alérgénio modificado recombinante) em função da concentração. As substâncias imunoquimicamente idênticas mostram curvas de inibição idênticas.

Como moléculas de referência, fez-se uso neste trabalho do nPhl p 5, do rPhl p 5a wt e da proteína de fusão histidina rPhl p 5a wt (His). A par de outras moléculas, estudou-se a ligação a IgE das proteínas de fusão histidina Phl p 5a DM- Δ 94 - 113 (His), Phl p 5a DM- Δ 175 - 198 (His) e Phl p 5a DM- Δ 94 - 113, 175 - 198 (His), assim como da proteína de não fusão Phl p 5a DM Δ 94 - 113, 175 - 198 em comparação com estas referências.

Na Figura 8 a - c, encontram-se representadas as curvas de inibição específicas de substâncias de teste, obtidas com dois soros individuais e um *pool* de soros de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas. O nPhl p 5a/b mostrou em todos os testes o efeito de inibição mais forte (cerca de 80 - 95% de efeito de inibição com uma concentração de 10 μ g/mL). O efeito de inibição do rPhl p 5a era, com 70 - 80% de inibição máxima, claramente menor. Este efeito é originado pela composição do nPhl p 5a/b, que contém, a par da isoforma Phl p 5a, também a isoforma Phl p 5b. Os anticorpos IgE específicos contra o Phl p 5b não conseguem ser inibidos pelo rPhl p 5a wt.

A parte de fusão histidina não mostrou qualquer influência na ligação às IgE. Isto torna-se claro pelas curvas de inibição idênticas do rPhl p 5a wt (His) e do rPhl p 5a wt em todos os testes. Assim, mostra-se a aplicabilidade dos testes com as proteínas de fusão histidina.

Em geral, foi possível fazer a distinção entre dois grupos de soros de doentes em termos da ligação IgE qualitativa.

O primeiro grupo é representado pelo soro individual P15 (Fig. 8 a). Estes soros de indivíduos alérgicos continham anticorpos IgE, cuja ligação ao Phl p 5a foi impedida pelas

duas deleções, $\Delta 94 - 113$ e $\Delta 175 - 198$. O mutante de deleção Phl p 5a DM- $\Delta 94 - 113$ (His) mostrou aqui um efeito de inibição máximo apenas de cerca de 50% e o mutante de deleção Phl p 5a DM- $175 - 198$ (His) mostrou um efeito de inibição de apenas 20 - 30%.

O mutante de deleção duplo Phl p 5a DM- $\Delta 94 - 113, 175 - 198$ (His) foi capaz de inibir a ligação dos anticorpos IgE, com a concentração máxima utilizada, até mesmo apenas em 0 - 10%. A utilização da proteína de não fusão Phl p 5a DM- $\Delta 94 - 113, 175 - 198$ confirmou este resultado (0 - 10% de inibição de IgE máxima).

O segundo grupo de soros de indivíduos alérgicos, representado pelo soro individual P44 (Fig. 8 b), distingue-se do primeiro grupo por os anticorpos IgE contidos nos soros terem reagido tão bem com o Phl p 5a DM- $\Delta 94 - 113$ (His) como com a referência rPhl p 5a wt (His) (70 - 80% de inibição máxima), enquanto nenhuma, ou nenhuma quantidade detectáveis, dos anticorpos IgE reagiram com o Phl p 5a DM- $\Delta 175 - 198$ (His) (0 - 10% de valor de inibição máximo).

Do mesmo modo, o mutante de deleção duplo Phl p 5a DM- $\Delta 94 - 113, 175 - 198$ mostrou, com este grupo de soros de indivíduos alérgicos, uma inibição fortemente reduzida (0 - 10%), o que foi possível mostrar tanto para a proteína de fusão como para a proteína livre da parte de fusão.

Os soros destes indivíduos alérgicos continham claramente anticorpos IgE dirigidos sobretudo contra os epítomos da parte C-terminal da molécula.

Os dados de medição da reactividade de ligação IgE dos anticorpos IgE de um *pool* de soros de 20 indivíduos alérgicos salientam a importância das deleções $\Delta 94 - 113$ e $\Delta 175 - 198$ para a redução da ligação do Phl p 5a às IgE (Fig. 8 c). Os dois mutantes individuais de deleção, o Phl p 5a DM- $\Delta 94 - 113$ (His) e o Phl p 5a DM- $\Delta 175 - 198$ (His) mostram, com 40 - 50% ou cerca de 30%, um efeito de inibição máximo mais baixo do que o rPhl p 5a wt (cerca de 70%). O mutante de deleção duplo Phl p 5a DM- $\Delta 94 - 113, 175 - 198$ foi ligado apenas de forma muito fraca (10 - 15% de valor de inibição máximo) pelos anticorpos IgE do *pool* de soros, o que aponta, de forma concordante com o teste de 43 indivíduos alérgicos no teste das tiras, para uma reactividade de ligação IgE fortemente reduzida por parte desta variante do Phl p 5a no caso de muitos, se não mesmo de todos, dos indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas.

Deteção da hipoalergenicidade dos mutantes de deleção através do teste de activação de basófilos

Através de um teste de activação de basófilos, estudou-se os efeitos da reduzida capacidade de ligação às IgE dos mutantes de deleção, relativamente ao efeito funcional na ligação à IgE, ligada a membrana, das células efectoras e na sua activação. Deste modo, mediu-se a redução funcional da alergenicidade com um teste *in vitro* sensível.

Com vista ao teste de activação de basófilos, incubou-se sangue completo heparinizado de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas com diferentes concentrações das substâncias de teste. Neste caso, substâncias alergénicas conseguem ligar anticorpos IgE específicos, que se associam com os receptores IgE de grande afinidade dos granulócitos basófilos.

A interligação desencadeada pelas moléculas de alergénios dos complexos de IgE/receptores leva a uma transdução de sinal, o que resulta na desgranulação das células efectoras e, com isso, no desencadear das reacções alérgicas *in vivo*.

In vitro, é possível detectar a activação induzida por alergénios de imunócitos basófilos, por meio de quantificação da expressão de uma proteína de superfície (CD203c) ligada à transdução de sinal da interligação de IgE-receptores (Kahlert *et al.*, "Clinical Immunology and Allergy in Medicine Proceedings of the EAACI 2002 (2003) Nápoles, Itália 739 - 744). O número das proteínas de superfície expressas numa célula e o valor percentual das células activadas de um *pool* de células são medidos com grande sensibilidade, através da ligação de um anticorpo monoclonal marcado com fluorescência à proteína de superfície, e da posterior análise por citometria de fluxo activada por fluorescência.

Como substâncias de referência, utilizou-se neste caso tanto o Phl p 5a natural (nPhl p 5a) purificado, como o rPhl p5a wt, a par das substâncias de teste.

Os resultados do teste do mutante de deleção duplo Phl p 5a DM $\Delta 94 - 113, 175 - 198$ com basófilos de seis sujeitos encontram-se representados na Figura 9 na forma de curvas. Os resultados do teste com basófilos de, ao todo, 10 indivíduos alérgicos clinicamente definidos encontram-se reunidos na Tabela 2. Os valores A50 (A50: concentração de alergénios no caso de 50% de número máximo de basófilos activados) das moléculas de referência encontravam-se, com uma variação individual, entre $\sim 1,3 - 15$ pM para o rPhl p 5a wt e $\sim 0,3 - 10$ pM para o nPhl p 5a (Tab. 2). Em

contrapartida, os valores A50 da variante de deleção Phl p 5a DM Δ 94 - 113, 175 - 198 encontravam-se entre ~18 - 8.400 pM.

