



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 246**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03745064 .0**
96 Fecha de presentación : **26.03.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1487869**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2004**

54 Título: **Alérgeno de polen novedoso.**

30 Prioridad: **27.03.2002 SE 2002100946**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.12.2010

73 Titular/es: **PHADIA AB.**
Box 6460
751 37 Uppsala, SE

72 Inventor/es: **Valent, Peter;**
Marknell Dewitt, Asa;
Sperr, Wolfgang;
Niederberger, Verena;
Lehtonen, Pirjo;
Spitzauer, Susanne;
Valenta, Rudolf y
Lidholm, Jonas

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 349 246 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Descripción**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un alérgeno novedoso de polen de fleo (*Phleum pratense*), Phl p11 y al uso del mismo como un reactivo y en un kit de diagnóstico así como para inmunoterapia.

Antecedentes de la invención

Un distintivo de la alergia atópica es la formación de anticuerpos de IgE para proteínas presentes en el material biológico sensibilizante. Después del contacto con la fuente de alérgeno, estas proteínas actuarán entrecruzando los anticuerpos de IgE presentes sobre la superficie de mastocitos, provocando de este modo la liberación de mediadores de inflamación tales como histamina. Como resultado tiene lugar una reacción alérgica (1).

En el mundo industrializado, hasta el 10% de la población humana muestra sensibilización alérgica a polen de gramíneas, haciendo del mismo una de las fuentes más importantes de alérgenos aéreos (2). Se han realizado esfuerzos considerables para la caracterización de alérgenos de polen de una diversidad de especies de gramíneas usando procedimientos bioquímicos e inmunológicos. Por tanto, se han identificado varias proteínas de unión a IgE que muestran una estructura conservada y reactividad cruzada serológica entre especies. En base a estos criterios, tales alérgenos de polen de gramíneas relacionados inmunológicamente se han asignados a grupos indicados por números. Éstos incluyen alérgenos del grupo 1, grupo 2/3, grupo 4 y grupo 5, que están representados en el polen de la mayoría de las especies de gramíneas (3).

Hasta la fecha se han clonado seis alérgenos diferentes de polen de fleo (*Phleum pratense*): Phl p 1 (4, 5), Phl p 2 (6), Phl p 5 (7-9), Phl p 6 (10, 11), Phl p 7 (12), Phl p 12 (profilina) (13) y Phl p 13 (14). Estos alérgenos se han producido todos como proteínas recombinantes que, por diferentes ensayos de actividad *in vitro* e *in vivo*, han mostrado que comparten propiedades inmunológicas y alergénicas con sus equivalentes nativos.

Usando un panel de cuatro alérgenos recombinantes (rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5 y profilina) en procedimientos de ensayo serológicos y cutáneos se obtuvieron resultados positivos en el 95% de una gran población de individuos alérgicos a polen de gramíneas (15). La sensibilización a alérgenos tales como Phl p 7 (una proteína de unión a calcio, de dos manos EF) y Phl p 12 tiene lugar en una menor proporción de alérgicos al polen de gramíneas, pero comparten epítopes de IgE con proteínas homólogas presentes en el polen de árboles y malas hierbas y, por lo tanto, pueden provocar síntomas de tipo inmediato en individuos sensibilizados después del contacto con estas fuentes de alérgenos no relacionadas (12, 16, 17).

Rossi y colaboradores (35) han medido recientemente los niveles de IgE específicos para varios alérgenos recombinantes, entre otros, Phl p 11. Sin embargo, la propia molécula de rPhl p 11 no se describe de ningún modo y Rossi y col. no proporcionan información sobre cómo producir rPhl p 11 o cualquier incentivo para usar el mismo en una composición farmacéutica.

Se desvela un procedimiento *in vitro* para diagnosticar alergia al alérgeno de polen de fleo Phl p 1 en el documento WO 95/34578, en el que se pone en contacto una muestra de líquido corporal con un polipéptido que presenta antigenicidad frente al menos un epítipo de Phl p 1 y se detecta un complejo que contiene anticuerpo y polipéptido.

El documento WO 99/34826 se refiere a un procedimiento para desensibilizar un paciente frente a un alérgeno polipeptídico que comprende administrar al paciente un péptido obtenido del alérgeno, en el que se puede demostrar restricción para una molécula de MHC de Clase II poseída por el paciente para el péptido y el péptido puede inducir una respuesta de fase tardía. Se sugieren varios alérgenos que se pueden usar como material de partida para encontrar péptidos útiles en el procedimiento de des-sensibilización, tales como Ph1 p 11 y Lol p 11.

Sumario de la invención

La presente descripción se refiere a un alérgeno novedoso de polen de fleo (*Phleum pratense*), Phl p 11. Aunque la mayoría absoluta de alérgicos al polen de gramíneas produce anticuerpos de IgE que se unen a alérgenos de polen de gramíneas del grupo 1 y grupo 5 - Phl p 1 y Phl p 5 en el caso de polen de fleo, un subconjunto de los pacientes también fabrican anticuerpos de IgE para una diversidad de otros componentes proteicos, tales como profilina, Phl p 7 o Phl p 11. Se piensa que estos pacientes tienen una actividad inmunológica más expansiva en su enfermedad alérgica, poniéndolos en un mayor riesgo de desarrollar reactividad química a un número creciente de fuentes de alérgenos (tales como pólenes de malas hierbas y árboles, descamaciones de gatos y perros, ácaros, etc.).

La profilina y Phl p 7 presentan una gran reactividad cruzada (verduras, frutas y pólenes de malas hierbas y árboles) y no son indicativos específicamente de la sensibilización a las proteínas de polen de gramíneas. Las estructuras de unión a anticuerpo presentes en Phl p 11, por otro lado, parecen ser específicas para polen de gramíneas y, por lo tanto, se pueden considerar un marcador de sensibilización multivalente a esta fuente de alérgeno particular, es decir, un marcador de propensión global aumentada a producir anticuerpos de IgE para sustancias ambientales. Se puede usar Phl p 11 recombinante para identificar el subconjunto de pacientes que están sensibilizados a estructuras polipeptídicas de Phl p 11 y sus homólogos en polen de otras especies de gramíneas. Aproximadamente la mitad de todos los pacientes

que muestran reactividad de IgE a esta proteína de polen según se dice tiene sus anticuerpos dirigidos a estructuras de glucano presentes en el alérgeno del grupo 11. Estas estructuras de glucano presentan reactividad cruzada en la naturaleza y los anticuerpos que se unen a los mismos pueden no ser informativos/diagnósticos en relación a la sensibilización específica de polen de gramíneas. La reactividad de IgE con rPhl p 11, por tanto, puede ser informativa con respecto al estado de diversificación inmunológica de la sensibilización alérgica de los pacientes al polen de gramíneas, independientemente de otras fuentes de alérgenos.

