



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 246 904**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/415** (2006.01)  
**A61K 39/36** (2006.01)  
**A61P 37/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **00975093 .6**  
96 Fecha de presentación : **24.10.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1224215**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.07.2002**

54 Título: **Formas no anafilácticas del alérgeno Phl p 6 del polen del césped y su uso.**

30 Prioridad: **29.10.1999 SE 9903950**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.03.2006**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **28.02.2011**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **28.02.2011**

73 Titular/es: **PHADIA AB.**  
**Box 6460**  
**751 37 Uppsala, SE**  
**Rudolf Valenta y**  
**PHARMACIA DIAGNOSTICS AB.**

72 Inventor/es: **Kraft, Dietrich;**  
**Gronlund, Hans;**  
**Pastore, Annalisa;**  
**Valent, Peter;**  
**Stummvoll, Sabine;**  
**Grote, Monika;**  
**Sperr, Wolfgang, R.;**  
**Valenta, Rudolf;**  
**Vrtala, Susanne y**  
**Vangelista, Luca**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 246 904 T5

## DESCRIPCIÓN

Formas no anafilácticas del alérgeno Phl p 6 del polen del césped y su uso.

5 La presente invención se refiere a formas no anafilácticas, es decir, hipoalérgicas, del alérgeno Phl p 6 principal del polen del césped de la variedad timothy y el uso de las formas para hiposensibilización y diagnóstico. La invención también se refiere a un método para hiposensibilización de un individuo mamífero, típicamente un individuo humano, que padece de alergia tipo I frente al alérgeno Phl p 6.

10 La alergia tipo I es una enfermedad de hipersensibilidad determinada genéticamente que afecta a más del 20% de la población en países industrializados (1). Como consecuencia de este trastorno inmune, los pacientes alérgicos producen anticuerpos IgE frente a proteínas principalmente transportadas por el aire inocuas *per se*, de polen, ácaros, mohos y pelo/ceniza animal. Los síntomas de alergia Tipo I (rinitis alérgica, conjuntivitis, asma alérgica y choque anafiláctico) son el resultado del entrecruzamiento inducido por alérgeno de los anticuerpos IgE unidos a la célula  
15 efectora (mastocito, basófilo) y la liberación posterior de mediadores inflamatorios (2). Como aproximadamente el 40% de los individuos alérgicos padecen síntomas después de contacto con polen del césped, la investigación se ha concentrado en la caracterización de alérgenos del polen del césped pertinentes por métodos proteicos e inmunquímicos (3). Aunque se han identificado los grupos de los principales alérgenos como restos con reactividad cruzada que existen en la mayoría de las especies de césped (4), no se sabía nada con respecto a su naturaleza o funciones  
20 biológicas.

La reciente aplicación de las técnicas de biología molecular a la caracterización de alérgenos ha revelado las estructuras primarias de los alérgenos y ha facilitado la producción de alérgenos recombinantes para propósitos de diagnóstico y terapéuticos (5). Los componentes del citoesqueleto vegetal (por ejemplo, profilina) (6) así como las  
25 proteínas de polen que unen calcio (7) se han identificado como alérgenos pertinentes. El hecho de que los pacientes alérgicos muestren reacciones de tipo inmediato después del contacto con diversas fuentes de alérgenos no relacionadas puede, por tanto, explicarse por reactividad cruzada de sus anticuerpos IgE con alérgenos ubicuos. La evidencia de que los alérgenos del grupo 1 del polen del césped pertenecen a una familia de proteínas que disgregan la pared celular (expansinas) (8) y que los alérgenos del grupo 5 del césped pueden tener actividad ARNasa (9), ha re-estimulado  
30 ideas de que la función biológica de una proteína dada puede estar relacionada con su alergenidad. Los recientes descubrimientos de que los principales alérgenos del polen del césped pueden llegar a unirse a partículas de pequeño tamaño (por ejemplo, los alérgenos del grupo 1 a gases de gasoil (10)) o pueden llegar a transmitirse por el aire en forma de subcompartimientos del polen (por ejemplo, los alérgenos del grupo 5 en amiloplastos (11)) proporcionarían un posible mecanismo de cómo ciertos alérgenos pueden ser capaces de alcanzar las vías respiratorias profundas de  
35 los pacientes y provocar asma alérgica.

La terapia de enfermedades alérgicas Tipo I actualmente se realiza por tratamiento farmacológico y por inmunoterapia específica. La inmunoterapia específica se ha establecido muy temprano ya en este siglo (Noon, Lancet 1 (1911) 1572-1573) e implica la aplicación sistémica de dosis en aumento de alérgenos durante periodos prolongados. Aunque  
40 la inmunoterapia específica se reconoce como tratamiento eficaz, la existencia de efectos secundarios anafilácticos representa una de las principales desventajas de esta terapia. Para reducir las reacciones anafilácticas, se ha propuesto recientemente el uso de epítopos de células T para inmunoterapia específica de alérgeno (Briner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 7608-7612, y Norman, Curr. Opin. Immunol. 5 (1993) 986-973). Los alérgenos albergan una gran diversidad de diferentes epítopos de células T (Ebner *et al.*, J. Immunol 150 (1993) 1047-1054; Joost-van-  
45 Neerven *et al.*, J. Immunol. 151 (1993) 2326-2335; y Schenk *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 96 (1995) 986-996) que pueden solapar con epítopos de IgE continuos. Para evitar el entrecruzamiento de IgE unidas a células efectoras (mastocito, basófilo) y la liberación de mediadores, es necesario analizar minuciosamente los epítopos de las células T y las IgE.

50 Vrtala *et al.*, J. Clin. Invest. 99(7) 1673-1681 (1997) y el documento WO 99/16467 describen una nueva estrategia para reducir la actividad anafiláctica del alérgeno principal Bet v 1 del abedul alterando la estructura tridimensional expresando dos partes del ADNc de Bet v 1 que representan los aminoácidos 1-74 y 75-160 en *Escherichia coli*. En contraste con el Bet v 1 recombinante completo, los fragmentos recombinantes casi no mostraron alergenidad. Ambos fragmentos no anafilácticos indujeron la proliferación de clones humanos de células T específicos de Bet v 1,  
55 que indica que albergaban todos los epítopos dominantes de células T y por lo tanto podrían usarse para inmunoterapia de células T segura y específica. Se cree que el éxito de esta estrategia se debe al hecho de que el alérgeno Bet v 1 tiene epítopos de IgE discontinuos (es decir, conformacionales) en lugar de epítopos de IgE continuos como es el caso para muchos otros alérgenos.

60 En contraste con el alérgeno principal Bet v 1 de abedul, el alérgeno principal Phl p 6 del polen del césped de la variedad timothy contiene epítopos de IgE continuos (secuenciales) y por lo tanto no sería susceptible de la anterior estrategia de fragmentación para reducir la actividad anafiláctica como se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con la presente invención, sin embargo, se ha descubierto sorprendente y más inesperadamente que  
65 pueden construirse variantes de delección de Phl p 6 por fragmentación genética (recombinante) o sintética, pudiendo usarse dichos fragmentos para inmunoterapia específica de alergia al polen del césped con efectos secundarios anafilácticos reducidos. Dichos fragmentos con capacidad anafiláctica fuertemente reducida se mencionarán a continuación como no anafilácticos o hipoalérgicos.

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula inmunogénica hipoalergénica obtenida del alérgeno Phl p 6 del polen del césped de la variedad timothy donde la molécula Phl p 6 tiene una delección N-terminal y/o C-terminal que hace que la molécula carezca de capacidad de unión a IgE.

5 La delección N-terminal o C-terminal puede ser un truncamiento terminal del alérgeno. La delección también puede ser interna en la parte N-terminal o C-terminal del alérgeno, respectivamente.

Los fragmentos de la molécula de alérgeno pueden producirse por técnicas de ADN recombinante o química sintética de péptidos como se conoce *per se* por los especialistas en la técnica.

10 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una combinación inmunogénica hipoalergénica de moléculas obtenidas del alérgeno Phl p 6, que comprende (i) una molécula Phl p 6 que tiene una delección N-terminal que hace que la molécula carezca al menos sustancialmente de la capacidad de unión a IgE, y (ii) una molécula Phl p 6 que tiene una delección C-terminal que hace que la molécula carezca al menos sustancialmente de la capacidad de unión a IgE, abarcando las dos moléculas juntas la secuencia de aminoácidos completa del alérgeno Phl p 6.

15 Para abarcar juntas la secuencia de aminoácidos completa de Phl p 6, las secuencias respectivas de las dos moléculas Phl p 6 pueden solapar o ser contiguas.

20 Los tamaños de las delecciones N-terminal y C-terminal del alérgeno Phl p 6 necesarias para que los fragmentos sean útiles para los propósitos de la invención, es decir, que los fragmentos sean (i) inmunogénicos y (ii) no reactivos con IgE, pueden determinarse fácilmente por los especialistas en la técnica. Por tanto, la carencia o presencia de capacidad de unión a IgE de una molécula con delección N-terminal o C-terminal puede determinarse fácilmente, indicando la carencia de reactividad con IgE que la molécula puede aplicarse sin o con bajo riesgo de inducir efectos secundarios anafilácticos. La actividad inmunogénica de las moléculas puede determinarse por su capacidad de reconocerse por un antisuero policlonal frente al alérgeno Phl p 6 completo. De este modo, pueden seleccionarse fragmentos y combinaciones de fragmentos, respectivamente, que tengan muy alta probabilidad de ser capaces de provocar respuestas inmunes que protejan frente al alérgeno completo.

30 Un tercer aspecto de la invención es una terapia de hiposensibilización específica. Dicha terapia puede realizarse como se conoce en la técnica para alérgenos proteicos e incluye administrar de manera repetida al mamífero, típicamente un individuo humano, que padece de alergia tipo I frente al alérgeno, un inmunógeno que es capaz de provocar una respuesta inmune IgG frente al alérgeno. El inmunógeno puede mezclarse con adyuvantes apropiados tales como óxido de aluminio. La administración puede hacerse sistémicamente, por ejemplo, por inyección, infusión, etc., pero también se ha sugerido la vía oral para exponer la parte intestinal del sistema inmune. Véase también Norman PS, 35 "Current status of immunotherapy for allergies and anaphylactic reactions" Adv. Internal. Medicine 41 (1996) 681-713.

Aquí, el inmunógeno a administrar puede ser una molécula inmunogénica de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o una mezcla de dichas moléculas, preferiblemente, la combinación inmunogénica hipoalergénica de 40 moléculas mencionada anteriormente obtenida del alérgeno Phl p 6 de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, es decir, (i) una molécula Phl p 6 que tiene una delección N-terminal que hace que la molécula carezca al menos sustancialmente de la capacidad de unión a IgE, y (ii) una molécula Phl p 6 que tiene una delección C-terminal que hace que la molécula carezca al menos sustancialmente de la capacidad de unión a IgE, abarcando las dos moléculas 45 juntas la secuencia completa de aminoácidos de Phl p 6.

Más específicamente, los inmunógenos pueden usarse para inducir respuestas de anticuerpo en un paciente, y/o provocar la respuesta de células T, y/o modular la respuesta de anticuerpo y células T para inducir tolerancia.