A partir dos valores A50 determinados das três substâncias utilizadas foi possível determinar a eficácia alergénica da variante de deleção Phl p 5a DM Δ 94 - 113, 175 - 198, em comparação com as moléculas de referência não modificadas nPhl p 5a e rPhl p5a wt em cada sujeito (Tab. 2).

A eficácia alergénica relativa (*Pr*, *Relative Potency* = potência relativa) da variante de deleção Phl p 5a DM Δ 94 - 113, 175 - 198 era entre ~12 - 5.000 vezes menor do que a da referência rPhl p 5a wt, ou ~16 - 32.000 vezes menor do que a da referência nPhl p 5a (Tab. 2).

Tabela 2: Detecção da hipoalergenicidade do mutante de deleção Phl p 5a DM- Δ 94 - 113, 175 - 198 por meio do teste de activação de basófilos

	Substância de teste A ₅₀ [pM] ^a			Valor Pr ^b Phl p 5a DM- Δ 94-113, 175-198	Valor Pr ^b Phl p 5a DM- Δ 94-113, 175-198
Dador ^c	nPhl p 5a	rPhl p 5a wt	Phl p 5a DM- Δ 94-113, 175-198	Relativo ao rPhl p 5a wt ^d	Relativo ao nPhl p 5a ^e
P13	4,08	5,34	477,2	0,0111	0,0085
P17	6,44	2,68	466,6	0,0057	0,0137
P20	0,26	1,68	8.433,0	0,0002 ^f	0,00003 ^f
P23	1,02	1,26	39,2	0,0321	0,0260
P24	1,22	2,57	58,1	0,0442	0,0209
P28	9,43	11,35	198,2	0,0573	0,0476
P29	1,77	2,34	33,7	0,0694	0,0525
P31	10,15	14,66	3.967,0	0,0037	0,0026
P34	3,48	2,54	165,1	0,0153	0,0211

P40	1,08	1,45	17,5	0,0829	0,0617
-----	------	------	------	---------------	---------------

^a Concentração de alérgenos no caso de 50% de número máximo de basófilos activados

^b Potência relativa

^c Indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas definidos clinicamente

^d Calculado de A50 rPhl p 5a wt/A50 Phl p 5a DM-Δ94 - 113, 175 - 198

^e Calculado de A50 nPhl p 5a/A50 Phl p 5a DM-Δ94 - 113, 175 - 198

^f A negrito: valores mínimos e máximos

Reactividade com as células T

Os linfócitos auxiliares T reagem com os fragmentos peptídicos dos alérgenos (cerca de 12 - 25 aminoácidos), que surgem por degradação enzimática em células apresentadoras de antígeno (APC), e que, após inclusão dos péptidos apropriados nas moléculas individuais do MHC classe II, são apresentados na superfície das APC às células T. Esta activação específica de alérgenos dos linfócitos auxiliares T é a condição prévia para as reacções seguintes (proliferação, anergia, apoptose) e para a diferenciação funcional (TH1 e TH2). A influência dos linfócitos T específicos de alérgenos, através do tratamento com um alérgeno ou com uma variante de alérgeno, na hipossensibilização é considerada chave na eficácia terapêutica.

Para estudar a reactividade com as células T, estabelece-se linhas de células T oligoclonais (TCL) de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas, mediante estimulação com moléculas nPhl p 5 ou rPhl p 5 por processos usuais.

Num teste de proliferação, estimulou-se as diferentes linhas das células T com os alérgenos de referência nPhl p5a e rPhl p5a wt, e o mutante de deleção duplo Phl p 5a DM Δ94 - 113, 175 - 198. Determinou-se a taxa de proliferação por inserção de [³H]-timidina pelos processos usuais.

Tabela 3: Detecção da reactividade com as células T do mutante de deleção Phl p 5a DM-Δ94 - 113, 175 - 198, por meio do teste de proliferação com linhas de células T (TCL) específicas do Phl p 5

Dador ^b	TCL	Índice de estimulação ^a		
		nPhl p 5a	rPhl p 5a wt	Phl p 5a DM-Δ94 - 113, 175 - 198
A	3.2	9, 8	4, 9	4, 4
B	8.2	21, 0	15, 5	13, 3
C	11.2	5, 2	4, 7	7, 2
C	11.3	3, 3	2, 9	3, 5
C	11.43	3, 0	3, 9	2, 6
D	19.1	6, 5	4, 7	7, 5
D	19.2	9, 6	3, 3	2, 6
E	23.22	21, 8	29, 0	20, 8
E	23.50	7, 5	8, 4	6, 6
F	89.23	1, 8	3, 5	1, 8

^a Calculado de valores de medição [³H]. Valores de medição cpm de culturas de células estimuladas com alergénios/valores de medição cpm de culturas de células não estimuladas

^b Dador: indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas clinicamente definidos

Os resultados com dez TCL de seis indivíduos alérgicos mostram que estas TCL foram estimuladas pelo Phl p 5a DM Δ94 - 113, 175 - 198 com uma força equiparável, em termos de proliferação, à do alergénio do tipo selvagem não alterado natural ou recombinante (Tab. 3).

Por conseguinte, a presente invenção tem por objecto variantes do alergénio do grupo 5 Phl p 5a, caracterizadas por uma reduzida reactividade com as IgE em comparação com os alergénios do tipo selvagem conhecidos, e por uma reactividade mantida com os linfócitos T.

Visto que se verificou ser particularmente favorável no âmbito da invenção quando faltam ou são removidas as regiões da sequência de aminoácidos do Phl p 5a, que correspondem às regiões da sequência de aminoácidos 94 - 113 e 175 - 198, constituem em particular objecto da presente invenção as variantes de alergénio em que falta unicamente a região primeiro referida ou em que faltam as duas regiões referidas, sendo dada total preferência a esta última forma de execução.

Devido às grandes homologias das sequências nos alergénios do grupo 5 da *Pooideae*, é possível identificar estas regiões univocamente em alinhamentos sequenciais da sequência do Phl p 5a com sequências de outros alergénios do grupo 5. As variantes de alergénio anteriormente descritas provêm do Phl p 5a ab ou correspondem preferencialmente às sequências de acordo com a SEQ ID NO 4 ou 8.

Proporciona-se produzir as variantes de alergénio de acordo com a invenção a partir da sequência de ADN clonada, recorrendo a métodos de engenharia genética. Em princípio, também se pode tratar de modificações químicas do extracto nativo de alergénio (Fiebig, 1995, "Allergo J." 4 (7), 377 - 382).

Naturalmente, também são possíveis, através das variações dos alergénios do grupo 5 descritas no presente pedido de patente, outras alterações noutras posições - em princípio para aumento da hipoalergenicidade. Estas modificações poderão ser, por exemplo, inserções, deleções e trocas de aminoácidos, clivagens da proteína em fragmentos, assim como fusões da proteína ou dos seus fragmentos com outras proteínas ou outros péptidos.

Na produção das variantes de alergénios aqui descritas em maior detalhe, introduziu-se um His-tag por engenharia genética, com vista a uma melhor purificação das proteínas sobreexpressas.

Além disso, também constitui objecto uma molécula de ADN que codifica uma variante de alergénio anteriormente descrita, em particular correspondendo a uma sequência de acordo com a SEQ ID NO 3 ou 7, um vector de expressão recombinante, contendo esta molécula de ADN, e um organismo hospedeiro não humano, transformado com a referida molécula de ADN ou com o referido vector de expressão. Os organismos hospedeiros adequados podem ser organismos procarióticos ou eucarióticos, unicelulares ou pluricelulares, como bactérias ou leveduras. Um organismo hospedeiro preferido em conformidade com a invenção é a *E. coli*.