Como un reactivo de inmunoterapia definido, el Ph1 p 11 recombinante se puede usar para tratar específicamente pacientes sensibilizados provocando una respuesta inmune protectora o atenuante. La sustancia activa puede ser una proteína que comprende la secuencia polipeptídica natural ("tipo silvestre") o un derivado con propiedades de seguridad o eficacia mejoradas.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a moléculas de ADN que codifican el polipéptido con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N°: 1 de la lista de secuencias adjunta y en aspectos adicionales al asunto como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un polipéptido de Phl p 11 que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N°: 1 para la producción de un fármaco para inmunoterapia ("vacunación de alergia") de pacientes alérgicos al polen de gramíneas que muestran reactividad del anticuerpo de IgE a Phl p 11. Preferentemente, el uso es para inmunoterapia ("vacunación de alergia") de pacientes alérgicos al polen del fleo que muestran reactividad de anticuerpo de IgE a Phl p 11.

Descripción detallada de la invención

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. Identificación de Phl p 11 usando SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia de extracto de polen de *P. pratense*. A: Se redujo y separó extracto de polen por SDS-PAGE, seguido de tinción con Azul Brillante de Coomassie. La banda de proteína débil identificada como Phl p 11 se marca con una flecha. B: Análisis de inmunotransferencia de un gel duplicado, en el que se visualiza la unión de los anticuerpos de IgE en suero de un paciente. Carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: extracto de polen de *P. pratense*.

FIGURA 2. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida de ADNc de Phl p 11. Una fase de lectura abierta idéntica a todos los clones se ajustó de forma estrecha a la preferencia de codón obtenida de todos los genes de *P. pratense* publicados expresados en polen. Las secuencias de nucleótidos subrayadas representan los cebadores GSP-1 y

GSP-2. Las puntas de flecha abiertas indican las diferencias de nucleótidos entre los clones que se analizaron; los códigos de ambigüedad de nucleótidos convencionales se usan en esas posiciones. Se indica por un sombreado la variación de longitud de tramo de homopolímero entre los clones. La secuencia mostrada representa el más largo de cinco clones analizados, mientras que las puntas de flecha negras marcan dónde terminaron los otros ADNc en un tramo de poli-A. La secuencia de aminoácidos marcada por un subrayado continuo representa los 20 restos que se determinaron por microsecuenciación N-terminal de la proteína de polen natural. Un único sitio para glucosilación ligada a N potencial se indica por un subrayado discontinuo.

FIGURA 3. Alineamiento de secuencia de aminoácidos múltiple de Phl p 11 y proteínas relacionadas estructuralmente. Cada secuencia recuperada de la base de datos está precedida por su número de entrada: A54002 (*Lolium perenne*), 1815759 (*Phalaris coerulescens*), S31710 (*Oryza sativa*), P33050. En un aspecto adicional, la invención se refiere a un polipéptido de Ph1 p 11 producido de forma recombinante o sintetizado químicamente que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N°: 1. (*Zea mays*), 2765366 (*Betula pendula*), P13447 (*Lycopersicon esculentum*), 2832664 y 398899 (*Arabidopsis thaliana*), S43242 y S43244 (*Syringa vulgaris*), 3256212 (*Ligustrum vulgare*) y 926885 (*Olea europaea*). Todas las entradas se muestran por completo, excepto la secuencia de *A. thaliana* 2832664 que se truncó para mostrar solamente el dominio que se alinea con la familia de proteínas examinada en el presente documento. Las posiciones marcadas con x indican restos no identificados o atípicos. Las secuencias de tercera a octava incluyen un supuesto péptido líder N-terminal. Los guiones indican huecos introducidos para maximizar el número de restos de alineación.

FIGURA 4. Análisis de la expresión de Ph1 p 11 recombinante en *E. coli*. Una cepa de *E. coli* preparada para la expresión de una proteína de fusión MBP-Ph1 p 11 se cultivó hasta fase semilogarítmica y después se sometió a un cambio de temperatura para des-reprimir el sistema de expresión. Se prepararon muestras llevando a ebullición células sedimentadas en tampón de carga que contenía SDS y β -mercaptoetanol. Carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: muestra de preinducción, carril 3: recogida post-inducción, carril 4: muestra de proteína purificada. Las proteínas se visualizaron por tinción con Azul Brillante de Coomassie.

FIGURA 5. Inhibición de inmunotransferencia de la unión de IgE a proteínas de extracto de *P. pratense* inmovilizadas por rPhl p 11 soluble. El extracto de polen se redujo y se separó por SDS-PAGE y se realizó la electrotransferencia sobre membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con muestras de suero de dos sujetos alérgicos a polen de

gramíneas sensibilizados con Phl p11 (A y B), después de preincubación con BSA (carril 1), rPhl p 11 (carril 2) o MBP (carril 3).

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Reactivos generales, plásmidos, oligonucleótidos, cepas bacterianas y anticuerpos

5 Las sales y tampones se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO) y Fluka (Buchs, Suiza). El polen del fleo (*Phleum pratense*) se obtuvo de Pharmacia Allergon AB (Valinge, Suecia). El análisis de proteína por SDS-PAGE se realizó usando geles de Tris-glicina al 4-20% (Novex, San Diego, CA) y para la electrotransferencia se usó membrana Hybond-C Extra (Amersham Life Science, Amersham, RU). Para el análisis de inmunotransferencia de la unión de IgE se usaron antisuero de conejo anti-IgE (MIAB, Uppsala, Suecia) e IgG de burro anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano rusticano (Amersham Life Science) seguido de detección por ECL (Amersham Life Science). Se realizaron la preparación de ARN poliadenilado del ARN total y la síntesis posterior de ADNc para RT-PCR usando el Kit de Purificación de ARNm y el Kit de Síntesis de Primera Cadena de ADNc, ambos de Amersham Pharmacia Biotech