50 Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona el uso del inmunógeno de acuerdo con el primer aspecto, o la combinación de inmunógenos de acuerdo con el segundo aspecto, como antígeno en un inmunoensayo para detectar anticuerpos específicos de la clase IgA, IgD, IgE, IgG o IgM dirigida frente al alérgeno Phl p 6 del que deriva el inmunógeno o inmunógenos. Las variantes de ensayo apropiadas implican la formación de un complejo inmune terciario entre el inmunógeno, el anticuerpo de muestra y un anticuerpo dirigido frente a la clase de Ig de interés. La muestra puede ser cualquier fluido biológico que contenga Ig, por ejemplo, una muestra obtenida de la sangre (suero, 55 plasma, sangre completa), CSF, etc. Especialmente, los fragmentos hipoalergénicos pueden usarse para controlar el diagnóstico (por ejemplo, medidas de IgG, medida de respuestas de células T) durante la terapia cuando se induce una nueva respuesta inmune frente a los fragmentos.

La invención ahora se ilustrará por el siguiente Ejemplo no limitante.

## 60 **Ejemplo**

### **Materiales y métodos**

65 *Materiales biológicos, sueros de pacientes, antisueros, alérgenos recombinantes*

El polen del césped de la variedad timothy (*Phleum pratense*), césped inglés (*Lolium perenne*), centeno (*Secale cereale*), pasto azul de Kentucky (*Poa pratensis*), trigo (*Triticum sativum*), avena cultivada (*Avena sativa*) y carrizo

(*Phragmites communis*) fueron de Allergon AB, (Välinge, Suecia). Las semillas de césped de la variedad timothy se adquirieron de Austroaat, (Viena, Austria) y se hicieron crecer durante 4 semanas para obtener hojas y raíces recientes. Se caracterizaron pacientes alérgicos al polen del césped como se ha descrito (4). El antisuero de conejo anti-profilina de apio (RP1) se describe (12). Se provocó antisuero de conejo anti-rPhl p 6 frente a Phl p 6 recombinante purificado usando adyuvantes de Freund (Charles River, Kissleg, Alemania). Se purificaron los alergenios del polen del césped de la variedad timothy recombinante rPhl p 1, rPhl p 2 y rPhl p 5 como se ha descrito (13). Se purificó la profilina del polen del césped de la variedad timothy recombinante por cromatografía de afinidad con poli (L-prolina) (6).

#### *Aislamiento y caracterización de ADNc que codifican isoformas/fragmentos de Phl p 6*

Se aislaron trescientos cincuenta clones reactivos a IgE de una biblioteca de ADNc de expresión construida a partir de polen del césped de la variedad timothy maduro en el fago  $\lambda$ gt 11 (14). Seis ADNc (c121, c142, c146, c171, c223, c233) con homología de secuencia con un ADNc que codifica Phl p 6 (15) se subclonaron en el plásmido pUC18 y se secuenciaron (16, 17). Las secuencias se analizaron usando el programa McVector (Kodak, Rochester, NY). La búsqueda de secuencias proteicas homólogas a Phl p 6 se hizo con el programa FastA (paquete GCG) (18) en la base de datos SwissProt. Las secuencias de los alergenios Hol 1 5 y Hor v 5 se recuperaron de la base de datos EMBL. Se produjo un alineamiento de secuencia múltiple con ClustalW (19) y se editó a mano. El editor de secuencias GDE (S. Smith, Harvard University, Cambridge, MA) y COLORMASK (J. Thompson, EMBL, Heidelberg, Alemania) se usaron para colorear restos conservados con propiedades relacionadas (19). La estructura secundaria de la proteína y las predicciones de accesibilidad a la superficie se hicieron con el programa PHD en el servidor EMBL PredictProtein (20).

#### *Mapeo de los epítomos de IgE para Phl p 6, expresión y purificación de Phl p 6 recombinante*

La capacidad de unión a IgE de clones fágicos que expresan isoformas y fragmentos de Phl p 6 se investigó por ensayo de aparición de placas (21). El ADN que codifica el alergenio Phl p 6 maduro se amplificó por PCR a partir del ADN del clon 142, subclonado en el sitio NdeI/Eco RI de pET-17b. El Phl p 6 recombinante se expresó en *E. coli* BL 21 (DE 3) en cultivo líquido. Las células se suspendieron en Imidazol 25 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1% y se lisaron por la adición de lisozima (20  $\mu$ g/g de células) durante 30 minutos a temperatura ambiente así como por ciclos de congelación-descongelación. El ADN se digirió con ADNasa I (0,1 mg/g de sedimento celular) durante 20 minutos a temperatura ambiente. El extracto proteico se centrifugó durante 20 minutos a 10.000 x g (Sorvall RC5C; rotor SS34) para retirar los materiales insolubles. Se enriqueció rPhl p 6 en un precipitado obtenido por adición de sulfato amónico (40-60% p/v). El precipitado se disolvió en Tris 10 mM pH 6, se dializó frente a este tampón y después de centrifugación (20 minutos, 10.000 g, Sorvall RC5C; rotor SS34) se aplicó a una columna de dietilaminoetil celulosa-Sepharose (Pharmacia). Las proteínas no unidas se eluyeron con Tris 10 mM, pH 6, isopropanol al 4% v/v. Las fracciones que contenían Phl p 6 a más del 80% de pureza se ajustaron a pH 8 con NaOH y se sometieron a una segunda etapa de cromatografía en una columna de dietilaminoetil celulosa-Sepharose. La elución de las proteínas unidas con un gradiente 0-0,5 M de NaCl a pH 8 produjo fracciones que contenían rPhl p 6 puro que se dializaron frente a H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

#### *Análisis MALDI-TOF (desorción e ionización de láser asistida por matriz - tiempo de vuelo) y CD (dicroísmo circular) de Phl p 6 recombinante purificado*

Los espectros de masas mediante desorción por láser se consiguieron de un modo lineal con un instrumento Compact MALDI II de tiempo de vuelo (Kratos, Manchester, UK) (piCHEM, Graz, Austria). Los espectros de CD se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-710 ajustado con un sistema de control de temperatura tipo peltier Jasco PTC-348WI y conectado con un baño de agua Fisons HAAKE GH. Los espectros de CD ultravioleta lejano se registraron a 20°C en una cubeta de cuarzo de 2 mm de longitud de paso (Hellma, Mullheim, Baden, Alemania) a una concentración de proteínas de 7  $\mu$ M. La desnaturalización térmica de Phl p 6 se controló registrando la elipticidad durante el aumento de temperatura (50°C/h) a 220 nm. La reversibilidad del proceso de desplegamiento se controló midiendo la restauración de la señal de CD después del enfriamiento (50°C/h) hasta la temperatura de partida (20°C). La fracción de proteína plegada se calculó como  $F=1-U$ , donde  $U=(\Theta_{220}-\Theta_N)/(\Theta_U-\Theta_N)$ .  $\Theta_N$  es la elipticidad de la proteína en estado nativo y  $\Theta_U$  la de la proteína desnaturalizada. Para rPhl p 6,  $\Theta_U$  se supuso que era igual a  $\Theta_{220}$  a 85°C y  $\Theta_N$  para  $\Theta_{220}$  a 20°C.

#### *Capacidad de unión a IgE de Phl p 6 recombinante, reactividad cruzada con Phl p 6 natural y otros alergenios del polen del césped de la variedad timothy*

El predominio de reactividad anti-rPhl p 6 de IgE se determinó en sueros de 171 pacientes alérgicos al polen del césped y, para propósitos de control, en sueros de personas no atópicas por ELISA (13). La presencia de epítomos de IgE con reactividad cruzada en Phl p 6 natural y recombinante se investigó por experimentos de inhibición por inmunotransferencia de IgE (4). Una posible relación inmunológica entre rPhl p 6 y alergenios del polen del césped de la variedad timothy recombinante (rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5) (13) se estudió por ELISA de competición como se ha descrito (4).

*Experimentos de liberación de histamina*

Se aislaron granulocitos de muestras de sangre heparinizadas de individuos alérgicos al polen del césped que contenían anticuerpos IgE reactivos a rPhl p 6 por sedimentación con dextrano (22). Las células se incubaron con concentraciones en aumento de rPhl p 5, rPhl p 6 purificados, y con un anticuerpo anti-IgE humana (E124.2.8 D&2, Immunotech, Marsella, Francia). La histamina liberada en los sobrenadantes se midió por radioinmunoensayo (Immunotech, Marsella, Francia).

*Ensayo cutáneo*

Después de obtener el consentimiento con total conocimiento de causa, se realizaron ensayos de pinchazo cutáneo en los antebrazos de los individuos como se ha descrito (23). Los individuos se pincharon con alícuotas de 20 µl que contenían diferentes concentraciones (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) de rPhl p 6, rPhl p 5 purificados y con extracto de polen del césped de la variedad timothy, histamina y cloruro sódico (ALK, Horsholm, Dinamarca).

*Análisis de la presencia de alergenitos relacionados con Phl p 6 en otras especies de césped y expresión específica de tejido de Phl p 6*

Los extractos proteicos de pólenes, hojas y raíces se obtuvieron homogeneizando los tejidos en SDS-tampón de muestra (24). Los materiales insolubles se retiraron centrifugando los extractos (10.000 x g, 20 minutos; Sorvall RC5C, rotor SS34). Los extractos proteicos se separaron por SDS al 14%-PAGE (25) y se transfirieron a nitrocelulosa (26). Las tiras de nitrocelulosa se sondearon con antisuero de conejo anti-profilina de apio, RP1, (12), el antisuero de conejo anti-rPhl p 6 y el último suero preinmune de conejo. Los anticuerpos de conejo unidos se detectaron con un antisuero de burro anti Ig de conejo marcado con <sup>125</sup>I diluido 1:1000 (Amersham).

*Localización in situ de Phl p 6 por microscopía electrónica por inmunomarcaje con oro*

Los granos del polen del césped de la variedad timothy se fijaron en condiciones no acuosas como se ha descrito (27). Se incubaron secciones ultradelgadas con concentraciones iguales de Ig de conejo anti-rPhl p 6 (Ig: fracción de inmunoglobulina purificada con proteína G) o Ig preinmune. Los anticuerpos de conejo unidos se detectaron con anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo acoplados a partículas de oro coloidales de 10 nm (Plano, Wetzlar, Alemania) (27).

*Construcción de variantes de delección de Phl p 6 (*Phleum pratense*) hipoalergénicas*

Se generaron variantes de delección N-terminales y C-terminales de Phl p 6 para representar los aminoácidos 1-57 y aminoácidos 31-110. Los ADNc que codifican los aminoácidos 1-57 de Phl p 6 y los aminoácidos 31-110 de Phl p 6 se obtuvieron por amplificación por PCR del ADNc de Phl p 6 (clon N° 142) usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos:

Para los aminoácidos 1-57 de Phl p 6:

5': GGG AAT TCC ATA TGG GGA AGG CCA CGA CC 3'

5': CGG GGT ACC CTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG GGG CGC CTT TGA AAC 3'

Para los aminoácidos 31-110 de Phl p 6:

5': GGG AAT TCC ATA TGG CAG ACA AGT ATA AG 3'

5': CCG GAA TTC CTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG CGC GCC GGG CTT CAG 3'

Los sitios Eco RI y Kpn I se han escrito en cursiva, los sitios Nde I y una marca de His, que se ha introducido en el extremo C-terminal, están subrayados.

Los productos de PCR se cortaron con Nde I/Kpn I (aminoácidos 1-57) y con Nde I/Eco RI (aminoácidos 31-110), se purificaron por electroforesis en gel de agarosa preparativa, se subclonaron en el plásmido pET-17b (Novagen) y se transformaron en *E. coli* BL 21 (DE3) (Novagen). Las colonias que expresaban las variantes de delección correctas se identificaron por inmunoexploración usando antisuero de conejo anti-Phl p 6. El ADN de los clones positivos se aisló usando puntas Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemania) y se secuenció (MWG-Biotech, Hilden, Alemania).