Além disso, a invenção é relativa a um processo para a produção de uma variante de alergénio de acordo com a invenção, através da cultura do referido organismo hospedeiro e da obtenção da respectiva variante de alergénio a partir da cultura.

A presente invenção tem igualmente por objecto as variantes de alergénios, as moléculas de ADN e os vectores de expressão anteriormente descritos, na sua qualidade de medicamento.

Além disso, a presente invenção tem por objecto preparações farmacêuticas contendo pelo menos uma destas variantes de alergénio ou uma molécula de ADN correspondente ou um vector de expressão correspondente, assim como eventualmente outras substâncias activas e/ou substâncias

auxiliares, com vista ao tratamento de alergias em cujo desencadeamento estão implicados os alergénios do grupo 5 da *Pooideae*, ou na vacinação imunoterapêutica de doentes com alergias em cujo desencadeamento estão implicados os alergénios do grupo 5 da *Pooideae*, e/ou na prevenção destas alergias.

Caso em questão estejam preparações farmacêuticas do segundo tipo (contendo pelo menos uma molécula de ADN ou um vector de expressão), estas preparações conterão ainda preferencialmente hidróxido de alumínio, um oligonucleótido contendo CpG imunoestimulador ou uma combinação dos dois como substâncias auxiliares.

As preparações farmacêuticas no âmbito da presente invenção podem ser utilizadas como agentes terapêuticos na medicina humana ou na medicina veterinária. Como substâncias de suporte tem-se as substâncias orgânicas ou inorgânicas que se adequem à aplicação parenteral e que não reajam com as variantes dos alergénios do grupo 5 de acordo com a invenção. Com vista à aplicação parenteral, faz-se uso em particular de soluções, de preferência de soluções oleicas ou aquosas, e ainda de suspensões, emulsões ou implantes. As variantes de alergénios de acordo com a invenção também podem ser liofilizadas e os liofilizados obtidos podem ser utilizados, por exemplo, na produção de preparados injectáveis. As preparações indicadas podem ser esterilizadas e/ou conter substâncias auxiliares, tais como lubrificantes, conservantes, estabilizadores e/ou reticulantes, emulsionantes, sais para influenciar a pressão osmótica, substâncias tampão e/ou várias outras substâncias activas.

Além disso é possível obter, através de uma formulação correspondente das variantes de alergénios de acordo com a invenção, preparados de deposição, através, por exemplo, de adsorção em hidróxido de alumínio.

Por fim, a presente invenção tem por objecto a utilização pelo menos de uma variante de alergénio de acordo com a invenção ou de uma molécula de ADN de acordo com a invenção ou de um vector de expressão de acordo com a invenção, na produção de um medicamento para o tratamento de alergias, em cujo desencadeamento estão implicados os alergénios do grupo 5 da *Pooideae*, ou na vacinação imunoterapêutica de doentes com alergias, em cujo desencadeamento estão implicados os alergénios do grupo 5 da *Pooideae*, e/ou na prevenção destas alergias.

Protocolo de sequências

<110> Merck Patent GmbH

<120> Derivados do Phl p 5a com uma reduzida alergenicidade e uma reactividade mantida com as células T

<130> P 03/109

<140> DE 10325508.7

<141> 2003-06-04

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 855

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 1

```

gocgatctag gctacgggccc ggccaccccc gctgccccgg cggccgggcta cccccccgccc      60
gccccgggcgc gagcgggagcc agcaggttaag gcgacgaccc aggagcagaa gctgatcgag      120
aagatcaacg ccggtctcaa ggccggccttg gccgctgccc ccggcgctcc gccagcggac      180
aagtacagga cgttcgtcgc aaccttcggc ggggcctcca scaaggcctt cggcgagggc      240
ctctcggggc agcccaaggg cgcgcgcgaa tcacagctcca aggcgcgcgt caccctccaag      300
ctcgaagccg cctacaagct cgcctacaag acagccgagg gcgcgacgcc tgaggccaag      360
tacgaagcct acgtcgccac cctaagcgag gcgctccgca tcatcgccgg caccctcgag      420
gtccacgcgc tcaagccgc ggccgaggag gtcagggtta tccctgcccg cgagctgcag      480
gtcatcgaga aggtcgacgc cgccttcaag gtcgctgcca ccgcgcgcaa cggcgggccc      540

```

gccaacgaca agttcacctgt ctctgaggcc gccttcaaca acgcatcaa ggcgagcacg 600
 ggccggcgctt acgagagcta caagttcctc ccgcacctgg aggcgcgcgt caagcaggcc 660
 taagccgcca ccgtcgccac cgcgcggag gtcaagtaca ccgtctttga gaccgcgctg 720
 aaaaaggcca tcaccgcat gtccgaggcc cagaaggctg ccaagcccg cgcgcgtg 780
 accgcacccg caacctccg cgttgccgg gccaccggc cgcgcacccg cgctactggt 840
 ggctacaaag tctga 855

<210> 2

<211> 284

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 2

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly Lys Ala Thr
 20 25 30

Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala
 35 40 45

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys Tyr Arg Thr
 50 55 60

Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly
 65 70 75 80

Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala
 85 90 95

Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala
 100 105 110

Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu
 115 120 125

Ser Glu Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val
 130 135 140

Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln

145	150	155	160
Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala	165	170	175
Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe	180	185	190
Asn Asn Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys	195	200	205
Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr	210	215	220
Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu	225	230	235
Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro	245	250	255
Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ser Ala Val Gly Ala Ala Thr	260	265	270
Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val	275	280	

<210> 3

<211> 795

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 3

gccgatctag gctacggccc ggccacccca gctgcccgg cggccggcta ccccccgcc	60
gccccggccg gagcggagcc agcaggttaag gcgacgaccg aggagcagaa gctgatcgag	120
aagatcaacg cgggttcaa ggccggccttg gccgctgcg cggcggtccc gccagcggac	180
aagtacagga cgttcgtcgc aaccttcggc ggggcctcca acaaggcctt cgcggagggc	240
ctctcggggc agcccaaggg cgcgcgcgaa tccagctccg gcgcgacgcc tgaggccaag	300
taagacgcct acgtcgccac cctaagcgag gcgctccgca tcatcgccgg caccctcgag	360
gtccacggcg tcaagccgc ggccgaggag gtcaaggcta tccctgcgg cgagctgcag	420
gtcatcgaga aggtcgacgc cgccttcaag gtgcgtgcc cgcgcgcaa cgcgcgccc	480

gccaaagaca agttacogt cttagaggcc gccttcaaca acgcatcaa ggcgagcacg 540
 ggogggogco acgagagcta caagttcaco ccggccctgg aggcggccgt caagcaggcc 600
 tacggcgcca ccgtcgccac cggcgccggag gtcaagtaca ccgtctttga gacggogctg 660
 aaaaaggcca tcacggccat gtccgaggcc cagaaggctg ccaagcccg cgcggctgcc 720
 acggccaccg caacctccgc cgttgggcgc gccaccggcg ccggccaccg cgtactggt 780
 ggctacaaag tctga 795

<210> 4

<211> 264

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 4

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly Lys Ala Thr
 20 25 30

Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala
 35 40 45

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys Tyr Arg Thr
 50 55 60

Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly
 65 70 75 80

Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala Thr
 85 90 95

Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu
 100 105 110

Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala
 115 120 125

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

Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro

145 150 155 160
 Ala Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Ala Ala Phe Asn Asn Ala Ile
 165 170 175
 Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala
 180 185 190
 Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala
 195 200 205
 Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile
 210 215 220
 Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala
 225 230 235 240
 Thr Ala Thr Ala Thr Ser Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr
 245 250 255
 Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 260