10 (Uppsala, Suecia). Los plásmidos pET-23a(+) y pMAL-c2 se adquirieron en Novagen (Madison, WI) y New England Biolabs (Beverly, MA), respectivamente. Las endonucleasas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *NdeI* y *XhoI*, así como ADN polimerasa de *Taq* y desoxinucleótidos eran de Amersham Pharmacia Biotech. La ADN polimerasa de *Pfu* se adquirió en Stratagene (La Jolla, CA). El ADN de la PCR y otras reacciones enzimáticas se purificó usando kits Wizard apropiados de Promega (Madison, WI). Para la captura en fase sólida de productos de PCR biotinilados se usaron perlas magnéticas modificadas con estreptavidina (M-280) de Dynal AS (Skøyen, Noruega). Para la preparación de plásmido a gran escala se usó el Kit Plasmid Maxi de Qiagen (Düsseldorf, Alemania). Los oligonucleótidos se obtuvieron de Scandinavian Gene Synthesis (Köping, Suecia). La secuenciación de ADN se realizó usando el Kit de

15 Secuenciación de T7 de Amersham Pharmacia Biotech y [α -³⁵S]dATP de Amersham Life Science. Las cepas de *E. coli* usadas fueron XL1-Blue MR (Stratagene) para fines de clonación y BL21 (Novagen) que alberga el plásmido pT7POL23 (18) para la expresión. Se usaron columnas HiTrap Chelating (Amersham Pharmacia Biotech) para cromatografía de afinidad de ión metálico inmovilizado (IMAC). Se realizaron intercambio de tampón y cromatografía de exclusión por tamaño de preparaciones proteicas usando un sistema FPLC y columnas llenas con Sephadex G-25 y Superdex 75, respectivamente (Amersham Pharmacia Biotech). La serología cuantitativa para el alérgeno recombinante se estableció usando el Pharmacia CAP System (Pharmacia Diagnostics), empleando reactivos y procedimientos recomendados por el proveedor. Para la detección de IgE en experimentos de inhibición de inmunotransferencia se usó un anticuerpo de IgE anti-humano marcado con ¹²⁵I de Pharmacia Diagnostics. La

20

25

30

35

liberación de histamina de granulocitos aislados de individuos alérgicos y sanos se midió por un radioinmunoensayo (Immunotech, Marseille, Francia). Como un control positivo para la capacidad de liberación de histamina de las células se usó el anticuerpo monoclonal anti-IgE E124.2.8 Dc2 (Immunotech). La histamina y la solución de cloruro sódico para ensayos de punción cutánea se obtuvieron de ALK (Hørsholm, Dinamarca).

Muestras de pacientes

En este estudio se examinó un total de 188 sujetos alérgicos a polen de gramíneas o muestras de suero. Ciento cincuenta muestras de suero eran de una colección local en Pharmacia Diagnostics, seleccionada en base a la sensibilización de IgE a *P. pratense*. Treinta y ocho sujetos eran de una clínica de Viena y estaban caracterizados por una historia clínica indicativa de alergia al polen de gramíneas, resultado RAST positivo para polen de fleo y ensayo de punción cutánea positivo al extracto de polen de gramíneas. Los perfiles de sensibilización a alérgeno de estos sujetos se establecieron con alérgenos del polen de fleo naturales y recombinantes como se ha descrito (19). Se incluyeron muestras de suero de dos individuos no alérgicos con fines de control.

Extractos de proteína, SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia

Se extrajo polen de *Phleum pratense* a temperatura ambiente durante 2 h en 5 ml de agua destilada por gramo de polen. Después de centrifugación durante 5 min a 13000 x g, el sobrenadante claro se dividió en pequeñas alícuotas y se almacenó a -20°C hasta el uso. El extracto de polen se sometió a SDS-PAGE reductora y se tiñó con Azul Brillante de Coomassie o se sometió a electrotransferencia sobre membrana de nitrocelulosa. Las transferencias de proteínas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente usando Tween-20 al 1% (v/v) en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM) o leche en polvo desnatada al 5% (p/v) en PBS y después se incubaron durante una noche con suero de paciente diluido cinco veces en PBS que contenía Tween-20 al 0,1%. Después del lavado en el mismo tampón, se visualizó la IgE unida usando un antisuero de conejo anti-IgE seguido de IgG de burro anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano rústico y detección por ECL.

Secuenciación de proteína

Se identificó una banda de proteína de unión a IgE que se correspondía con Phl p 11 por inmunotransferencia usando una muestra de suero esencialmente monorreactiva. La banda se separó de un gel de SDS-poliacrilamida teñido con Azul Brillante de Coomassie, se homogeneizó y se extrajo en clorhidrato de guanidinio 6 M. Después de la retirada de los fragmentos de poliácridamida por centrifugación, la proteína extraída se sometió a 20 ciclos de secuenciación desde el extremo N usando un instrumento Hewlett-Packard G1000A.

Clonación y caracterización de ADNc de Phl p 11

Se aisló ARN poliadenilado del ARN total de polen de *Phleum pratense*, preparado por el procedimiento de isotiocianato de guanidinio de Chirgwin y col. (20). Se generó ADNc de Phl p 11 por 3'-RACE, realizada esencialmente de acuerdo con Frohman (21) y RT-PCR, usando ADN polimerasa de *Pfu* clonada a lo largo del experimento. Todas las reacciones de

5 termociclado se realizaron en las siguientes condiciones de reactivo: Tris-HCl 20 mM pH 8,8, KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM, MgSO_4 2 mM, BSA 0,1 mg/ml, Triton X-100 al 0,1%, DMSO al 10%, dNTP 0,4 mM y cebadores a 0,5 μM cada uno.

La primera cadena de ADNc se sintetizó a partir de ARN poli-A⁺ purificado usando el cebador 5'-CCA GTG AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GC(T)₁₈-3' (Q_T). Para la

10 3'-RACE se usaron dos cebadores directos específicos anidados GSP-1 (5'-CAT TAC ATA TGG ACA AGG GCC CSG GCT TCG TSG TSA C -3') y GSP-2 (5'-CAT GAA TTC GGA CGC GTC TAC TGC GAC-3'), junto con los dos cebadores inversos universales anidados Q₀ (5'-CCA GTG AGC AGA GTG ACG-3') y Q_I (5'-GAG GAC TCG AGC TCA AGC-3'). Los cebadores GSP-1 y GSP-2 se diseñaron a partir de la secuencia de aminoácidos N-terminal de la proteína

15 Ph1 p 11, mientras que los cebadores Q₀ y Q_I eran idénticos a partes adyacentes del cebador de síntesis de ADNc Q_T.

Para generar un molde enriquecido en Ph1 p 11 para 3'-RACE, se sintetizó la segunda cadena de ADNc por 40 ciclos de extensión con cebador de GSP-1 biotinilado usando la primera cadena de ADNc como molde. El perfil de ciclado usado fue: 95°C/5 min, seguido de