*Expresión de variantes de delección de Phl p 6 en *E. coli* y ensayo de su capacidad de unión a IgE*

Los aminoácidos 1-57 de Phl p 6 y los aminoácidos 31-110 de Phl p 6 recombinantes se expresaron en *E. coli* BL 21 (DE 3) por inducción con isopropil-β-tiogalactopiranosido 0,5 mM a una OD<sub>600</sub> de 0,8 en cultivo líquido durante 5 h a 37°C. Se separaron cantidades iguales de rPhl p 6, aminoácidos 1-57 de rPhl p 6 y aminoácidos 31-110 de rPhl p 6 por SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa.

Las tiras de nitrocelulosa se incubaron con suero IgE de individuos alérgicos, personas de control no alérgicas, con un antisuero de conejo anti-Phl p 6 y un suero preinmune de conejo. Los anticuerpos IgE unidos se detectaron con anticuerpos anti-IgE humana marcados con  $^{125}\text{I}$  y los anticuerpos de conejo unidos con anticuerpos de burro anti-conejo marcados con  $^{125}\text{I}$ .

5

## Resultados

### *Aislamiento y caracterización de ADNc que codifican isoformas/fragmentos de Phl p 6*

Seis clones de ADNc (c142, c223, c171, c121, c233, c146), que codifican isoformas/fragmentos de Phl p 6 se aislaron de una biblioteca  $\lambda$ gt11 de polen del césped de la variedad timothy con suero IgE de un paciente alérgico al polen del césped. Las secuencias de los clones descritos se han depositado en la base de datos GenBank (números de Acceso: Y16955-Y16960). La secuencia de aminoácidos deducida de Phl p 6 (clon 142) contenía un péptido líder hidrófobo de 28 aminoácidos. Se calcularon una masa molecular de 11,8 kDa y un pI de 5,5 para la proteína Phl p 6 madura (clon 142) que comienza con un resto de glicina y muestra un alto contenido en restos de alanina (20,9%). El análisis de estructura secundaria ayudado por ordenador de Phl p 6 indica un contenido de hélices predominante y el cálculo de la accesibilidad de disolvente predice que muchos de los aminoácidos N-terminales están expuestos al disolvente mientras que la mayoría de los aminoácidos C-terminales parecen internados. Una búsqueda de motivos de secuencia reveló la presencia de un sitio de glicosilación unido a N potencial (NAS: aminoácidos 15-17), un sitio de miristoilación N-terminal (GKAT: aminoácidos 1-4), dos sitios de fosforilación por proteína quinasa dependiente de AMPc (KATT: aminoácidos 2-5; KYKT: aminoácidos 33-36) y dos secuencias de dirección peroxisomal (GKA: aminoácidos 1-3; SKA: aminoácidos 54-56). La secuencia de aminoácidos de Phl p 6 deducida presentó identidad con una secuencia de Phl p 6 (15) recientemente presentada y similitudes con las porciones N-terminales de los alérgenos del grupo 5 del polen del césped. Sin embargo, IgE específico de Phl p 6 muestra poca o ninguna reactividad cruzada con los alérgenos del grupo 5. Una comparación con los alérgenos del grupo 5 del polen del césped se da en Vrtala, S., *et al.*, J. Immunol. 1999, 163(10): 5489-5496 (37) (la descripción del cual se incorpora como referencia en este documento). La Figura 1A del mismo muestra un alineamiento de secuencia múltiple, la estructura secundaria y la predicción de accesibilidad de disolvente de variantes de Phl p 6 y alérgenos del grupo 5.

30 *El extremo N-terminal de Phl p 6 es determinante para la unión a IgE*

Se expusieron rPhl p 6 completo (c223, c142), rPhl p 6 truncado en el extremo N-terminal (c171, c121, c233, c146) fusionados a  $\beta$ -gal unidos a nitrocelulosa y, para propósitos de control,  $\beta$ -gal solo a suero IgE de 9 individuos alérgicos al polen del césped y una persona no alérgica (Figura 1). Los resultados obtenidos mostraron que las dos isoformas de Phl p 6 completo y un fragmento de Phl p 6 que carece sólo de 4 de los aminoácidos N-terminales se unieron fuertemente a IgE de todos los pacientes alérgicos al polen del césped ensayados y que la capacidad de unión a IgE de los clones parciales de Phl p 6 disminuyó dependiendo de la cantidad de aminoácidos que estaban ausentes en el extremo N-terminal de la proteína. Un clon parcial (clon 121) que carece de 30 aminoácidos N-terminales tenía casi completamente perdida su capacidad de unión a IgE (Figura 1).

40

### *Expresión en E. coli y purificación de Phl p 6 recombinante. Capacidad de unión a IgE de rPhl p 6 purificado*

rPhl p 6 se sobreexpresó en *E. coli* BL21 (DE3). Una combinación de varias etapas de purificación produjo rPhl p 6 puro y soluble (aproximadamente 5 mg de proteína/litro de cultivo de *E. coli*) que por SDS-PAGE se identificó como uno de los alérgenos del polen del césped de la variedad timothy de bajo peso molecular (Figura 2A). El análisis MALDI-TOF de Phl p 6 recombinante purificado dio como resultado dos picos de masa/carga de 11790 y 5896 que corresponden a las especies MH<sup>+</sup> y M2H2<sup>+</sup> de la muestra que estaban de acuerdo con la masa molecular de Phl p 6 deducida (11789 Da).

En 128 sueros de 171 pacientes alérgicos al polen del césped pero no en suero de 10 individuos no alérgicos se detectaron anticuerpos IgE específicos de rPhl p 6. La preabsorción de sueros de pacientes alérgicos al polen del césped con rPhl p 6 condujo a una gran reducción de la unión de IgE a un resto de 10-14 kDa en extracto de polen del césped de la variedad timothy transferido a nitrocelulosa que indica que rPhl p 6 y Phl p 6 natural comparten epítopos de IgE. Experimentos de ELISA de competición demostraron que sólo un pequeño porcentaje (<20%) de IgE específica de Phl p 6 podría preabsorberse con rPhl p 6. La unión de IgE a rPhl p 1, rPhl p 2 y profilina de césped de la variedad timothy recombinante no se redujo después de preincubación de los sueros con rPhl p 6. Estos resultados identifican Phl p 6 como un alérgeno principal que es distinto de otros alérgenos del polen del césped.

### *rPhl p 6 se pliega en una conformación estable toda de hélice alfa*

60

El espectro de CD ultravioleta lejano de rPhl p 6 purificado (Figura 2B) indica que la proteína contiene una cantidad considerable de estructura secundaria en hélice alfa. El espectro se caracteriza por dos anchos mínimos a 208 nm y 220 nm y un máximo a 191 nm. La predicción de estructura secundaria (37) está en buen acuerdo con las medidas de CD como indica el contenido de estructura secundaria en hélice alfa predominante. La transición de desplegamiento de rPhl p 6 es monofásica y altamente cooperativa con un punto de fusión de 61°C. A 85°C, rPhl p 6 adopta una conformación helicoidal aleatoria, con un mínimo típico a 200 nm. rPhl p 6 muestra un alto grado de reversibilidad de plegamiento, evidente a partir del perfil de curva de enfriamiento (Figura 2C) y el espectro UV lejano registrado a 20°C después de enfriamiento desde 85°C (Figura 2B).

65

*Phl p 6 recombinante induce una liberación de histamina por basófilos dependiente de dosis y reacciones cutáneas de tipo inmediato en pacientes alérgicos al polen del césped*

rPhl p 6 purificado indujo liberación de histamina específica y dependiente de dosis por los basófilos de un paciente alérgico al polen del césped (Figura 3A). rPhl p 5 que representa un alérgeno del polen del césped altamente activo (14, Valenta y Flicker, datos no publicados) indujo una liberación máxima ya a una concentración inferior en comparación con rPhl p 6. En cuatro pacientes alérgicos al polen del césped pero no en los individuos no alérgicos, rPhl p 6, rPhl p 5 y extracto de polen del césped de la variedad timothy indujeron reacciones cutáneas de tipo inmediato (Tabla 1; Figura 3B). Aunque no se observaron reacciones a cloruro sódico, la histamina indujo reacciones de ronchas en todos los individuos ensayados (Tabla 1; Figura 3B).

*Los alérgenos del grupo 6 representan proteínas específicas de polen*

Aunque los principales grupos de alérgenos del polen del césped existen en pólenes de la mayoría de especies de césped (4), se informó de que los alérgenos del grupo 6 existen exclusivamente en el polen del césped de la variedad timothy (*Phleum pratense*) (15). Un antisuero de conejo anti-rPhl p 6 reaccionó de manera cruzada con los alérgenos del grupo 5 en extractos de polen transferidos a nitrocelulosa de diversas monocotiledóneas (*Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Secale cereale*, *Triticum sativum*, *Avena sativa*, *Phragmites communis*) entre 25-28 kDa (Figura 4A, carriles 2). Phl p 6 o alérgenos relacionados con Phl p 6 a 11 kDa se detectaron exclusivamente en pólenes de *Phleum pratense* y *Poa pratensis*. Aunque se encontró un supuesto sitio de N-glicosilación en la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de ADNc de Phl p 6, se observaron pesos moleculares comparables para Phl p 6 natural y recombinante excluyendo la fuerte glicosilación de Phl p 6 natural (Figuras 4A, 2A). Los anticuerpos de conejo anti-rPhl p 6 reaccionaron fuertemente con Phl p 6 a 11 kDa en polen del césped de la variedad timothy transferido a nitrocelulosa pero no con extractos de hoja o raíz (Figura 4B, carriles 2). Se detectó profilina en los tres tejidos a aproximadamente 14 kDa (Figura 4B, carriles 1).

*Localización inmunoelectromicroscópica de Phl p 6 en polen del césped de la variedad timothy*

Usando microscopía electrónica por inmunomarcaje con oro después de incrustarlo, se unieron anticuerpos de conejo anti-rPhl p 6 a las numerosas partículas polisacáridas (P) que llenan gran parte del interior del grano de polen maduro del césped de la variedad timothy (Figura 4C). La mayor acumulación de partículas de oro se observó en superficies seccionadas de las partículas P que indica que Phl p 6 está presente sobre en lugar de dentro de la partículas P. Se observó poca (citósol, exina) o ninguna (mitocondria, intina) inmunorreactividad anti-Phl p 6 en otras partes del grano de polen. Asimismo, casi no se detectaron partículas de oro en los amiloplastos. Este patrón de localización, junto con el descubrimiento de que un antisuero de conejo anti-rPhl p 5 no logró marcar las partículas P (datos no mostrados) excluye la posibilidad de que el inmunomarcaje de las partículas P sea el resultado de la presencia de alérgenos del grupo 5 con reactividad cruzada. Los experimentos de control realizados con Ig preinmune produjeron sólo unas pocas partículas de oro adsorbidas no específicamente (Figura 4D).