<210> 5

<211> 783

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 5

gccgatctag gctacggccc ggccacccca gctgccccgg ccgcccggcta cccccccgcc 60
 gccccggccg gagcggagcc agcaggtaag ggcagcaccg aggagcagaa gctgatcgag 120
 aagatcaacg ccggcttcaa ggccggccttg gccgctgccc ccggcgctccc gccagcggac 180
 aagtacagga cgttcgtcgc aaccttcggc gggccctcca acaaggcctt cgcggagggc 240
 ctctcgggcy agcccaaggg ccgcgcagaa tccagctcca aggcgcgcgt cacctccaag 300
 ctgcagcccg cctacaagct cgcctacaag acagccgagg gcgcgacgcc tgaggccaag 360
 tacgacgcct acgtcgccac cctaagcgag gcgctccgca tcatcgccgg caccctcgag 420
 gtccacgcgc tcaagcccgc ggccgaggag gtcaaggtta tccctgccgg cgagctgcag 480
 gtcctcgaga aggtcgacgc cgccttcaag gtccgtgcca ccagcacggg cggcgccctac 540
 gagagctaca agttcatccc cgccttgagg gcgcgcgtca agcaggccta cgcgcgcaac 600

```

gtcgccaccg cgcgggaggt caagtacacc gtctttgaga ccgcgctgaa aaaggccatc 660
accgcatgt cgcaggccca gaaggctgac aagcccgctg ccgctgccac cgccaccgca 720
acctccgcgc ttggcgcggc caccggcgcc gccaccgcgc ctactggtgg ctacaaagtc 780
tga 783

```

<210> 6

<211> 360

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 6

```

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1          5          10          15

```

```

Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly Lys Ala Thr
          20          25          30

```

```

Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala
35          40          45

```

```

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys Tyr Arg Thr
50          55          60

```

```

Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly
65          70          75          80

```

```

Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala
85          90          95

```

```

Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala
100         105         110

```

```

Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu
115         120         125

```

```

Ser Glu Ala Leu Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val
130         135         140

```

```

Lys Pro Ala Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln
145         150         155         160

```

```

Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ser Thr

```

165 170 175
 Gly Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala
 180 185 190
 Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys
 195 200 205
 Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser
 210 215 220
 Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala
 225 230 235 240
 Thr Ser Ala Val Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly
 245 250 255
 Gly Tyr Lys Val
 260

<210> 7

<211> 723

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 7

gccgatctag gctacggccc gccaccccca gctgccccgg cgcgggcta ccccccgcc 60
 gccccggcgg gagcggagcc agcaggtaag gcgacgaccg aggagcagaa gctgatcgag 120
 aagatcaacg ccggcttcaa ggcggtcttg gccgctgccg ccggcgctcc gccagcggac 180
 aagtacagga cgttcgtcgc aaccttcggc gcggcctcca acaaggcctt cgcggagggc 240
 ctctcgggcg agcccaaggg cgcgcgcgaa tccagctccg gcgagacgac tgaggccaag 300
 tacgacgctt acgtcgccac cctaagcgag gcgctccgca tcctcgccgg caccctcgag 360
 gtccacgcgc tcaagcccg cgcggaggag gtcaagggtta tccctgcggg cgagctgcag 420
 gtcctcgaga aggtcgacgc cgccttcaag gtcgctgcc aagcacggg cggcgcttac 480
 gagagctaca agttcatccc cgccttgag gccgcgtca agcaggccta cgcgcgccc 540
 gtcgccacgc cgcgggaggt caagtacacc gtccttgaga ccgcgctgaa aaaggccatc 600
 accgccatgt ccgaggccca gaaggctgcc aagcccgctg ccgctgccac cgcacccgca 660
 acctccgcgc ttggcgcggc caccggcgcc gccaccgcgc ctactggtgg ctacaaagtc 720

tga

723

<210> 8

<211> 240

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<400> 8

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Ala Gly Ala Glu Pro Ala Gly Lys Ala Thr
20 25 30

Thr Glu Glu Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala
35 40 45

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Val Pro Pro Ala Asp Lys Tyr Arg Thr
50 55 60

Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly
65 70 75 80

Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala Thr
85 90 95

Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu
100 105 110

Arg Ile Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala Val Lys Pro Ala Ala
115 120 125

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

Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ser Thr Gly Gly Ala Tyr
145 150 155 160

Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala
165 170 175

Tyr Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe
180 185 190

Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys
 195 200 205

Ala Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ser Ala Val
 210 215 220

Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Tyr Lys Val
 225 230 235 240

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 9
 gccgatctag gctacggccc ggcc

24

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 10
 aacataacta gtggcagcga ccttgaaggg ggcgtc

36

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 11
 atctaactag tacggggcggc gcttacgaga

30

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 12
aacataaagc ttccagactt tgtagccacc agt 33

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 13
ggagctggat tcggcggcgc ccttggg 27

<210> 14

<211> 45

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 14
gccgccgaat ccagctccgg cggagcgcct gaggccaagt acgac 45

Lisboa, 20 de Setembro de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Variantes do alergénio do grupo 5 phl p 5a, que apresentam uma menor reactividade com as IgE do que o alergénio conhecido de tipo selvagem, e uma reactividade mantida em grande medida com os linfócitos T, caracterizadas por uma região, que corresponde à região da sequência de aminoácidos 94 - 113 do Phl p 5a, ou as regiões que correspondem às regiões das sequências de aminoácidos 94 - 113 e 175 - 198 do Phl p 5a, faltar(em) comparativamente aos alergénios conhecidos do tipo selvagem.
2. Variante do alergénio Phl p 5a de acordo com a reivindicação 1, com uma sequência de aminoácidos seleccionada de uma das sequências de acordo com as SEQ ID NO 4 e 8.
3. Variantes de alergénio de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizadas por serem obtidas de forma recombinante por métodos de engenharia genética.
4. Molécula de ADN que codifica uma variante de alergénio de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 3.
5. Molécula de ADN que corresponde a uma sequência de ADN seleccionada de uma das sequências de acordo com as SEQ ID NO 3 e 7.
6. Vector de expressão recombinante contendo uma molécula de ADN, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, ligada de forma funcional a uma sequência de controlo da expressão.

7. Um organismo hospedeiro não humano, transformado com uma molécula de ADN, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, ou com um vector de expressão de acordo com a reivindicação 6.
8. Processo para a produção de uma variante de alergénio de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 3, através da cultura de um organismo hospedeiro, de acordo com a reivindicação 7, e da obtenção da respectiva variante de alergénio a partir da cultura.
9. Variante de alergénio de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 3 como medicamento.
10. Preparação farmacêutica, contendo pelo menos uma variante de alergénio de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 3 e, eventualmente, outras substâncias activas e/ou substâncias auxiliares, para o tratamento de alergias em cujo desencadeamento estão implicados os alergénios do grupo 5 da *Pooideae*.
11. Utilização de pelo menos uma variante de alergénio de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 3, na produção de um medicamento para o tratamento de alergias, em cujo desencadeamento estão implicados os alergénios do grupo 5 da *Pooideae*.
12. Molécula de ADN de acordo com a reivindicação 4 ou 5 como medicamento.
13. Vector de expressão recombinante de acordo com a reivindicação 6 como medicamento.