20 40 ciclos de 95°C/60 s, 58°C/60 s, 72°C/90 s. Después, el producto de esta reacción se inmovilizó sobre perlas magnéticas modificadas con estreptavidina y se lavó con NaOH 0,1 M y TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). En la primera ronda de 3'-RACE se usó una muestra de segunda cadena de ADNc inmovilizada y cebadores GSP-1 y Q₀ en el perfil de ciclado: 95°C/5 min, seguido de 40 ciclos de 95°C/1 min, 72°C/2 min. Un μl de una dilución de

25 20 veces de esta reacción se usó como un molde junto con los cebadores GSP-2 y Q_I en la segunda ronda de 3'-RACE, con el perfil de ciclado: 95°C/5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C/60 s, 58°C/60 s, 72°C/90 s. Los cebadores GSP-2 y Q_I se diseñaron para incorporar sitios *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente, en los extremos del producto de amplificación. Después de la purificación y escisión con estas enzimas, el producto se clonó entre los sitios *EcoRI* y *HindIII*

30 de pBR322 (22). Se sometieron cinco clones candidatos a secuenciación de ADN, poniendo de manifiesto una única fase de lectura abierta correspondiente a Phl p 11.

La amplificación de la secuencia codificante de Phl p 11 de longitud completa de la segunda cadena de ADNc inmovilizada se realizó usando el cebador GSP-1 y el cebador inverso PP11/R-X (5'-AGT CAC TCG AGT GGC GTC TCG GGG GCG TC-3') que se basaba

35 en el extremo 3' de la fase de lectura abierta de Ph1 p 11. Estos dos cebadores estaban

diseñados para incorporar sitios terminales *NdeI* y *XhoI*, respectivamente, en el producto de PCR. El perfil de termociclado usado en esta reacción era el mismo que en la ronda dos del experimento 3'-RACE. El producto de amplificación, purificado y digerido con *NdeI* y *XhoI*, se clonó entre los sitios *NdeI* y *AhoI* de un derivado de pET-23 a(+) diseñado para la expresión del gen de interés como una fusión con la proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli*. La construcción de longitud completa resultante para la expresión se verificó por secuenciación de ADN.

Se realizaron análisis de secuencia de ADN y de aminoácidos, incluyendo traducciones, predicciones de propiedad de proteína y comparaciones de secuencia, usando programas del Wisconsin Package (Genetics Computer Group, Madison, WI.).

Expresión y purificación de rPh1 p 11

El alérgeno de *P. pratense* se expresó en *E. coli* como fusión con MBP. El ADN plasmídico de un clon seleccionado se introdujo en la cepa BL21 que alberga el plásmido pT7POL23 que proporciona ARN polimerasa de T7 de un modo controlado rigurosamente, dependiente de temperatura (18). Se inoculó medio LB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, ajustado a pH 7,0 usando NaOH 1 M) 1:500 con un cultivo de una noche y se cultivó en primer lugar a 30°C hasta fase semilogarítmica. Después, la temperatura de incubación se aumentó a 42°C durante 1 h, seguido de 4 h a 30°C antes de la recogida. Las células se recolectaron por centrifugación a 10000 x g durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en 5 ml de tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, β -mercaptoetanol 100 mM, imidazol 5 mM) por gramo (peso fresco) de células. Las células resuspendidas se rompieron por sonicación mientras que se mantuvieron en hielo, seguido de centrifugación para eliminar el material sólido. Después del cambio al tampón B (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, β -mercaptoetanol 5 mM) que contenía imidazol 5 mM usando Sephadex G-25, el sobrenadante se cargó en una columna de 5 ml HiTrap Chelating cargada con Ni^{2+} para IMAC. La columna se lavó con imidazol 20 mM en tampón B y se realizó la elución con un gradiente de 20-250 mM de imidazol en tampón B. Las fracciones que contenían la proteína de fusión eluida se agruparon y sometieron a una etapa final de cromatografía de exclusión por tamaño por Superdex 75, equilibrado con tampón no reductor, para obtener una preparación homogénea, no agregada sin contaminación visible por proteínas de *E. coli*. Para servir como un control negativo en estudios funcionales, la MBP sola se expresó a partir de células BL21[pT7POL23] que albergaban el vector de expresión sin inserto y la proteína purificada como anteriormente, excepto que se usó el tampón B que contenía imidazol 5 mM en lugar del tampón A en la fase de homogenización celular. La concentración de MBP-Ph1 p 11 y MBP en las preparaciones finales se determinó a partir de su absorbancia a 280 nm, usando coeficientes de extinción calculados de 1,30 y 1,47 por mg/ml, respectivamente.

Evaluación de actividad de unión a IgE de rPh1 p 11 usando el Pharmacia CAP System

Se examinó la actividad de unión de IgE *in vitro* del alérgeno recombinante purificado en el Pharmacia CAP System, un sistema de inmunoensayo usado para la detección de anticuerpo de IgE en diagnóstico clínico de alergia atópica. Se prepararon ensayos experimentales de ImmunoCAP mediante inmovilización covalente del alérgeno purificado sobre celulosa activada a una concentración elegida para conseguir un intervalo de medición lineal adecuado y un fondo para sueros negativos de forma adecuada por debajo del valor de corte convencional de 0,35 kraal. Se prepararon ensayos de control negativo que llevaban solamente MBP usando la misma concentración de proteína en la inmovilización. Para la determinación de IgE específica para el complemento completo de proteínas de polen de *P. pratense* natural, se usó el ensayo ImmunoCAP basado en el extracto del polen habitual. Para el fin de la comparación con un alérgeno recombinante establecido previamente, todos los ensayos de suero se realizaron en paralelo con ensayos ImmunoCAP de rPhl p2. Los controles de ensayo y el cálculo de los parámetros estadísticos para atestiguar la calidad de los ensayos se realizaron usando rutinas del sistema de ensayo y software convencionales (Pharmacia Diagnostics).