*Las variantes de delección de Phl p 6 (aminoácidos 1-57, aminoácidos 31-110) muestran capacidad de unión a IgE fuertemente reducida*

rPhl p 6 completo (Figura 5A), la variante de los aminoácidos 1-57 de rPhl p 6 (Figura 5B) y la variante de los aminoácidos 31-110 de rPhl p 6 (Figura 5C) transferidos a nitrocelulosa se expusieron a 13 sueros de pacientes alérgicos al polen del césped, a un suero de una persona no atópica y a un antisuero de conejo anti-rPhl p 6. Mientras que los 13 pacientes alérgicos al polen del césped presentaron reactividad de IgE a Phl p 6 recombinante completo (Figura 5A), la variante de los aminoácidos 1-57 se reconoció por el suero 11 y ligeramente por el suero 13 (Figura 5B). La variante de los aminoácidos 31-110 de Phl p 6 reaccionó sólo ligeramente con el suero 7 y 11 (Figura 5C). El suero del individuo no atópico no logró reaccionar con rPhl p 6 completo y las variantes de delección. El antisuero de conejo anti-rPhl p 6 mostró reactividad de intensidad comparable a rPhl p 6 completo y las dos variantes de delección (Figuras 5A-C: carriles 15) mientras que el suero preinmune de conejo no mostró reactividad en el intervalo de peso molecular de las moléculas (Figuras 5A-C: carriles 16).

*Reactividad de IgG1 de antisueros de ratón anti-rPhl p 6 o anti-aminoácidos 31-110 de rPhl p 6 para rPhl p 6*

IgG1 de ratón provocadas frente a rPhl p 6 completo y los aminoácidos 31-110 de rPhl p 6 reaccionan con rPhl p 6 (Tabla II).

*Los derivados de rPhl p 6 tienen una capacidad enormemente reducida para inducir la liberación de histamina*

Los granulocitos de un paciente alérgico al polen del césped se incubaron con diversas concentraciones de rPhl p 6 purificado, aminoácidos 1-57 de rPhl p 6, aminoácidos 31-110 de rPhl p 6, aminoácidos 1-33 de rPhl p 6 o un mAb anti-IgE (E124.2.8 Dε2, Immunotech, Marsella, Francia). La histamina liberada en el sobrenadante se midió por RIA (Immunotech) (Figura 6). rPhl p 6 purificado indujo una liberación de histamina específica y dependiente de dosis por los basófilos de un paciente alérgico al polen del césped, mientras que los derivados de los aminoácidos 1-57 y aminoácidos 31-110 de rPhl p 6 no indujeron ninguna liberación de histamina hasta a una concentración de 1 µg/ml. Los aminoácidos 1-33 de Phl p 6 indujeron una liberación del 50% de histamina a una concentración de 1 µg/ml, que representa una reducción de 1000 veces la liberación de histamina en comparación con rPhl p 6 completo.

## Análisis

Aproximadamente el 40% de los pacientes alérgicos presentan síntomas de tipo inmediato después del contacto con polen del césped (3). Se han aislado ADNc que codifican isoformas y fragmentos de un alérgeno principal del polen del césped de la variedad timothy, denominado Phl p 6. Phl p 6 representa un alérgeno proteico de 11,8 kDa que se reconoce por anticuerpos IgE del 75% de los pacientes alérgicos al polen del césped. El predominio de reconocimiento por IgE de rPhl p 6 está, por tanto, de acuerdo con lo que se ha informado anteriormente para Phl p 6 e indica que los restos de carbohidrato no presentan un papel determinante en el reconocimiento por IgE de Phl p 6 (28, 29). En acuerdo con los datos de secuencia peptídica obtenidos para Phl p 6 natural se descubrió que la secuencia de aminoácidos deducida de rPhl p 6 muestra un alto grado de homología de secuencia con las porciones N-terminales de los alérgenos del grupo 5 del polen del césped, una familia de alérgenos principal del polen del césped de 25-35 kDa (29, 14). Debido a la presencia de un péptido líder hidrófobo N-terminal, Phl p 6 representa un alérgeno independiente, en lugar de un fragmento de alérgeno del grupo 5. En acuerdo con la propuesta de otros autores que analizaron un clon de ADNc que codifica Phl p 6 (15) se sugiere que los alérgenos del grupo 5 y el grupo 6 pueden provenir de genes ancestrales similares comunes como se ha descrito para los alérgenos del polen de césped del grupo 1 y el grupo 2/3 (30). La suposición de que Phl p 6 pertenece a un grupo independiente de alérgenos del polen del césped también se sostiene por el descubrimiento de que Phl p 6 comparte pocos epítomos de IgE con reactividad cruzada con el grupo 5 y ninguno con otros alérgenos del polen del césped. La predicción de accesibilidad de disolvente indicó que muchos de los aminoácidos N-terminales de Phl p 6 están expuestos al disolvente, mientras que la mayoría de los restos de aminoácidos C-terminales parecen estar internados. Aunque no hay pruebas, este descubrimiento está en acuerdo con los datos obtenidos de los experimentos de mapeo de epítomos de IgE que indican que el extremo N-terminal de la proteína está críticamente implicado en el reconocimiento de IgE. Sin embargo, es igualmente posible que el extremo N-terminal en sí mismo represente un epítomo de IgE dominante o que la delección del extremo N-terminal afecte a los epítomos conformacionales de IgE para Phl p 6.

La expresión de Phl p 6 en *E. coli* produjo grandes cantidades de proteína recombinante soluble y plegada que contenía casi exclusivamente estructura secundaria en hélice alfa. El pliegue en hélice alfa de Phl p 6 es una confirmación adicional de que no hay características estructurales comunes que predispongan a una cierta proteína a comportarse como un alérgeno. Aunque Phl p 6 muy probablemente es una proteína toda en hélice alfa, Bet v 1, el alérgeno principal del polen del abedul (31) y Bet v 2, profilina de abedul (32) tienen un plegamiento mixto alfa-beta. Como se revela por los análisis espectroscópicos de CD, rPhl p 6 comparte con otros alérgenos de polen inmunológicamente no relacionados (por ejemplo, Bet v 1 (33), Bet v 2 (6, 32)) la tendencia intrínseca remarcable de volver a plegarse en una conformación estable después de desnaturalización. Otra característica que comparten Phl p 6 y otros alérgenos de plantas importantes es su alta expresión en tejido de polen. El hecho de que la mayoría de los alérgenos vegetales caracterizados hasta ahora se expresen predominantemente en polen maduro puede, por lo tanto, interpretarse como una huella de sensibilización mediante el tracto respiratorio (34).

Por microscopía electrónica por inmunomarcaje con oro, Phl p 6 se localizó principalmente en las partículas P de polen maduro. Las partículas P son pequeños cuerpos que contienen polisacárido que representan hasta un 30% de los contenidos del grano de polen inactivo y, durante la germinación del polen transfieren el material a la pared del tubo de polen en crecimiento (35, 36). La existencia de Phl p 6 en las partículas P puede ser de relevancia clínica ya que las partículas P podrían funcionar como vehículos de alérgeno de pequeño tamaño (<2,5 micrómetros) y por lo tanto respirables que llevan Phl p 6 en contacto inmediato con la mucosa bronquial. Una intrusión de Phl p 6 unida a una partícula P en el tracto respiratorio más profundo explicaría, por tanto, el alto predominio (75%) de sensibilización frente a este alérgeno aunque sólo unas pocas especies de césped (*Phleum pratense*, *Poa pratensis*) contengan restos reactivos con anti-rPhl p 6 de conejo en el intervalo de peso molecular bajo (10-12 kDa).

El alérgeno Phl p 6 recombinante purificado expresado en *Escherichia coli* reaccionó con anticuerpos IgE de la mayoría de los pacientes alérgicos al polen del césped e indujo liberación de histamina por basófilos así como reacciones cutáneas de tipo inmediato. Por lo tanto puede usarse para el diagnóstico *in vitro* así como *in vivo* (ensayo cutáneo) de alergia al polen del césped. El descubrimiento de que la delección de la porción N-terminal de Phl p 6 redujo drásticamente la capacidad de unión a IgE de los alérgenos dio lugar a la idea de que puede ser posible construir variantes de delección de Phl p 6 que puedan usarse para inmunoterapia específica de alergia al polen del césped con efectos secundarios anafilácticos reducidos. Una estrategia similar se aplicó recientemente para alterar los epítomos conformacionales de IgE del alérgeno principal Bet v 1 del polen del abedul (23) pero no podría predecirse para Phl p 6 porque la última molécula contenía epítomos continuos de IgE. Se produjeron versiones truncadas en el extremo N-terminal y C-terminal de Phl p 6, de las cuales la variante de los aminoácidos 1-57 y aminoácidos 31-110 mostraron una capacidad de unión a IgE casi completamente eliminada. Se propone el uso de esta dos variantes de Phl p 6 hipoalérgicas producidas como moléculas recombinantes o por química de péptidos como vacunas candidatas frente a alergia al polen del césped.

## Tablas y Figuras

Tabla I. Reactividad cutánea de tipo inmediato a rPhl p 6. Cuatro pacientes alérgicos al polen del césped (HP, SF, CS, LW) y dos individuos no alérgicos (SV, SS) se sometieron a ensayo cutáneo con rPhl p 6 purificado, rPhl p 5, con extracto de polen del césped de la variedad timothy natural, histamina y cloruro sódico isotónico. Los resultados se presentan como los diámetros medios (mm) de la reacción de ronchas.



Tabla II. Reactividad de IgG1 de antiseros de ratón anti-Phl p 6 o anti-aminoácidos 31-110 de Phl p 6 frente a rPhl p 6.

Figura 1. Reactividad con IgE de isoformas y fragmentos de rPhl p 6. Filtros de nitrocelulosa que contienen proteínas del fago  $\lambda$ gt11 recombinante que expresa dos isoformas de Phl p 6 (c142, c223), fragmentos de Phl p 6 (c121, c146, c171, c233) y para propósitos de control, se sondeó el fago  $\lambda$ gt11 de tipo silvestre (0) con suero IgE de 9 pacientes alérgicos al polen del césped (1-9) y de un individuo no alérgico (10).

Figura 2. A, Pureza de alergen del polen del césped de la variedad timothy recombinante. SDS-PAGE teñido con azul brillante de Coomassie que contiene alergen del polen del césped de la variedad timothy recombinante purificados (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, profilina de polen del césped de la variedad timothy) y extracto de polen del césped de la variedad timothy natural (Timothy). (M) Marcador de peso molecular.

B, C, Análisis de dicroísmo circular. B, Los espectros de dicroísmo circular UV lejano de rPhl p 6, expresados como elipticidad residual media ( $[\Theta]$ ) (eje y), se registraron en el intervalo de longitud de onda presentado en el eje x a 20°C (línea continua), 85°C (línea de puntos) y a 20°C después de enfriamiento desde 85°C (línea discontinua). C, Desnaturalización térmica y enfriamiento de rPhl p 6 purificado registrado a 220 nm (eje x: temperatura en °C; eje y: fracción aparente de proteína plegada).

Figura 3. A, rPhl p 6 induce la liberación de histamina en basófilos. Se incubaron los granulocitos de un paciente alérgico al polen del césped con diversas concentraciones (eje x) de Phl p 6 recombinante purificado (triángulos), Phl p 5 (puntos) o un anticuerpo monoclonal anti-IgE (cuadrados). El porcentaje de histamina liberada en el sobrenadante se presenta en el eje y. Los resultados representan las medias ( $\pm$  SD) de determinaciones triplicadas.

B, Inducción de reacciones cutáneas de tipo inmediato con rPhl p 6 en pacientes alérgicos sensibilizados. Dos pacientes alérgicos al polen del césped (a) LW, (b) HP y un individuo no alérgico (c) SV se pincharon en sus antebrazos con concentraciones en aumento de rPhl p 6 y rPhl p 5 así como con histamina (Hist) y NaCl como se indica en (d). El área del ronchón se rodeó con un bolígrafo de punta redonda.