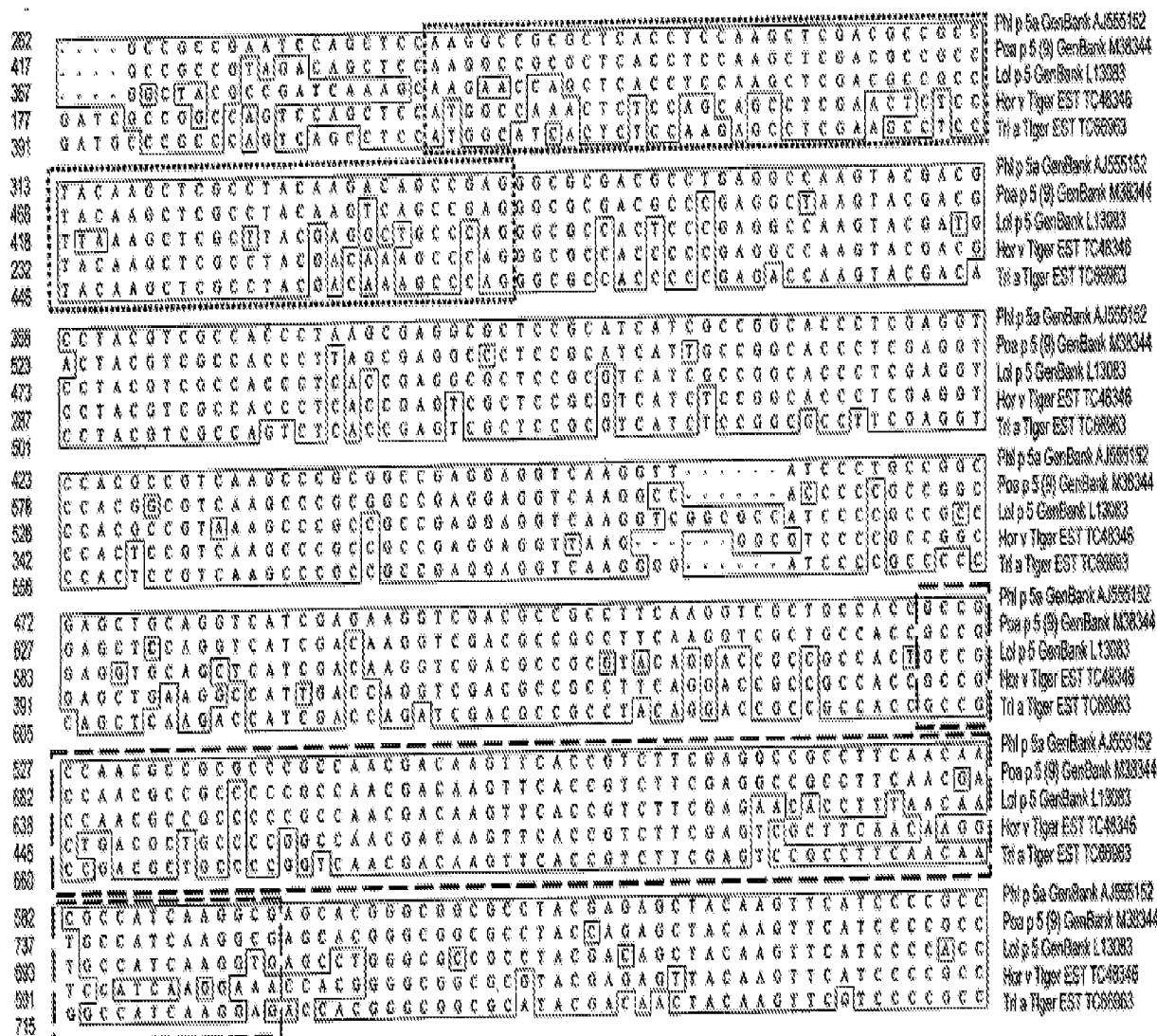
14. Preparação farmacêutica contendo pelo menos uma molécula de ADN de acordo com a reivindicação 12, ou pelo menos um vector de expressão de acordo com a reivindicação 13 e, eventualmente, outras substâncias activas e/ou substâncias auxiliares, destinada à vacinação imunoterapêutica com ADN de doentes com alergias, em cujo desencadeamento estão implicados os alergénios do grupo 5 da *Pooideae*, e/ou à prevenção destas alergias.
15. Preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 14, contendo hidróxido de alumínio, um oligonucleótido contendo CpG imunoestimulador ou uma combinação dos dois como substâncias auxiliares.
16. Utilização de pelo menos uma molécula de ADN de acordo com a reivindicação 12, ou de pelo menos um vector de expressão de acordo com a reivindicação 13, na produção de um medicamento para a vacinação imunoterapêutica com ADN de doentes com alergias, em cujo desencadeamento estão implicados os alergénios do grupo 5 da *Pooideae*, e/ou na prevenção destas alergias.

Lisboa, 20 de Setembro de 2011

Alinhamento de regiões relevantes de sequências de ADNc homólogas do Phl p 5a de espécies da Pooideae:

Lolium perenne (Lol p) *Poa pratensis* (Poa p) *Triticum aestivum* (Tri a) e *Hordeum vulgare* (Hor v)

Fig. 1



Numeração: posições dos nucleótidos das inserções de ADN

Sequências dos Phl p 5a, Poa p 5 e Lol p 5: sequências de ADNc da base de dados "GenBank" do National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, EUA

As sequências Hor v e Tri a: sequências EST da base de dados EST do Institute for Genomic Research (TIGR), Rockville, EUA

Moldura preta: identidade da sequência em relação ao Phl p 5a (em relação ao GenBank AJ555152)

Moldura a ponteados: deleção correspondendo aos aminoácidos 94 - 113 (em relação ao GenBank AJ555152)

Moldura a tracejado: deleção correspondendo aos aminoácidos 175 - 198 (em relação ao GenBank AJ555152)

Fig. 2a

Fig. 2

Fig. 2a

Fig. 2b

Alinhamento de seqüências de aminoácidos homólogas ao Phi p 5a
(regiões relevantes das seqüências, derivadas de seqüências de ADN)
de espécies da Pooideae: *Lolium perenne* (Lol p), *Poa pratensis* (Poa p)
Triticum aestivum (Tri a) e *Hordeum vulgare* (Hor v)

169	P P A D K Y R T F V A T F G A A S N K A F A E G L S G E P K	Phi p 5a GenBank AJ555152
324	P A A N K Y K T F V A T F G A A S N K A F A E A L S T E P K	Poa p 5 (9) GenBank M38344
286	P P A D K Y K T F V E T F G T A T N K A F V E G L A S - - -	Lol p 5 GenBank L13083
82	P P A D K Y K T F E A T F A A A S N K A F A E V L K G A A T	Hor v Tiger EST TC48346
296	P P A D K Y K T F E A T F S A A S N X A F A D V L K A A A S	Tri a Tiger EST TC66963

259	G - - A A E S S S K A A L T S K L D A A Y K L A Y K T A E G	Phi p 5a GenBank AJ555152
414	G - - A A V D S S K A A L T S K L D A A Y K L A Y K S A E G	Poa p 5 (9) GenBank M38344
367	- - - G Y A D Q S K N Q L T S K L D A A L K L A Y E A A Q G	Lol p 5 GenBank L13083
172	G Q I A Q Q S S S M A K L S S S L E L S Y K L A Y D K A Q G	Hor v Tiger EST TC48346
386	G Q M P A Q S A S M A S L S K S L E A S Y K L A Y D K A Q G	Tri a Tiger EST TC66963