Análisis de inmunotransferencia de propiedades de unión a IgE de rPhl p 11

La proporción de IgE específica de polen de fleo dirigida contra rPh1 p 11 y rPh1 p 5 se investigó por un experimento basado en inhibición RAST. Las muestras de suero de 10 sujetos reactivos a rPh1 p 11 se diluyeron 1:10 en tampón C (fosfato sódico 50 mM pH 7,5, Tween 20 al 0,5% (v/v), BSA al 0,5 (p/v), NaN₃ al 0,05% (p/v) y se preadsorbieron durante una noche a 4°C con rPh1 p 11, MBP (control negativo) o rPh1 p 5 (control positivo), todos a una concentración final de 10 µg/ml. Para garantizar las condiciones de exceso de antígeno sobre la fase sólida, aproximadamente 0,2 mg de extracto de proteína de polen de fleo natural se inmovilizaron en tiras de nitrocelulosa de exactamente el mismo tamaño (0,6 x 3 cm). Las tiras se bloquearon por preincubación con tampón C (una vez durante 1 hora y dos veces durante 5 minutos) y después se expusieron a los sueros preadsorbidos a 4°C durante una noche. Al día siguiente, las tiras se lavaron cuatro veces en tampón C y después se sondaron con anticuerpo de IgE anti-ser humano marcado con ¹²⁵I a temperatura ambiente durante una noche. Las tiras se volvieron a lavar cuatro veces en tampón C y se secaron. Se determinó la cantidad de anticuerpo de IgE anti-ser humano marcado con ¹²⁵I usando un contador gamma (Wallac, Turku, Finlandia). Se calculó el porcentaje de inhibición de la unión de IgE después de la preincubación de sueros con rPh1 p 5 o rPh1 p 11 del siguiente modo: % de inhibición = 100-100 x (cpm rPhl p 5/cpm MBP o rPhl p 11/cpm MBP). La capacidad del alérgeno recombinante para unirse a anticuerpos de IgE específicos de Phl p 11 se estudió por experimentos de inhibición de inmunotransferencia de IgE (17). Los sueros de dos sujetos alérgicos a polen de gramíneas con reactividad de IgE para rPhl p 11 se

preadsorbieron con rPhl p 11 purificado a 10 µg/ml de suero o, para fines de control, con una concentración igual de MBP o BSA. Los sueros preadsorbidos se expusieron a proteínas de polen de fleo transferidas a nitrocelulosa separadas por SDS-PAGE y se detectó la IgE unida como se ha descrito (17).

5 *Experimentos de liberación de histamina*

Los granulocitos se aislaron por sedimentación con dextrano de muestras de sangre heparinizadas (23, 24) de dos individuos alérgicos a polen de gramíneas y uno no alérgico. Las alícuotas de células lavadas se incubaron con una diversidad de concentraciones (0,001 µg/ml, 0,41 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml) o rPhl p 11 purificado, MBP y un anticuerpo anti-IgE monoclonal. La histamina liberada al sobrenadante se midió por radioinmunoensayo. Se determinó la histamina total después de la congelación-descongelación de las células. Los resultados se presentaron como valores medios de determinaciones por triplicado y representan el porcentaje de histamina total.

Ensayo cutáneo

Después de que se obtuviera un consentimiento informado de dos individuos alérgicos a polen de gramíneas y cuatro no alérgicos, se realizaron ensayos de punción cutánea en sus antebrazos como se ha descrito (25). A los individuos se les pincharon alícuotas de 20 µl de soluciones que contenían diferentes concentraciones (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) de rPhl p 11 purificado y MBP y extracto de polen de fleo, histamina y cloruro sódico. Las reacciones cutáneas se registraron 20 minutos después de la aplicación de la muestra por fotografía y transfiriendo un trazado con bolígrafo del área del habón a papel usando cinta adhesiva. Los diámetros medios de habón (Dm) se determinaron del siguiente modo: $Dm = 0,5 \times (D1 + D2)$, en la que D1 y D2 representan el mayor diámetro longitudinal y transversal en mm, respectivamente.

RESULTADOS

Detección inmunoquímica, aislamiento y secuenciación de proteína de Phl p 11 natural

El análisis de inmunotransferencia de suero de un sujeto alérgico a polen de gramíneas, que carecía de anticuerpos de IgE frente a todos los alérgenos purificados o recombinantes de *P. pratense* disponibles actualmente (rPhl p 1, rPhl p 2, nPhl p 4, rPhl p 5, rPhl p 6, rPhl p 7 y rPhl p 12), puso de manifiesto una unión de IgE predominante a una única banda de proteína a aproximadamente 20 kDa. Una banda débil en SDS-PAGE teñida con Coomassie se alineó perfectamente con la banda reactiva con IgE en el análisis de inmunotransferencia (Fig. 1), aunque una proteína más abundante de un tamaño ligeramente menor no se pudo descartar de modo inequívoco. La proteína de estas dos bandas se extrajo por separado y una parte de cada una se aplicó a membrana de nitrocelulosa para análisis de transferencia puntual. La incubación con suero reactivo y la detección de IgE posterior permitió una identificación positiva de la banda

de PM ligeramente mayor que la diana para anticuerpos de IgE presentes en la muestra de suero (no mostrado). La proteína extraída se sometió a secuenciación N-terminal y se obtuvo la siguiente determinación de 20 restos: DKGPFGVVTGRVYCDPCRAG. Una búsqueda en base de datos para secuencias homólogas puso de manifiesto una coincidencia exacta con el alérgeno de césped inglés Lol p 11, purificado previamente y secuenciado en aminoácidos por van Ree y col. (26).

Clonación de ADNc y análisis de secuencia de Phl p 11

Después de la traducción inversa de la secuencia de aminoácidos N-terminal a ADN, usando la preferencia de codón observada en otros genes expresados en polen de *P. pratense*, se diseñaron dos cebadores de PCR directos anidados (GSP-1 y GSP-2) para su uso en 3'-RACE y RT-PCR. La primera cadena de ADNc se sintetizó a partir de una preparación de ARN poli-A⁺, usando un cebador oligo-dT universal que llevaba la secuencia diana terminal para dos cebadores de PCR inversos anidados, Q_O y Q_T, a usar en etapas posteriores de amplificación. Se usó la segunda cadena de ADNc enriquecida específicamente, generada por 40 ciclos de extensión con cebador de GSP-1 en la primera cadena de ADNc, como un molde en la primera ronda de 3'-RACE, realizada con los cebadores GSP-1 y Q_O. En una segunda ronda, 1/1000 de la reacción de la primera ronda se usó como un molde junto con los cebadores GSP-2 y Q_I. El análisis de esta reacción por electroforesis en gel de agarosa puso de manifiesto dos bandas distintas de intensidad similar, de tamaño aproximadamente 700 y 800 pb (no mostrado). El uso de temperatura de hibridación aumentada no cambió el aspecto del producto de la segunda ronda de 3'-RACE. Por lo tanto, el producto de banda doble se consideró provisionalmente genuino y específico. El producto se clonó y los transformantes que albergaban insertos que coincidían con ambos tamaños de fragmentos se identificaron y analizaron por secuenciación de ADN. Los cinco clones examinados contenían insertos de secuencia prácticamente idéntica y parecía que la diferencia de tamaño entre las dos bandas observada después de la segunda ronda de 3'-RACE se debía a sitios alternativos para el cebado de la síntesis de ADNc (Fig. 2), posiblemente como resultado de heterogeneidad en el sitio de poliadenilación del transcrito. Todos los clones contenían una fase de lectura abierta idéntica con un uso de codón que coincidía bastante con el de los genes conocidos previamente expresados en polen de *P. pratense*. Más allá del codón de detención observado, ninguna de las tres fases de lectura directa presentó codones que cumplieron este criterio. Para obtener un ADNc que codificara el polipéptido de longitud completa se realizó una reacción de RT-PCR usando el cebador director GSP-1 y el cebador inverso PP11/R-X, diseñado el último a partir del extremo 3' de la fase de lectura abierta. El producto de esta reacción, que apareció como una única banda en electroforesis en gel de agarosa, se clonó en un vector de expresión y se confirmó su secuencia.