Figura 4. Expresión específica de tejido de Phl p 6. A, Se sondearon extractos de polen de césped envasado en nitrocelulosa de diversas monocotiledóneas con Ig preinmune de conejo (carriles 1) o Ig de conejo anti-rPhl p 6 (carriles 2). B, Se incubaron cantidades comparables de extractos proteicos envasados en nitrocelulosa de polen, hojas y raíces del césped de la variedad timothy con Ig de conejo anti-profilina (carriles 1), Ig de conejo anti-Phl p 6 (carriles 2) o Ig preinmune de conejo (carriles 3).

C, D, Localización ultraestructural de Phl p 6. Se tiñeron secciones ultradelgadas de polen del césped de la variedad timothy con Ig de conejo anti-Phl p 6 (C) y con Ig preinmune de conejo (D). Los anticuerpos de conejo unidos se detectaron con antisuero de cabra anti-Ig de conejo conjugado con oro (partículas de oro = manchas negras). Las flechas indican inmunorreactividad de Phl p 6 en las partículas P. Abreviaturas: E: exina; I: intina; P: partícula P. Las barras representan 0,250  $\mu$ m.

Figura 5. Capacidad para unirse a IgE reducida de variantes de delección de Phl p 6. Se ensayaron cantidades iguales de Phl p 6 (A), aminoácidos 1-57 de Phl p 6 (B) y aminoácidos 31-110 de Phl p 6 (C) para la reactividad con IgE con sueros de pacientes alérgicos al polen del césped de la variedad timothy (carril 1-13) y suero de un individuo de control no alérgico (carril 14). El carril 15 y el carril 16 muestran la reactividad con un antisuero de conejo anti-Phl p 6 y un suero preinmune de conejo. Los anticuerpos IgE unidos se detectaron con anticuerpos anti-IgE humanos marcados con  $^{125}$ I, los anticuerpos de conejo unidos se detectaron con anticuerpos de burro anti-conejo marcados con  $^{125}$ I y se visualizaron por autorradiografía.

Figura 6. Se incubaron los granulocitos de un paciente alérgico al polen del césped con diversas concentraciones (1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ , y  $10^{-7}$   $\mu$ g/ml) de rPhl p 6 purificado (puntos), aminoácidos 1-57 de rPhl p 6 (triángulos hacia arriba) aminoácidos 31-110 de rPhl p 6 (triángulos hacia abajo), aminoácidos 1-33 de rPhl p 6 (rombos) o un mAb anti-IgE (cuadrados). La histamina liberada en el sobrenadante se midió por RIA y se presenta en el eje x. Los resultados representan las medias de determinaciones triplicadas.

## Referencias

1. Kay, A. B. 1997. *Allergy and Allergic Diseases*. Blackwell Science, Oxford, UK.
2. Segal, D. M., J. D. Taurog, and H. Metzger. 1977. Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41:457.
3. Freidhoff, L. R., E. Ehrlich-Kautzky, J. H. Grant, D. A. Meyers, and D. G. Marsh. 1986. A study of the human immune response to *Lolium perenne* (rye) pollen and its components, *Lol p I* and *Lol p II* (rye I and ryeII). *J. Allergy Clin. Immunol.* 78: 1190.

4. **Niederberger, V., S. Laffer, R. Fröschl, D. Kraft, H. Rumpold, S. Kapiotis, R. Valenta, and S. Spitzauer.** 1998. IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101: 258.
5. **Valenta, R., and D. Kraft.** 1995. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 751.
6. **Valenta, R., M. Duchêne, K. Pettenburger, C. Sillaber, P. Valent, P. Bettelheim, M. Breitenbach, H. Rumpold, D. Kraft, and O. Scheiner.** 1991. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 253: 557.
7. **Seiberler, S., O. Scheiner, D. Kraft, D. Lonsdale, and R. Valenta.** 1994. Characterization of a birch pollen allergen, Bet v 3, representing a novel class of Ca<sup>2+</sup> binding proteins: specific expression in mature pollen and dependence of patients IgE binding on protein-bound Ca<sup>2+</sup>. *EMBO J.* 13: 3481.
8. **Shcherban, T. Y., J. Shi, D. M. Durachko, M. J. Guiltinan, S. J. MoQueen-Mason, M. Shieh, and D. J. Cosgrove.** 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9245.
9. **Bufe, A., G. Schramm, M. B. Keown, M. Schlaak, and W. M. Becker.** 1995. Major allergen Phl p 5b in timothy grass is a novel pollen RNase. *FEBS Lett.* 363: 6.
10. **Knox, R. B., C. Suphioglu, P. Taylor, R. Desai, H. C. Watson, J. L. Peng, and L. A. Bursill.** 1997. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin. Exp. Allergy* 27: 246.
11. **Suphioglu, C., M. B. Singh, P. Taylor, R. Bellomo, P. Holmes, R. Puy, and R. B. Knox.** 1992. Mechanism of grass pollen-induced asthma. *Lancet* 339: 569.
12. **Vallier, P., C. Dechamp, R. Valenta, O. Vial, and P. Deviller.** 1992. Purification and characterization of an allergen from celery immunochemically related to an allergen present in several other plant species. Identification as a profilin. *Clin. Exp. Allergy* 22: 774.
13. **Vrtala, S., M. Susani, W. R. Sperr, P. Valent, S. Laffer, C. Dolecek, D. Kraft, and R. Valenta.** 1996. Immunologic characterization of purified recombinant timothy grass pollen (*Phleum pratense*) allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5). *J. Allergy Clin. Immunol.* 97: 781.
14. **Vrtala, S., W. R. Sperr, I. Reimitzer, R. van Ree, S. Laffer, W.-D. Müller, P. Valent, K. Lechner, H. Rumpold, D. Kraft, O. Scheiner, and R. Valenta.** 1993. cDNA cloning of a major allergen from timothy grass (*Phleum pratense*) pollen: characterization of the recombinant Phl p V allergen. *J. Immunol.* 151: 4773.
15. **Peterson, A., A. Bufe, G. Schramm, M. Schlaak, and W. M. Becker.** 1995. Characterization of the allergen group VI in timothy grass pollen (Phl p 6). II. cDNA cloning of Phl p 6 and structural comparison to grass group V. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 108: 55.
16. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
17. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463.
18. **Devereux, J., P. Haeberli, and O. Smithies.** 1984. A comprehensive set of analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* 12: 387.
19. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673.
20. **Rost, B., and C. Sander.** 1993. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* 232: 584.
21. **Ball, T., S. Vrtala, W. R. Sperr, P. Valent, M. Susani, D. Kraft, and R. Valenta.** 1994. Isolation of an immunodominant IgE-hapten from an epitope expression cDNA library; dissection of the allergic effector reaction. *J. Biol. Chem.* 269: 28323.
22. **Valent, P., J. Besemer, M. Muhm, O. Majdic, K. Lechner, and P. Bettelheim.** 1989. Interleukin 3 activates human blood basophils via high-affinity binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5542.

23. **Vrtala, S., K. Hirtenlehner, L. Vangelista, A. Pastore, H.-G. Eichler, W. R. Sperr, P. Valent, C. Ebner, D. Kraft, and R. Valenta.** 1997. Conversion of the major birch pollen allergen, Bet v 1, into two nonanaphylactic T cell epitope-containing fragments; candidates for a novel form of specific immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 99: 1673.

24. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680.

25. **Fling, S. P., and D. S. Gregerson.** 1986. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* 155: 83.

26. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfers of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350.

27. **Grote, M., C. Dolecek, R. van Ree, and R. Valenta.** 1994. Immunogold electron microscopic localization of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen major allergens Phl p 1 and Phl p 5 after anhydrous fixation in acrolein vapor. *J. Histochem. Cytochem.* 42: 427.

28. **Lowenstein, H.** 1978. Isolation and partial characterization of three allergens of timothy pollen. *Allergy* 33: 30.

29. **Matthiesen, F., L. Friberg, M. Olsen, and H. Lowenstein.** 1993. Purification and characterization of the *Phleum pratense* (timothy) pollen allergen Phl p 6. In: Molecular Biology and Immunology of Allergens. D. Kraft and A. Schon eds. *CRC Press*, Boca Raton, pp. 189-191.

30. **Dolecek, C., S. Vrtala, S. Laffer, P. Steinberger, D. Kraft, O. Scheiner, and R. Valenta.** 1993. Molecular characterization of Phl p II, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *FEBS Lett.* 335: 299.

31. **Gajhede, M., P. Osmark, F. M. Poulsen, H. Ipsen, J. N. Larsen, R. J. van Neerven, C. Schou, H. Lowenstein, and M. D. Spangfort.** 1996. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nature Struct. Biol.* 3: 1040.

32. **Fedorov, A. A., T. Ball, R. Valenta, and S. C. Almo.** 1997. Crystal structure and IgE epitope mapping of birch pollen profilin: The molecular basis for allergen cross-reactivity. *Structure* 5: 33.

33. **Laffer, S., L. Vangelista, P. Steinberger, D. Kraft, A. Pastore, and R. Valenta.** 1996. Molecular characterization of Bip 1, a monoclonal antibody that modulates IgE binding to birch pollen allergen, Bet v 1. *J. Immunol.* 157: 4943.

34. **Valenta, R., and D. Kraft.** 1996. Type I allergic reactions to plant-derived food: A consequence of primary sensitization to pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97:893.

35. **Heslop-Harrison, J., and Y. Heslop-Harrison.** 1982. The growth of the grass pollen tube: 1. Characteristics of the polysaccharide particles ("P-particles") associated with apical growth. *Protoplasma* 112:71.

36. **Heslop-Harrison, J., Y. Heslop-Harrison, and J. S. Heslop-Harrison.** 1997. Motility in ungerminated grass pollen: association of myosin with polysaccharide-containing wall-precursor bodies (P-particles). *Sex. Plant Reprod.* 10:65.

37. **Vrtala, S., Fischer, S., Grote, M., Vangelista, L., Pastore, A., Sperr, W., Valent, P., Reichelt, R., Kraft, D., Valenta, R.** 1999. Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J. Immunol.* 163-5489.