343	A T P E A K Y D A Y V A T L S E A L R I I A G T L E V H A V	Phi p 5a GenBank AJ555152
498	A T P E A K Y D D Y V A T L S E A L R I I A G T L E V H G V	Poa p 5 (9) GenBank M38344
448	A T P E A K Y D A Y V A T L T E A L R V I A G T L E V H A V	Lol p 5 GenBank L13083
262	A T P E A K Y D A Y V A T L T E S L R V I S G T L E V H S V	Hor v Tiger EST TC48346
476	A T P E T K Y D T Y V A S L T E S L R V I S G A F E V H S V	Tri a Tiger EST TC66963

433	K P A A E E V K V - - I P A G E L Q V I E K V D A A F K V A	Phi p 5a GenBank AJ555152
588	K P A A E E V K A - - T P A G E L Q V I D K V D A A F K V A	Poa p 5 (9) GenBank M38344
538	K P A A E E V K V G A I P A A E V Q L I D K V D A A Y R T A	Lol p 5 GenBank L13083
352	K P A A E E V K - - G V P A G E L K A I D Q V D A A F R T A	Hor v Tiger EST TC48346
566	K P A A E E V K G X X I P A P Q L K T I D Q I D A A Y R T A	Tri a Tiger EST TC66963

Fig. 2b

517	A T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N N A I K A S T O G	Phi p 5a GenBank AJ555152
672	A T A A N A A P A N D K F T V F E A A F N D A I K A S T O G	Poa p 5 (9) GenBank M38344
628	A T A A N A A P A N D K F T V F E N T F N N A I K V S L G A	Lol p 5 GenBank L13083
436	A T A A D A A P A N D K F T V F E S L Q Q G P S R K P R G G	Hor v Tiger EST TC48346
650	A T A A D A A P V N D K F T V F E S A F N K A I K E T T O G	Tri a Tiger EST TC66963
607	A Y E S Y K F I P A L E A A V K Q A Y A A T V A T A P E V K	Phi p 5a GenBank AJ555152
762	A Y Q S Y K F I P A L E A A V K Q S Y A A T V A T A P A V K	Poa p 5 (9) GenBank M38344
718	A Y D S Y K F I P T L V A A V K Q A Y A A K Q A T A P E V K	Lol p 5 GenBank L13083
526	A Y E S Y K F I P A L E A A V K Q A Y A A T V A A A P E V K	Hor v Tiger EST TC48346
740	A Y D N Y K F V P A L E S A V K Q A Y A A T V A S A P E V K	Tri a Tiger EST TC66963
697	Y T V F E T A L K K A I T A M S E A Q K A A K P A A A A T A	Phi p 5a GenBank AJ555152
852	Y T V F E T A L K K A I T A M S Q A Q K A A K P A A A A T G	Poa p 5 (9) GenBank M38344
808	Y T V S E T A L K K A V T A M S E A E K E A T P A A A A T A	Lol p 5 GenBank L13083
616	F T V F Q T A L S K A I N A M T Q A G K V A K P A A A A T A	Hor v Tiger EST TC48346
830	Y A V F Q A A L S K A I N A M V E A E K D A G A A A A G G Y	Tri a Tiger EST TC66963

Numeração: posições dos nucleótidos das inserções de ADN

Sequências dos Phi p 5a, Poa p 5 e Lol p 5: sequências de ADN da base de dados "GenBank" do National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, EUA

As sequências Hor v e Tri a: sequências EST da base de dados EST do Institute for Genomic Research (TIGER), Rockville, EUA

Moldura a preto: identidade da sequência em relação ao Phi p 5a (em relação ao GenBank AJ555152)

Moldura a pontilhado: deleção correspondendo aos aminoácidos 94 - 113 (em relação ao GenBank AJ555152)

Moldura a tracejado: deleção correspondendo aos aminoácidos 175 - 198 (em relação ao GenBank AJ555152)

Fig. 3

SDS-PAGE de mutantes de deleção purificados
na forma de proteínas de fusão histidina