La fase de lectura abierta del ADNc definió un polipéptido de 143 restos aminoacídicos con un punto isoeléctrico calculado de 4,8, una masa molecular de 15,8 kDa y un sitio potencial para glucosilación ligada a N (Fig. 2). Una búsqueda de similitud a través de las bases de datos disponibles en NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) identificó proteínas de polen de una diversidad de especies vegetales mono- y dicotiledóneas con homología de secuencia con el polipéptido deducido a partir de la secuencia de ADNc. Éstas incluían *Lolium perenne* (césped inglés), *Phalaris coerulescens* (alpiste), *Oryza sativa* (arroz), *Zea mays* (maíz), *Betula pendula* (abedul), *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Olea europaea* (aceituna), *Syringa vulgaris* (lila) y *Ligustrum vulgare* (alheña). El nivel de identidad de secuencia de aminoácidos dentro de esta familia de proteínas de polen varió del 32% al 95% y un alineamiento, que expone predicciones de estructura secundaria y características conservadas, se muestra en la Fig. 3. A partir de las comparaciones de secuencia es evidente que el alérgeno de *P. pratense* es un equivalente del alérgeno de *L. perenne* Lol p 11 y, por lo tanto, se debería denominar Phl p 11.

La diferencia más evidente en la estructura principal observada entre Phl p 11 y Lol p 11 (Nº de entrada de secuencia A54002) era un tramo de nueve restos aminoacídicos adicionales (-DLRDAPETP) en el extremo C de Phl p 11, equivalente a un aumento de 1,0 kDa en la masa molecular. En comparación con el homólogo de *L. perenne*, la secuencia de Phl p 11 contenía un total de seis sustituciones de aminoácidos, cuatro de las cuales eran no conservativas (D42N, K56G, D57L, K83T). En la posición 103, que no se determinó en el caso de Lol p 11, un resto de asparagina estaba presente en la secuencia de Phl p 11. Los dos homólogos mostraron conservación de un sitio potencial para glucosilación ligada a N (resto 24) y seis restos de cisteína.

Como se mostró previamente por Van Ree y col. (26), los alérgenos de polen de gramíneas del grupo 11 están relacionados estructuralmente con el inhibidor de tripsina de soja y, por lo tanto, pueden presentar estructuras antigénicas similares a las proteínas que pertenecen a esta familia. Muy recientemente se han descrito alérgenos estructuralmente relacionados de alpiste pajarero, *Plantago lanceolata*, (Pla 11) y armuelle, *Chenopodium album*, (Che a 1) (27, 28).

La discrepancia entre el PM aparente observado del alérgeno Phl p 11 nativo por SDS-PAGE y el PM calculado a partir de la secuencia de aminoácidos deducida se explica probablemente por la modificación post-traducciona del alérgeno nativo. En respaldo de esto existe el informe de van Ree y col. (26), en el que la proteína de *L. perenne* homóloga mostró que llevaba glucosilación ligada a N que ascendía a aproximadamente el 8% de la masa molecular total y la conservación del sitio de unión de glucano correspondiente en la secuencia de aminoácidos de Phl p 11.

Expresión en Escherichia coli y purificación de rPhl p 11

Con el objetivo de la caracterización alérgica y serológica del alérgeno Phl p 11, la proteína se expresó en *E. coli* y se purificó hasta homogeneidad. Debido a la mala solubilidad cuando el alérgeno se expresaba inicialmente con un marcador hexahistidina N-terminal como la
5 única adición modificada, los inventores eligieron en su lugar producir el mismo como una fusión con la proteína de unión a maltosa de *E. coli* como un medio para ayudar a la solubilidad. Después de preparar una construcción en la que la transcripción de la fusión estaba bajo el control del promotor de T7, usando *E. coli* XL1-Blue como un huésped de clonación, el plásmido se transfirió a la cepa BL21 que albergaba el plásmido pT7POL23. En este sistema binario, la
10 construcción es quiescente a 30°C y la expresión de la proteína recombinante se indujo por un cambio de temperatura a 42°C (Fig. 4).

Usando esta cepa para la expresión, se obtuvo la acumulación de MBP-Phl p 11 hasta aproximadamente el 10% de la proteína celular total, como se estimó a partir de SDS-PAGE teñida con Coomassie (Fig. 4). El análisis de material celular fraccionado puso de manifiesto que
15 aproximadamente la mitad de la proteína de fusión estaba presente en la fase soluble (no mostrada). La proporción de una proteína soluble tendía a ser mayor cuando el cultivo se había devuelto a 30°C después de un periodo de inducción a 42°C, en vez de mantenerse a 42°C hasta la recogida (no mostrado). Para minimizar la agregación de la proteína de fusión soluble se realizó un procesamiento post-recogida en condiciones reductoras. Después de un cambio de
20 tampón para disminuir la concentración de reductor en el extracto celular aclarado, la proteína se sometió a una primera etapa de purificación por IMAC. Aunque el material eluido parecía como una única banda distinta del tamaño esperado en SDS-PAGE reductora, la filtración en gel analítica indicó la presencia de diferentes formas de agregación además del monómero. Una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño usando Superdex 75, por lo tanto, se añadió al
25 procedimiento de purificación. La preparación final parecía monomérica por filtración en gel analítica y libre de proteínas bacterianas contaminantes por SDS-PAGE. Parecía estable y no se observó formación de agregados después del almacenamiento a -20°C. La producción final de proteína purificada fue de 12 mg por litro de cultivo bacteriano o 1,7 mg por gramo de sedimento celular (peso fresco).