**Tabla I. Reactividad cutánea de tipo inmediato frente a rPhl p 6**

Individuo	Phl p 6 (10 µg/ml)	Phl p 6 (100 µg/ml)	Phl p 5 (10 µg/ml)	Phl p 5 (100 µg/ml)	Césped de la variedad timothy	Histamina	NaCl
Pacientes alérgicos al polen del césped							
• HP	5	16,5	5,5	13	16	5,5	0
• SF	0	13	2	11	8	7	0
• CS	0	12	5	8,5	12	9	0
• LW	2,5	10,5	5	13	9	5,5	0
Individuos no alérgicos							
• SV	0	0	0	0	0	6	0
• SS	0	0	0	0	0	7,5	0

# ES 2 246 904 T5

TABLA II

*Reactividad de IgG1 de antisueros de ratón anti-rPhl p 6 o anti-aminoácidos 31-110 de rPhl p 6 frente a rPhl p 6*

5	Ratón anti-rPhl p 6	Suero preinmune	I. Suero inmune	II. Suero inmune
	1	0,060	0,445	>2,5
10	2	0,061	1,528	>2,5
	3	0,065	0,253	>2,5
	4	0,061	0,508	>2,5
15	5	0,062	0,864	>2,5
	Ratón anti-aa 31-110 de rPhl p 6			
20	1	0,063	1,218	>2,5
	2	0,056	>2,5	>2,5
25	3	0,057	0,347	>2,5
	4	0,054	>2,5	>2,5
30	5	0,056	0,406	>2,5

35

40

45

50

55

60

65

# REIVINDICACIONES

1. Una molécula inmunogénica hipoalergénica obtenida del alógeno del polen del césped de la variedad timothy Phl p 6, donde la molécula Phl p 6 tiene un truncamiento en el extremo N-terminal y/o C-terminal, careciendo dicha molécula de capacidad de unión a IgE.
2. La molécula inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, donde la molécula Phl p 6 está truncada en el extremo N-terminal.
3. La molécula inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, donde la molécula Phl p 6 está truncada en el extremo C-terminal.
4. La molécula inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que se produce por técnicas recombinantes.
5. La molécula inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que se produce por química sintética de péptidos.
6. Una combinación inmunogénica hipoalergénica de moléculas obtenidas del alergen Phl p 6, que comprende (i) una molécula Phl p 6 que tiene una delección N-terminal que hace que la molécula carezca al menos sustancialmente de la capacidad de unión a IgE, y (ii) una molécula Phl p 6 que tiene una delección C-terminal que hace que la molécula carezca al menos sustancialmente de la capacidad de unión a IgE, abarcado las dos moléculas juntas la secuencia completa de Phl p 6.
7. Uso de una cantidad eficaz de una molécula inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o de una combinación de moléculas inmunogénicas de acuerdo con la reivindicación 6 en la preparación de un medicamento para hiposensibilización de un mamífero que padece de alergia mediada por IgE frente al alergen del polen del césped de la variedad timothy Phl p 6.
8. Uso de una molécula inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una combinación de moléculas inmunogénicas de acuerdo con la reivindicación 6 en la preparación de un medicamento para inmunoterapia específica para el tratamiento de alergia al polen del césped medida por IgE.
9. El uso del inmunógeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la combinación de moléculas inmunogénicas de acuerdo con la reivindicación 6, para el diagnóstico *in vitro* de alergia tipo I en un individuo mamífero.
10. El uso de un inmunógeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la combinación de moléculas inmunogénicas de acuerdo con la reivindicación 6, para la preparación de un medicamento para su uso en hiposensibilización de un individuo mamífero que padece de una alergia tipo I, o para la preparación de un reactivo para su uso en el diagnóstico *in vivo* de alergia tipo I.