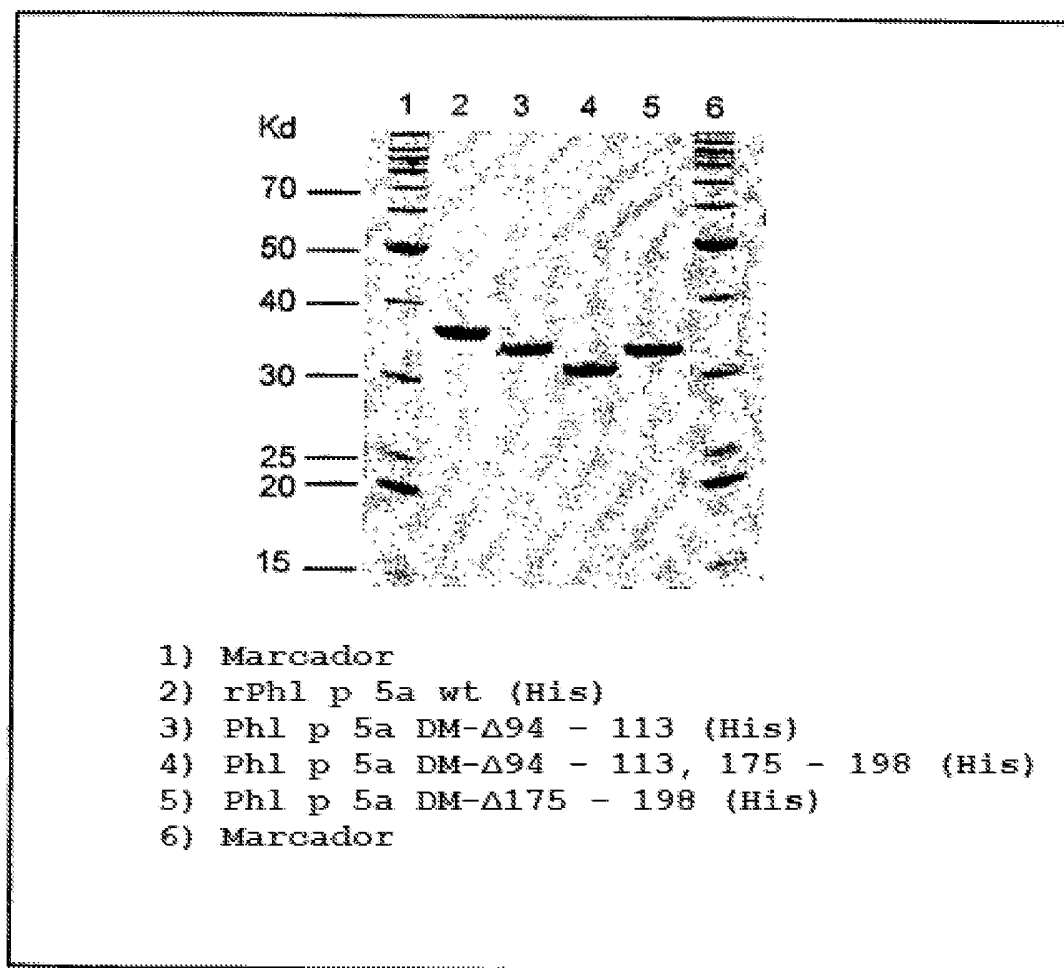
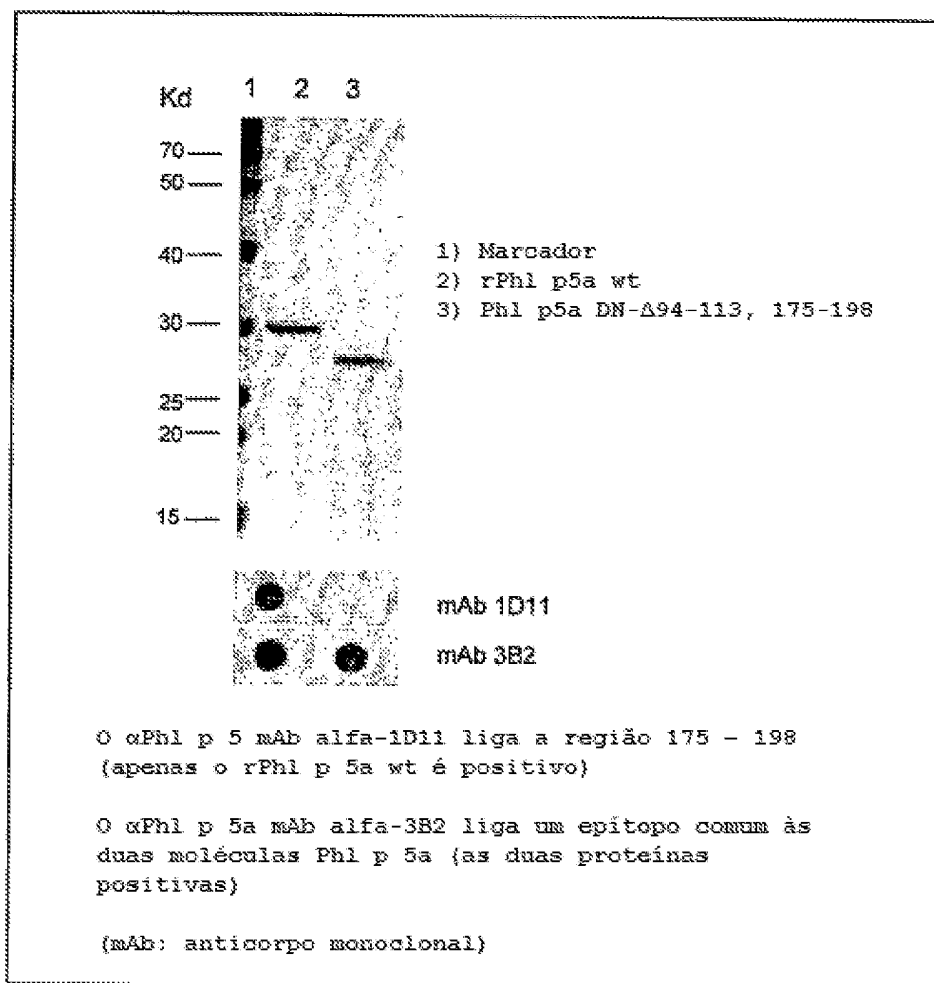
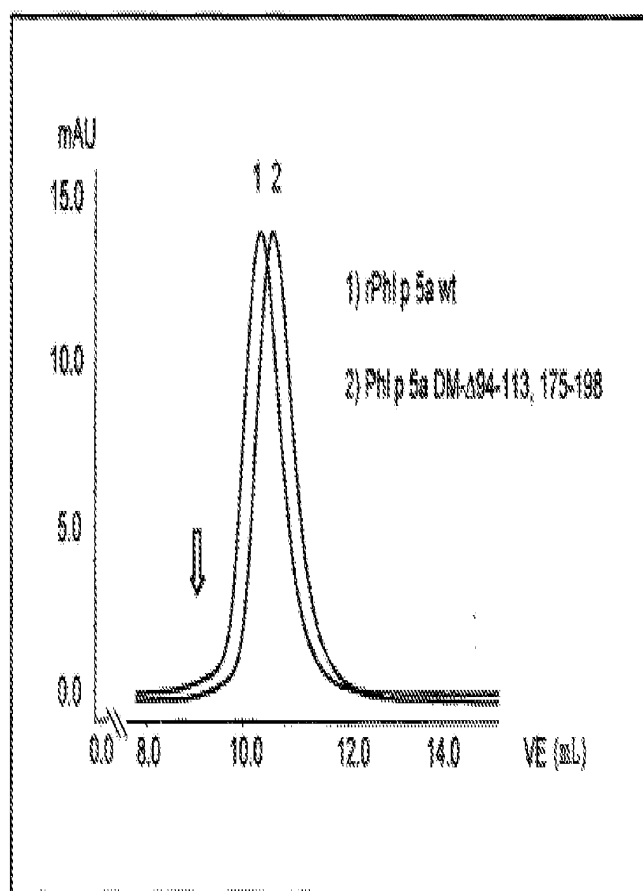


Fig. 4

SDS-PAGE das proteínas de não fusão purificadas Phl p 5a DM- Δ 94 - 113, 175 - 198 e rPhl p 5a wt (em cima) e teste de identidade com anticorpos α Phl p 5 (em baixo)



SEC analítica do mutante de deleção Phl p 5a DM-Δ94 - 113, 175 - 198 e do tipo selvagem do Phl p 5a recombinante (proteínas de não fusão purificadas)



Coluna: Superdex 75 HR10/30 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)

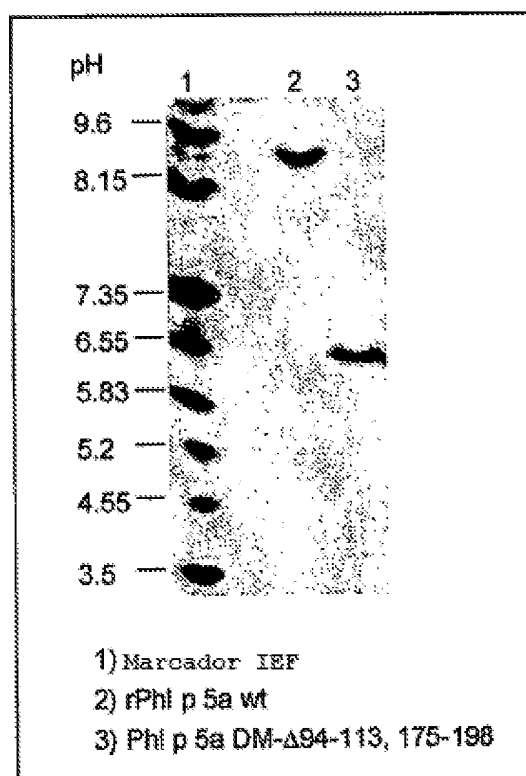
Agente de controlo da fluidez: PBS

Seta: volume excluído

Fig. 5

Fig. 6

Focagem isoelectrica não desnaturante do mutante de deleção Phl p 5a DM- Δ 94 - 113, 175 - 198 e do tipo selvagem do Phl p 5a recombinante (proteínas de não fusão purificadas)

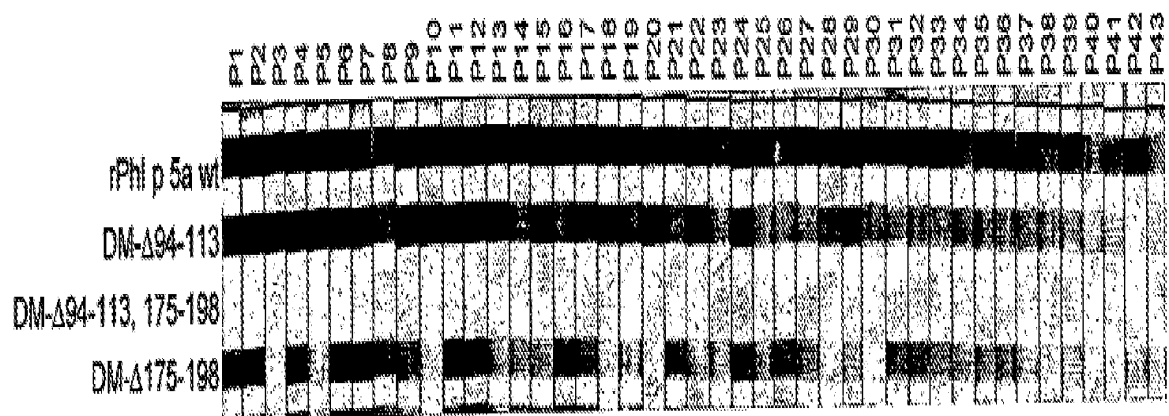


pI rPhl p 5a wt = 8.7

pI rPhl p 5a DM- Δ 94-113, 175-198 = 6.4

Fig. 7

Teste das tiras para testar a capacidade de ligação a IgE dos
mutantes de deleção Phi p 5a (não desnaturante)