Análisis de reconocimiento de anticuerpo de rPhl p 11

Para examinar la capacidad de unión a anticuerpo de IgE del alérgeno recombinante e investigar la frecuencia y magnitud de la sensibilización de IgE específica de Phl p 11 entre alérgicos al polen de gramíneas, se prepararon ensayos serológicos para su uso en el Pharmacia CAP System. Como un control para la unión del anticuerpo a la parte de MBP de la proteína de
35 fusión, se prepararon y usaron en paralelo ensayos que llevaban solamente MBP. Después del

análisis de muestras de suero de 184 sujetos sensibilizados a polen de gramíneas usando estos ensayos, se observó que 59 (el 32%) de los mismos contenían reactividad de IgE específica al alérgeno recombinante (Tabla II). El nivel promedio de IgE para rPhl p 11 en los sueros específicamente reactivos fue 16 kU_A/L, en comparación con 79 kU_A/L de IgE frente a extracto natural de polen de *P. pratense*. Por tanto, parece que como promedio entre estos sujetos, aproximadamente el 20% de la reactividad de IgE a alérgenos de polen de *P. pratense* estaba dirigida contra rPhl p 11.

En dos de los sueros que mostraron un resultado positivo con el ensayo de rPhl p 11, también había una unión aparente de IgE a MBP en solitario. Para uno de estos sueros, la determinación de IgE era de hecho mayor con el ensayo de MBP y este suero, por lo tanto, se consideró que carecía de IgE para rPhl p 11. Para el otro suero, la contribución por MBP a la unión de IgE por la proteína de fusión fue de solamente aproximadamente el 1%, lo que se consideró no significativo. En total, solamente cuatro sueros de los 184 ensayados (2%) mostró unión de IgE detectable a MBP en solitario, indicando que la MBP puede ser un compañero de fusión adecuado para la producción de alérgeno recombinante en los casos en los que no se puede producir de forma eficaz una proteína no de fusión soluble en *E. coli*.

A objeto de la comparación, las 184 muestras de suero también se ensayaron con un ensayo específico para un alérgeno de polen de gramíneas principal establecido previamente, rPhl p 2. La reactividad del anticuerpo de IgE dirigida contra este alérgeno se observó en 103 (56%) de todos los sujetos ensayados, con un nivel de IgE promedio de 11,4 kU_A/L. Por lo tanto, la unión a rPhl p 2 representaría aproximadamente el 15% del nivel total de IgE para extracto natural, completo de polen de *P. pratense* en este subconjunto de sueros, que era como promedio 74 kU_A/L. En resumen, el análisis serológico muestra que el rPhl p 11 expresado en *E. coli* tiene capacidad de unión a anticuerpo de IgE significativa y específica, comparable en frecuencia y magnitud a la de rPhl p 2.

Inhibición de la unión de IgE a extracto de polen de gramíneas natural por rPhl p 11 soluble

Para comparar de un modo más directo las características de unión a IgE de Phl p 11 recombinante y natural se realizó un experimento de inhibición de inmunotransferencia. En este análisis, la competición por la unión de IgE a alérgeno natural inmovilizado por rPhl p 11 soluble se visualizaría como atenuación de la unión de IgE a Phl p 11 natural inmovilizado después de la preincubación de suero de paciente con el alérgeno recombinante. Como un control para inhibición inespecífica, ambas muestras de suero usadas se preincubaron con BSA y MBP en paralelo con el pretratamiento de rPhl p 11. Aunque las proteínas de control no tenían efecto visible sobre la unión de IgE a proteínas de extracto, en comparación con la preincubación con tampón (no mostrado), el pretratamiento de las muestras de suero con rPhl p 11 anuló

prácticamente de forma completa la señal de autorradiografía a peso molecular de 20 kDa (Fig. 5). El resultado demostró que la proteína recombinante compartía epítopes para anticuerpos de IgE humanos con Phl p 11 natural.

La contribución de Phl p 11 a la actividad de unión a IgE total de proteínas de polen se examinó adicionalmente por experimentos de inhibición de transferencia puntual, en los que se usó rPhl p 5, un alérgeno conocido por su alta capacidad de unión de IgE (7), para la comparación. Se aplicaron puntualmente cantidades iguales de extracto de proteína de polen sobre trozos idénticos de membrana de nitrocelulosa y se expusieron a sueros de pacientes que se habían preincubado con rPhl p 11, rPhl p 5 o MBP. De los análisis serológicos, se conocía que estos sueros contenían IgE tanto para Phl p 11 como para Phl p 5, pero no para MBP. Como controles, se usaron incubación con tampón y suero de un individuo no alérgico. Después del lavado se determinó la IgE unida a membrana radiométricamente y se calcularon los efectos de inhibición de rPhl p 11 y rPhl p 5 en relación a las muestras pretratadas con MBP. Los resultados del experimento se muestran en la Tabla III. Como promedio, se observó que rPhl p 11 inhibía el 25% de la unión de IgE al extracto del polen, que se corresponde con los datos serológicos cuantitativos mostrados en la Tabla II, mientras que rPhl p 5 provocó una inhibición promedio del 55%. Los inventores concluyen que Phl p 11 representa una proporción pertinente de anticuerpos de IgE específicos de polen de fleo, aunque menor que Phl p 5.

rPh1 p 11 induce liberación de histamina por basófilos y reacción cutánea inmediata

En un experimento sobre basófilos de un individuo alérgico sensibilizado a alto nivel con Phl p 11, el rPhl p 11 indujo la liberación de histamina dependiente de la dosis, demostrando su capacidad de entrecruzar de forma productiva anticuerpos de IgE unidos a superficie celular. La liberación de histamina limitada tuvo lugar de células de un sujeto sensibilizado en bajo grado con Phl p 11 y ninguna liberación de células de un no alérgico después de la incubación con rPhl p 11. (Tabla 1). Se obtuvieron pruebas de actividad biológica específica de rPhl p 11 *in vivo* a partir de experimentos de ensayo cutáneo. En dos sujetos sensibilizados, las reacciones de habón dependientes de la dosis se produjeron por la exposición a una serie de dilución del alérgeno, mientras que no tuvo lugar ninguna reacción en cuatro controles no alérgicos ensayados. (Tabla 2). El compañero de fusión de rPhl p 11 MBP en solitario no dio lugar a ninguna reacción en ninguno de estos experimentos. Por tanto, el rPhl p 11 mostró actividad biológica que cumplió los criterios de especificidad.