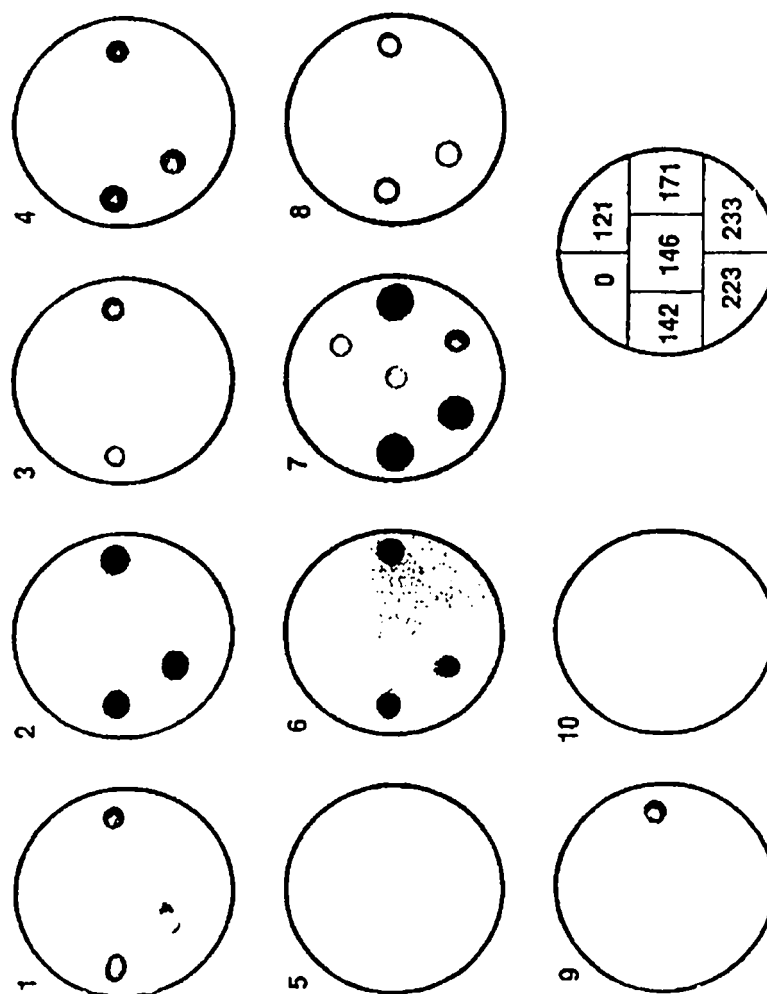


Figura 1

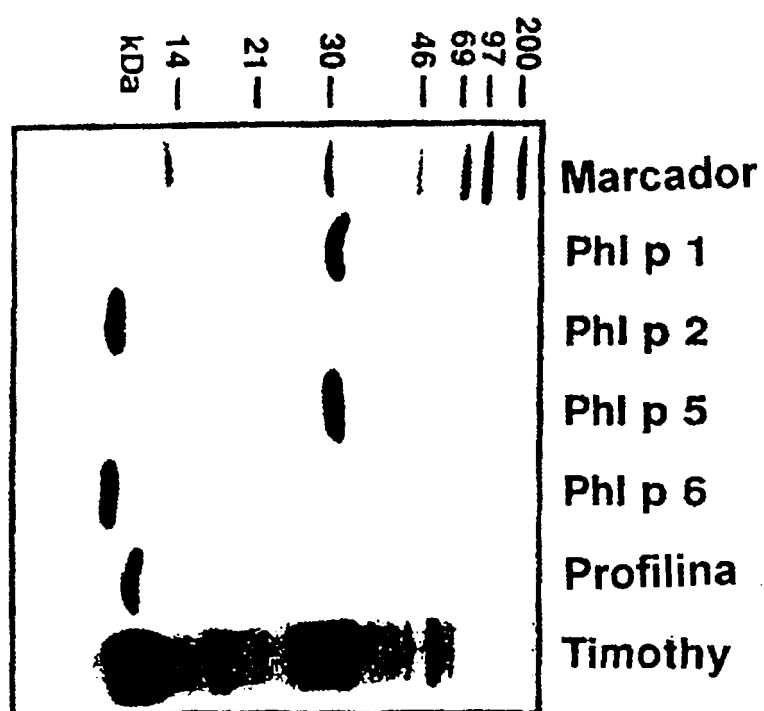


Figura 2A



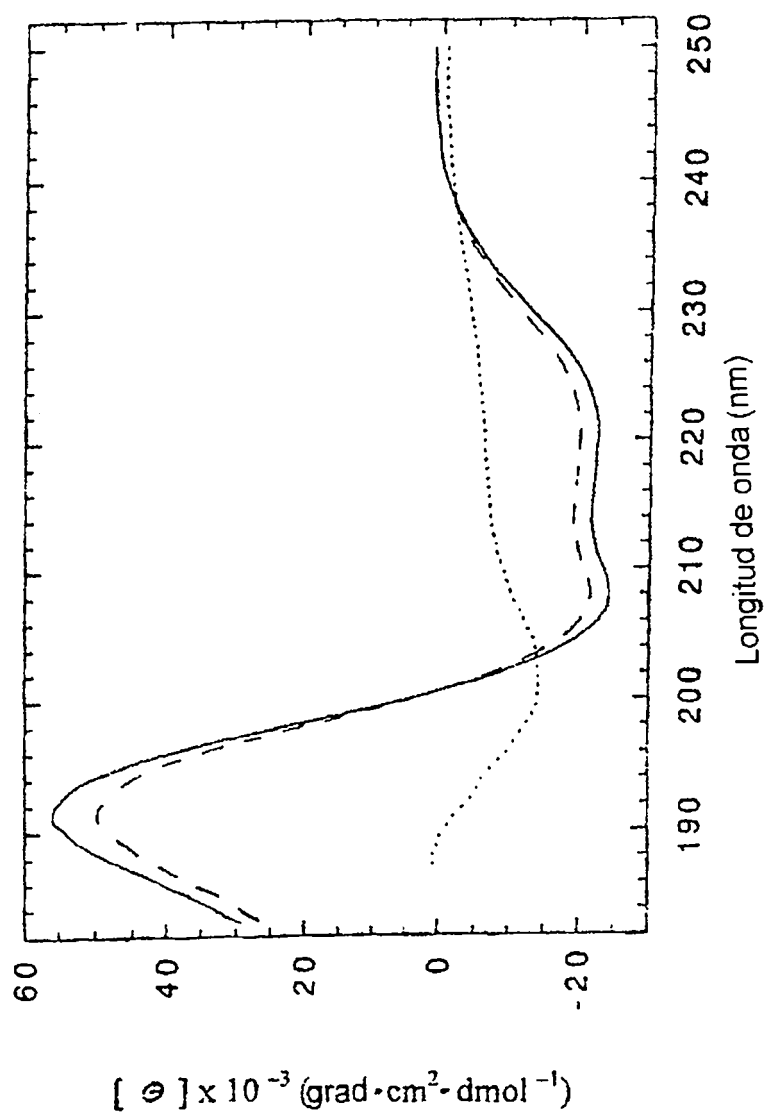


Figura 2B

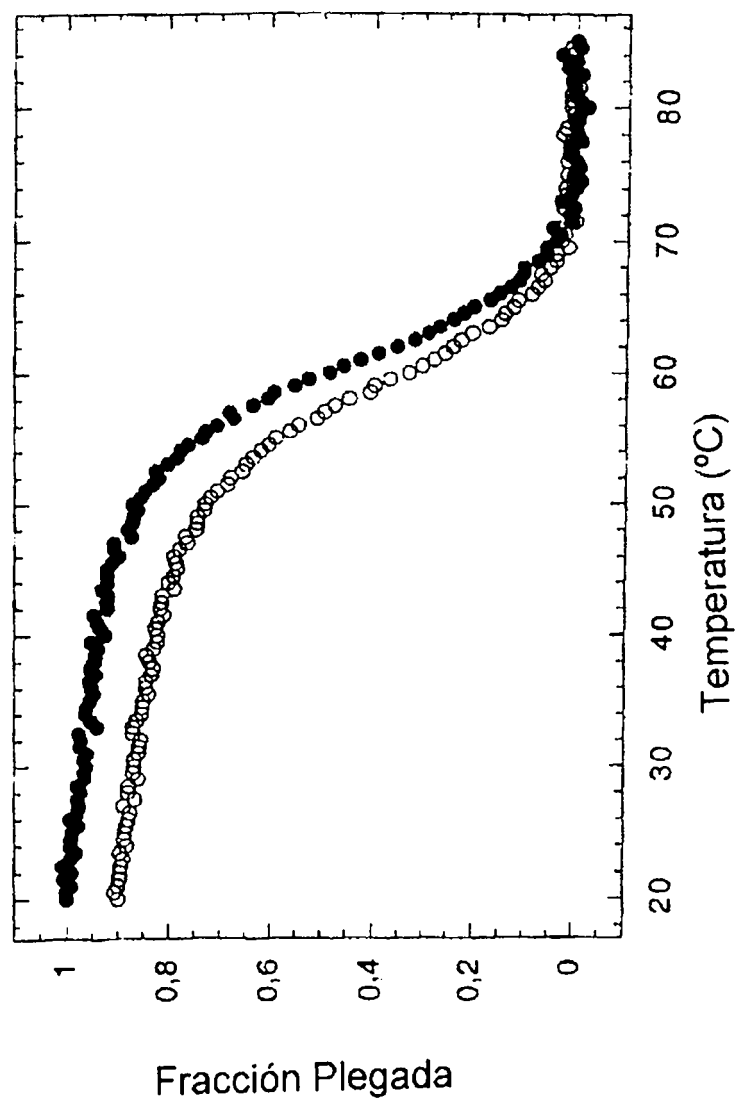


Figura 2C

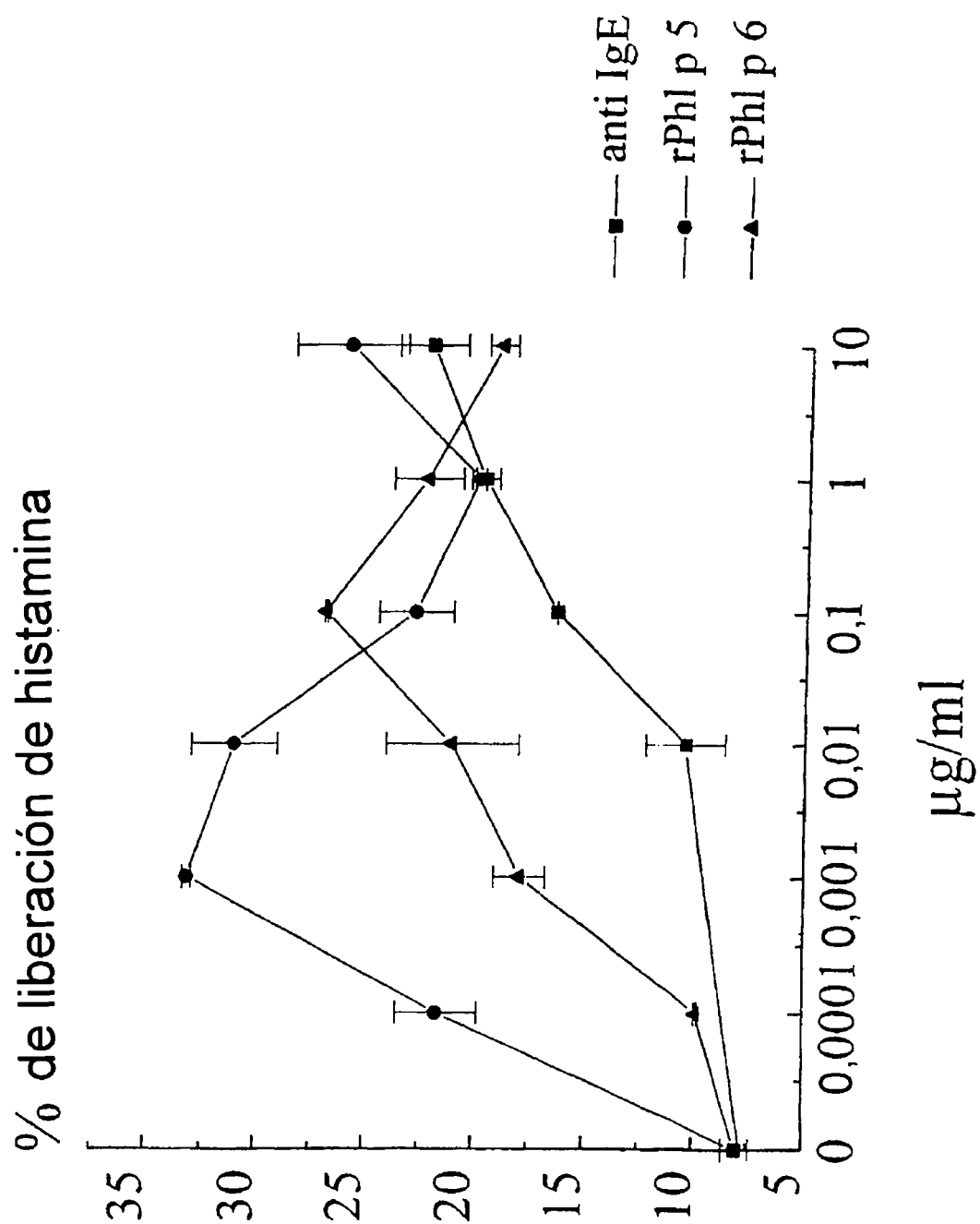


Figura 3A

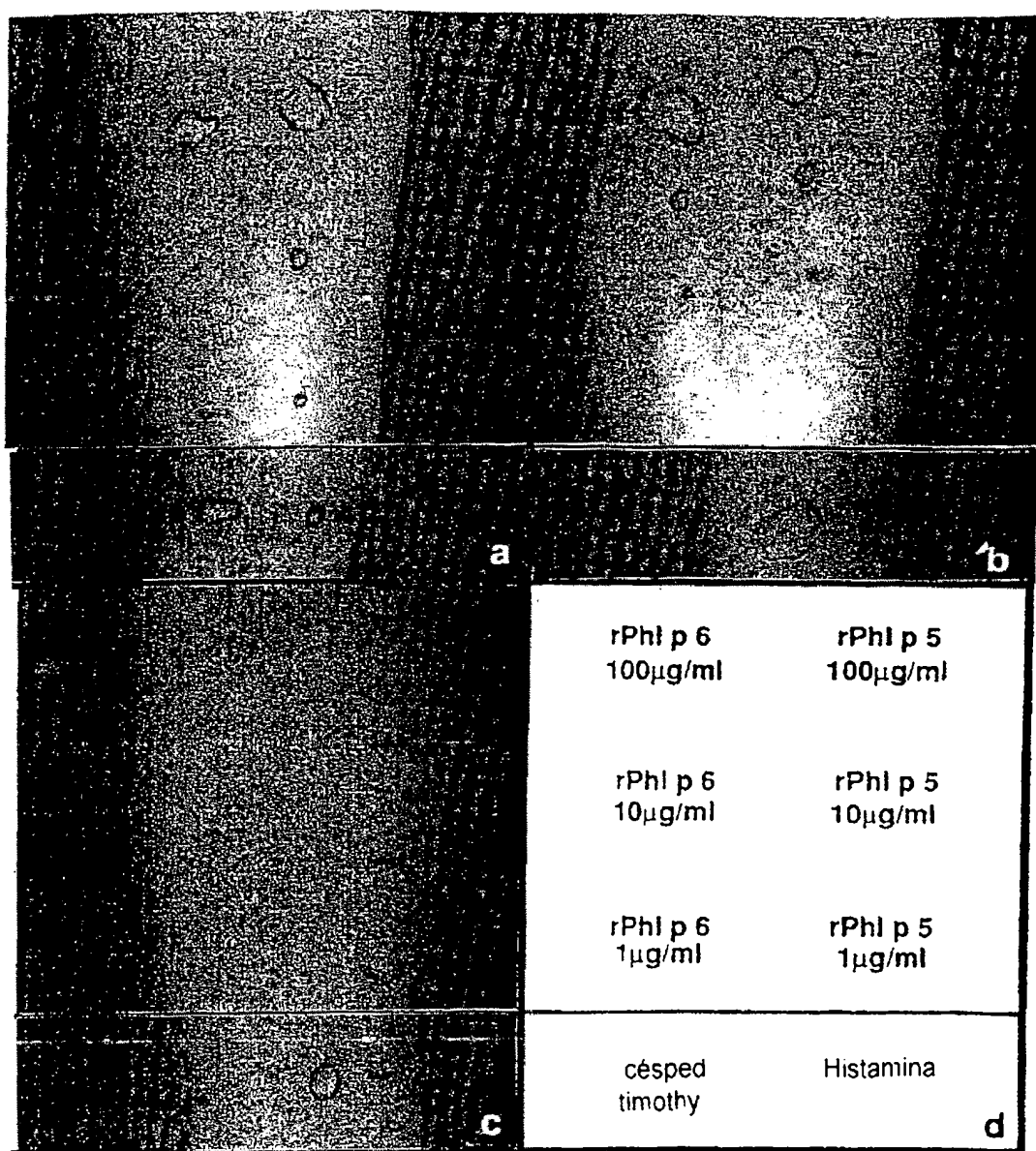