P: Soros de indivíduos alérgicos aos pólenes das
gramíneas clinicamente definidos

Fig. 8

Deteção da reactividade IgE reduzida dos mutantes de deleção do Phl p 5a por meio do teste de inibição EAST com dois soros individuais representativos (a e b) e um pool de soros (c)

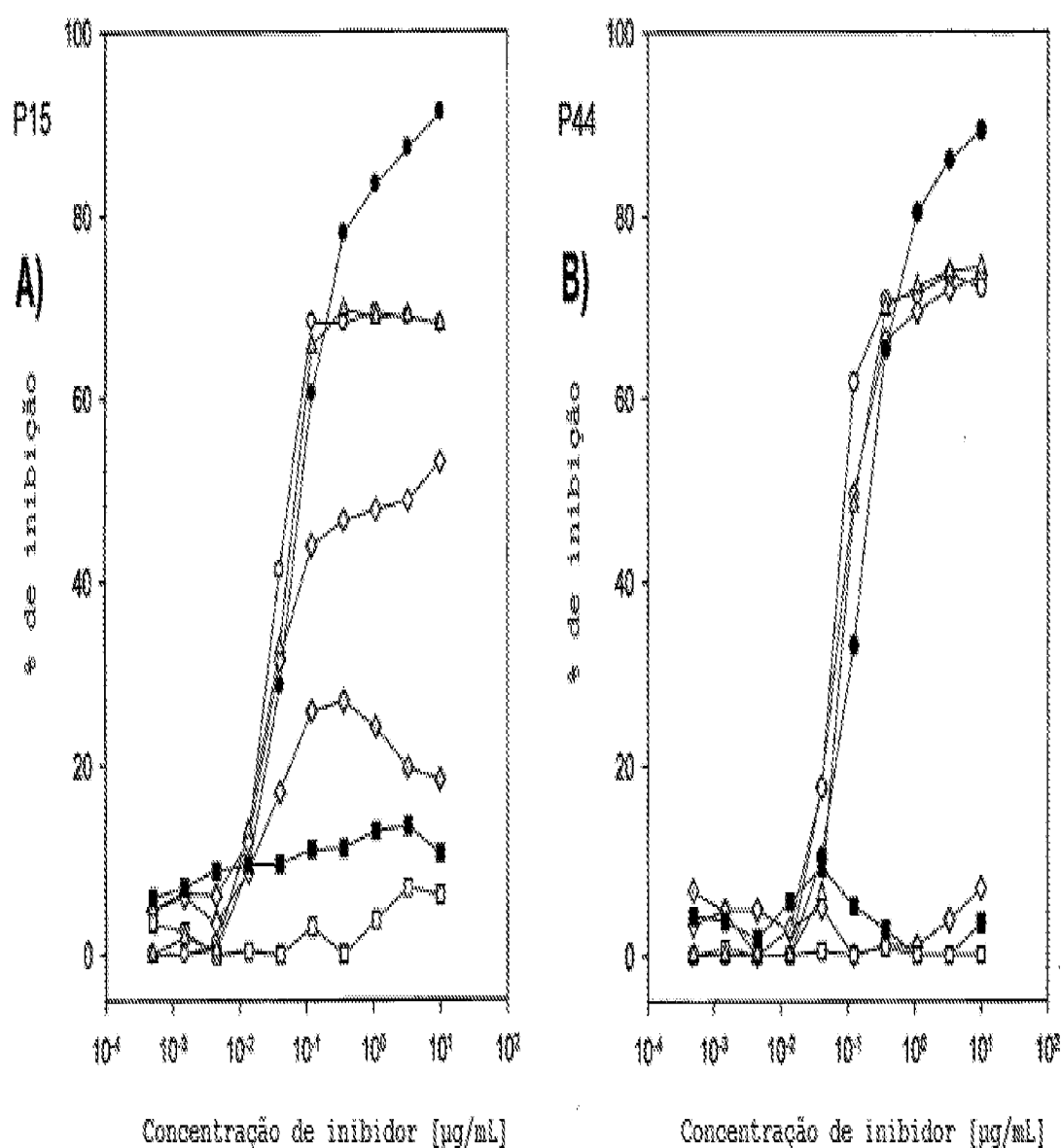
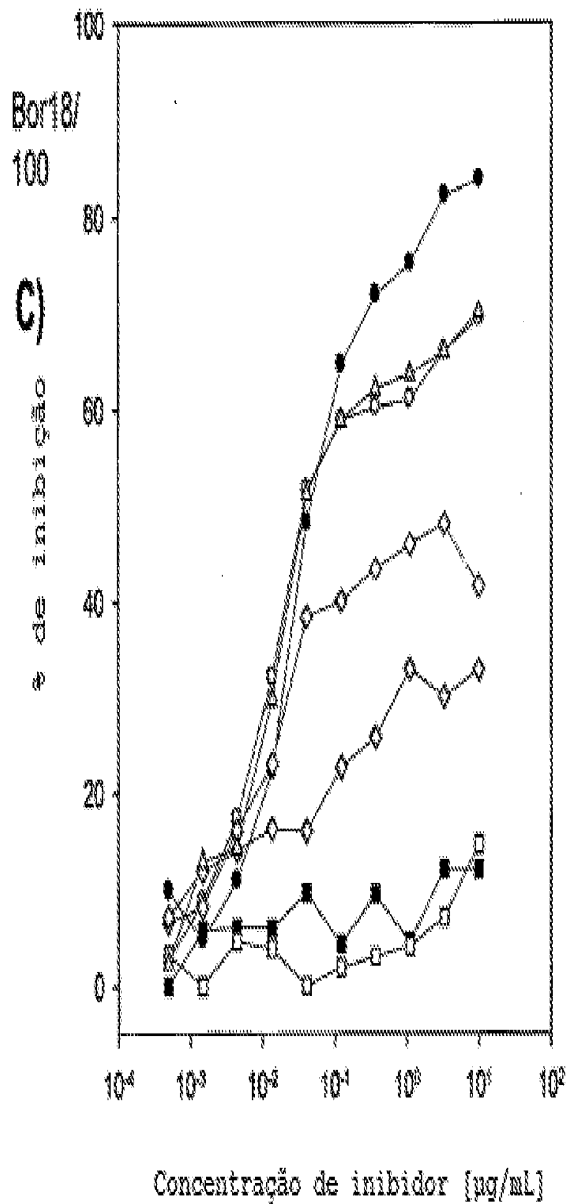


Fig. 8



P: Soros de indivíduos alérgicos aos pólenes das gramíneas definidos a nível clínico

Fig. 9

Detecção da hipoalergenicidade do mutante de deleção do
 Phl p 5a Phl p 5a DM- Δ 94 - 113, 175 - 198 por meio do
 teste de activação de basófilos com os basófilos de seis
 indivíduos diferentes alérgicos aos pólenes das gramíneas
 (P)