Figura 3B

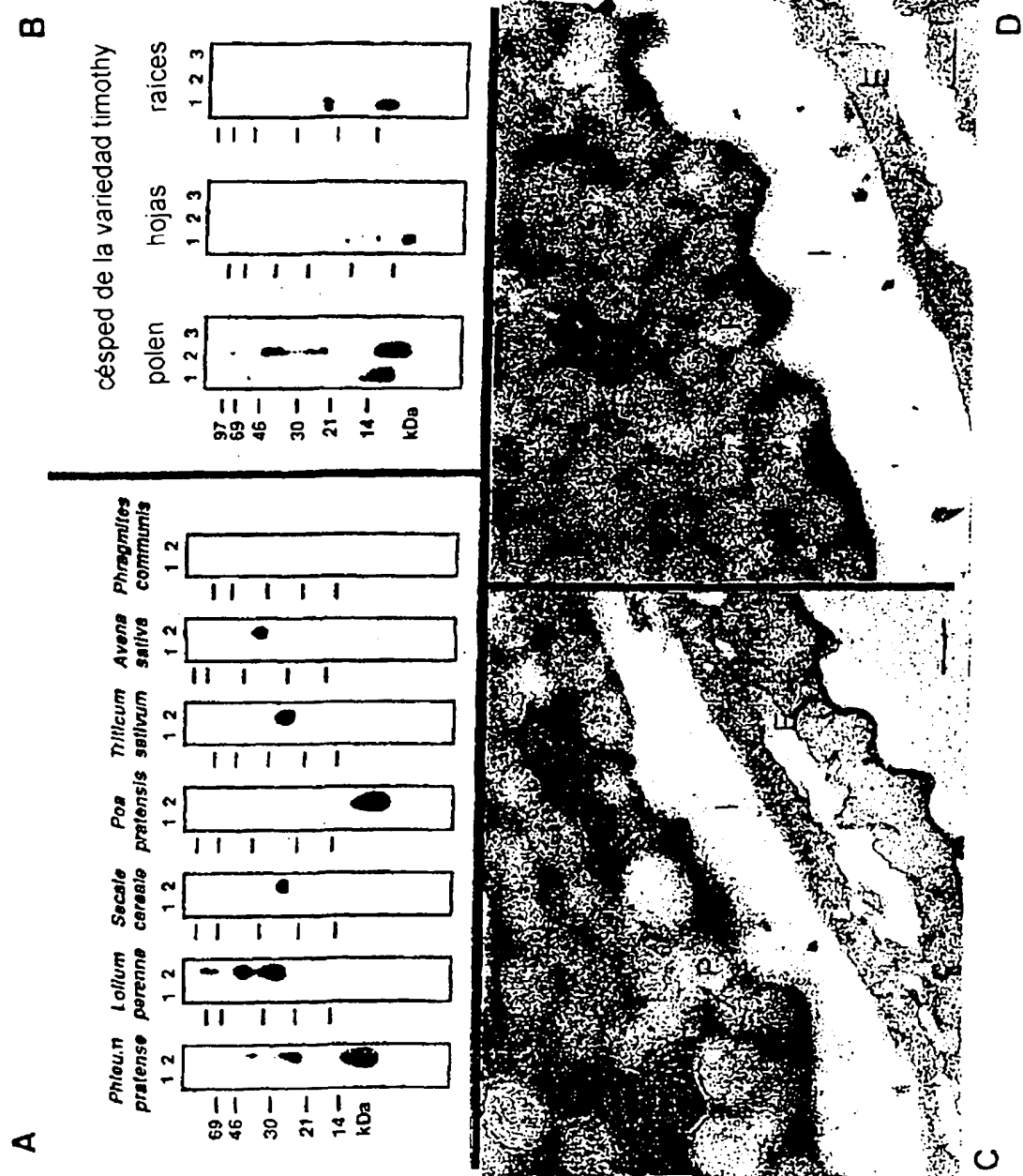


Figura 4

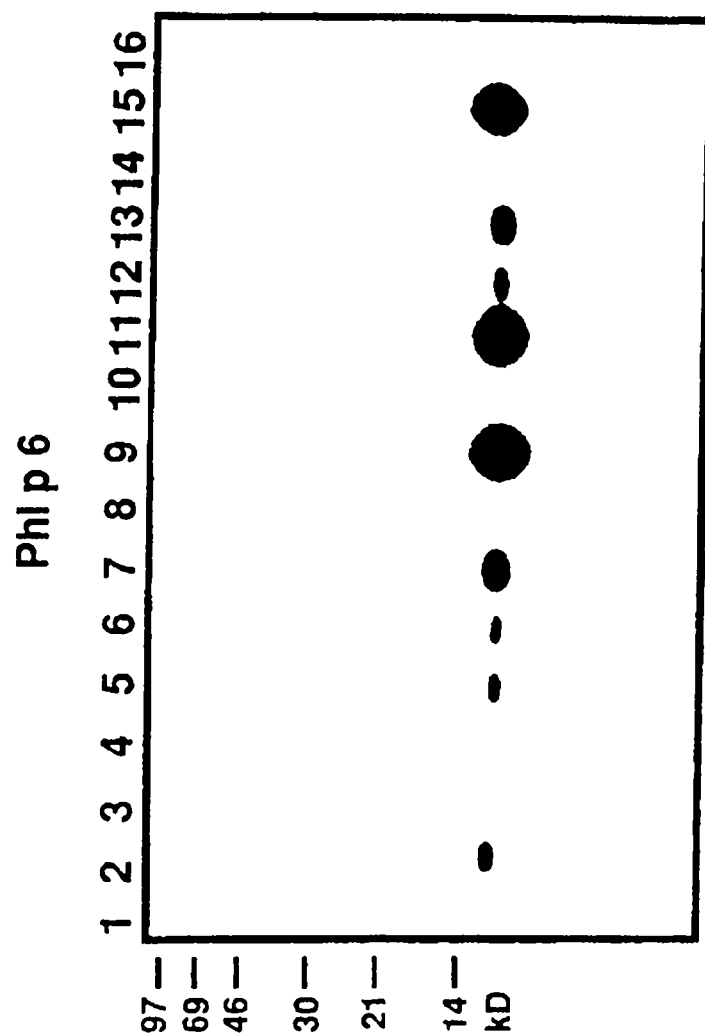


Figura 5A

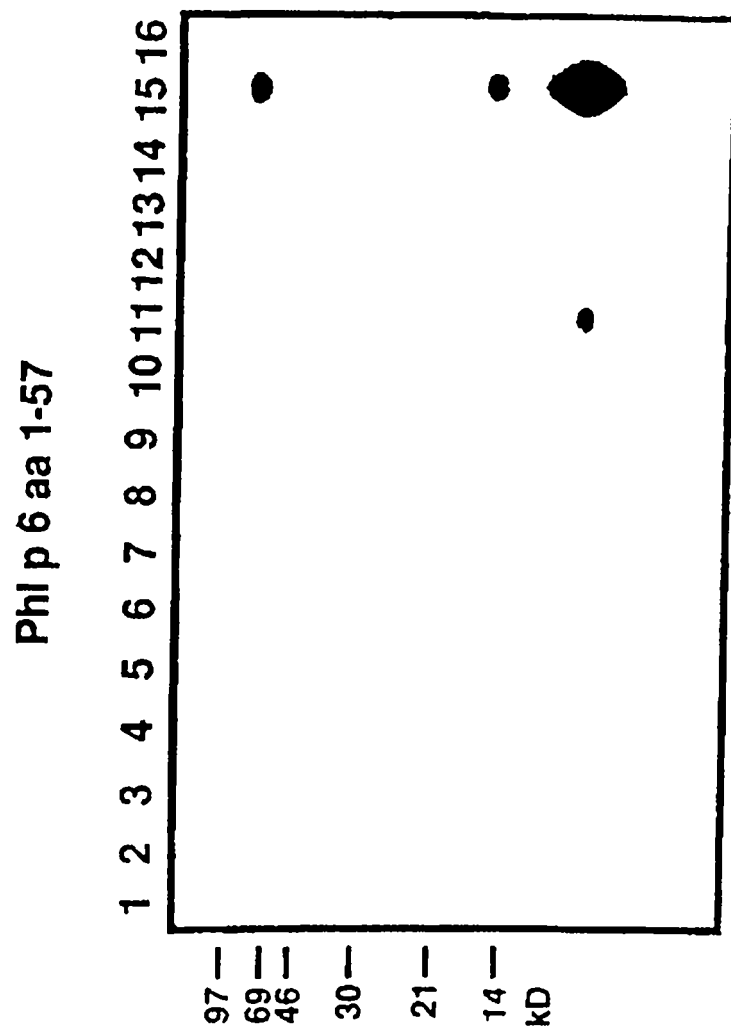


Figura 5B

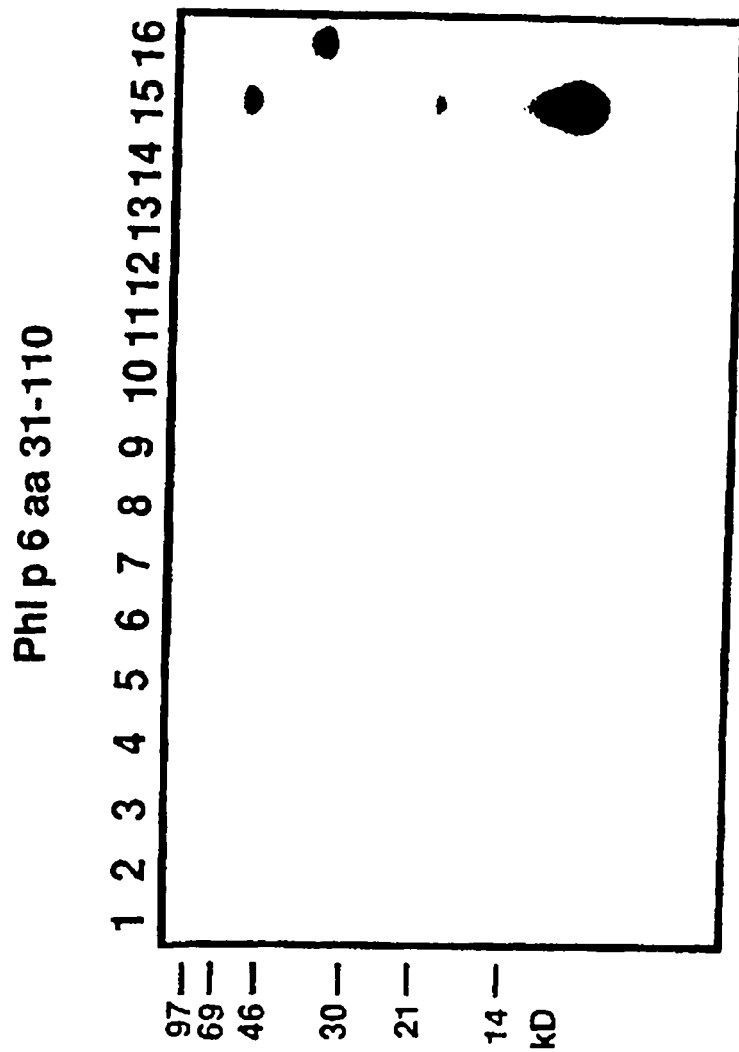


Figura 5C



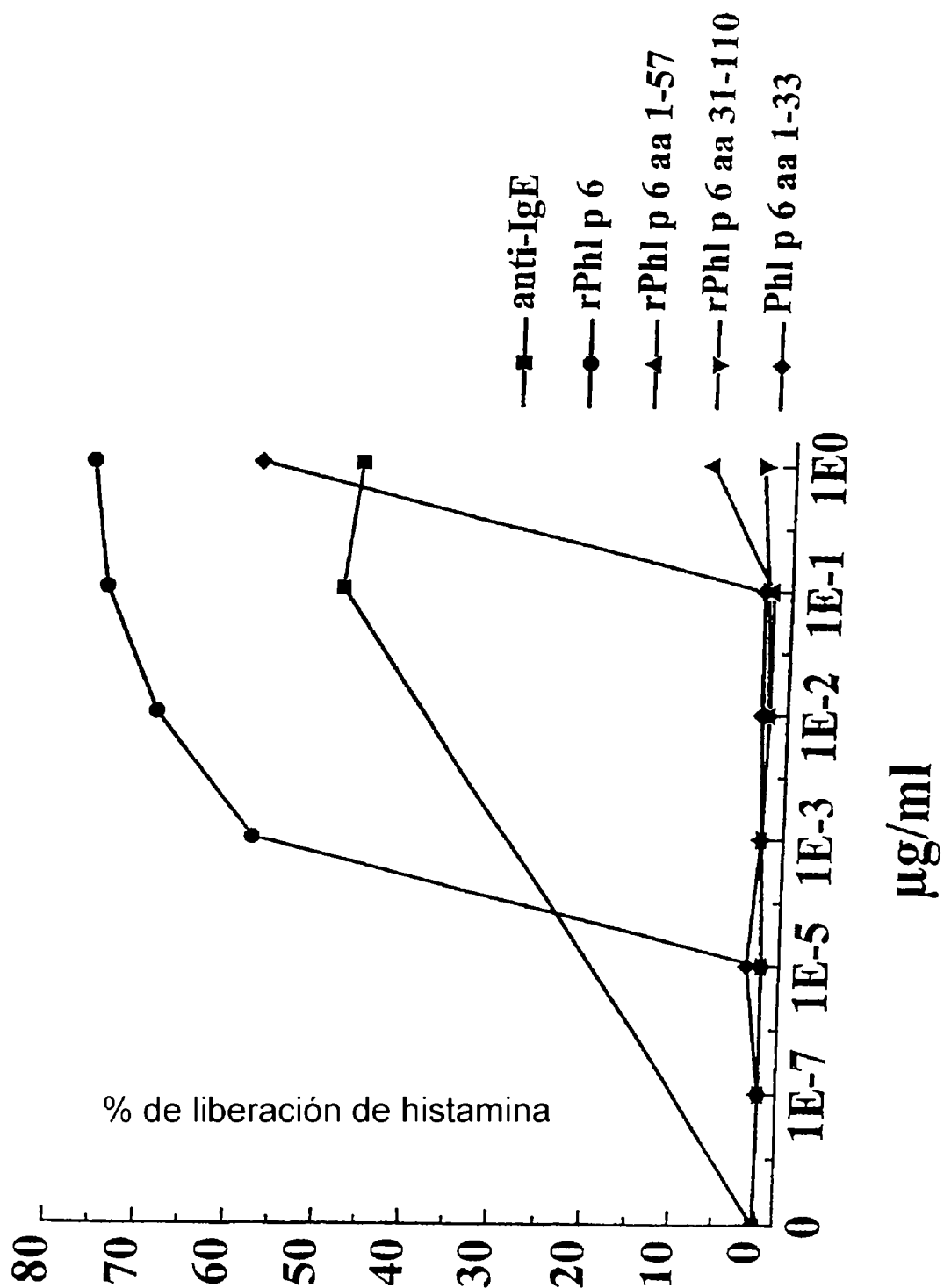


Figura 6