Tabla 1. Inducción específica de liberación de histamina de basófilos por rPhl p 11^a

Conc (µg/ml)	Paciente A			Paciente B			Paciente C		
	MBP	MBP- rPhl p 11	anti- IgE	MBP	MBP- rPhl p11	Anti-IgE	MBP	MBP- rPhl p 11	anti- IgE
0	6,5	6,7	6,6	6,5	6,5	6,5	3,5	3,5	3,5
0,001	5,8	16	11,3	5,5	5,5	8,25	3,5	3,5	8,25
0,01	5,2	29	16	5,5	5,8	10	3,4	3,5	14
0,1	4,9	34	28,5	5,4	7,8	23	3,5	3,8	43
1	4,7	36,5	34	5,3	7,8	13	3,5	3,5	55

a) La liberación de histamina se expresa como porcentaje del contenido total de las células de histamina.

Tabla 2. Ensayos de punción cutánea con rPhl p 11^b

Sujeto	MBP-rPhl p 11				MBP	Extracto de polen	Histamina
	100 µg/m,	10 µg/ml	1 µg/ml	0,1 µg/ml	todo conc		
Alérgico Nº 1	5,5	2,5	-	-	-	9,0	3,6
Alérgico Nº 2	8,0	5,5	4,0	-	-	10,5	7,0
No alérgico Nº 1	-	-	-	-	-	-	8,0
No alérgico Nº 2	-	-	-	-	-	-	7,5
No alérgico Nº 3	-	-	-	-	-	-	4,9
No alérgico Nº 4	-	-	-	-	-	-	8,5

b) Dos alérgicos y cuatro no alérgicos se sometieron a ensayos cutáneos con rPhl p 11 a diferentes concentraciones, con extracto de polen de fleo e histamina. El diámetro de las reacciones de habón resultante se determinó y se presenta en mm.

5 DISCUSIÓN

Los pólenes de gramíneas pertenecen a las fuentes de alérgenos más frecuentemente sensibilizantes y potentes. Contienen varias moléculas alérgicas, varias de las cuales se han identificado y caracterizado en el pasado reciente (3). En la presente invención, los inventores describen la identificación, clonación y producción recombinante de un alérgeno de polen de *P. pratense* novedoso que añade nuevos epítopes importantes al panel creciente de alérgenos de polen de gramíneas recombinantes (29). A pesar del hecho de que los alérgenos de polen de gramíneas de grupo 11 son glucoproteínas (26) y contienen varios restos de cisteína, los inventores pueden producir alérgeno rPhl p 11 soluble, monomérico e inmunológicamente activo utilizando MBP como un compañero de fusión para la expresión en *E. coli*. Se realizó la

caracterización serológica extensa de la reactividad de IgE frente a rPhl p 11 usando un sistema de ensayo cuantitativo en el que el alérgeno se inmoviliza covalentemente sobre celulosa activada. Mediante el uso de los ensayos específicos de rPhl p 11, los inventores encontraron que aproximadamente un tercio de todos los sujetos sensibilizados con polen de gramíneas analizados (n=184) contenían anticuerpos de IgE en suero que se unen a rPhl p 11 y que la magnitud de la unión se correspondía con una proporción significativa de anticuerpos de IgE específicos de polen de gramíneas en estos sujetos.

Se obtuvieron pruebas que respaldaban la autenticidad de la presentación de epítope por rPhl p 11 a partir de experimentos de inhibición de inmunotransferencia, en los que las proteínas de polen de gramíneas naturales se unieron a una fase sólida y se usó rPh p 11 como inhibidor de fase fluida. La inhibición específica y extensa de la unión de IgE al alérgeno natural tuvo lugar en ambos de los dos sueros de pacientes examinados, demostrando que rPhl p 11 podría competir con Phl p 11 natural por unión a anticuerpo de IgE. Tomados en conjunto, los datos serológicos muestran que el rPhl p 11 inmunorreactivo se puede producir usando la expresión en *E. coli* y que la proteína recombinante comparte epítopes para anticuerpos de IgE con el alérgeno natural. En base a los resultados obtenidos, es evidente que rPhl p 11 representa una adición importante al panel de alérgenos de polen de gramíneas recombinantes útiles para diagnóstico *in vitro* de alergia a polen de gramíneas.

Es pertinente para esta discusión el análisis inmunológico de Lol p 11 natural desglucosilado químicamente descrito por van Ree y col. (26), que sugirieron la implicación de estructuras de hidratos de carbono en las propiedades de unión a IgE de este alérgeno. Por tanto, los inventores no pueden excluir que exista una diferencia cualitativa en las propiedades alergénicas entre Phl p 11 natural y la molécula recombinante descrita en este artículo y que la expresión de Phl p 11 en una forma glucosilada, usando un huésped de eucariota, podría producir un alérgeno recombinante con diferentes características de unión a IgE. Por otro lado, en vista de opiniones recientes de que los epítopes de glucano pueden no ser provocadores eficaces de reacciones mediadas por IgE o informativos en relación a manifestación de alergia clínica (30-34), es posible que un alérgeno recombinante no modificado expresado en *E. coli* sea más útil para fines de diagnóstico.

A pesar de la homología de secuencia significativa entre los miembros del grupo de alérgenos ampliamente representado (gramíneas, árboles y malas hierbas) ilustrado por Phl p 11 en fleo y Ole e 1 en polen de olivo, parece existir poca reactividad cruzada para anticuerpos de IgE entre los mismos. En un análisis preliminar, los inventores no han podido detectar reacción cruzada entre rPhl p 11 y Ole e 1 (Niederberger, Valenta & Lidholm, datos no publicados) y los resultados de estudios recientes sobre otros miembros de esta familia de alérgenos (27, 28)

concuerdan con esta observación.

Una implicación importante de la aparente ausencia de reactividad cruzada significativa entre rPhl p 11 y otros miembros de esta familia de alérgenos es que son útiles como marcadores de diagnóstico para identificar más precisamente el sensibilizador principal de individuos alérgicos, en comparación con extractos naturales o componentes con reactividad cruzada tales como profilina, alérgenos de dos manos EF u homólogos de Bet v 1. Por tanto, un reconocimiento de IgE preferente de Phl p 11, en relación con otros miembros de esta familia de alérgenos, puede sugerir una sensibilización primaria por polen de gramíneas en lugar de otra fuente de alérgenos que contienen componentes con reactividad cruzada. El uso de alérgenos recombinantes seleccionados de este modo puede proporcionar información útil para el consejo acerca de la evitación de alérgenos y la selección adecuada de extracto de alérgeno para tratamiento de inmunoterapia específico.

En conclusión, la presente invención se refiere a clonación de ADNc y producción recombinante de un alérgeno de polen de gramíneas del grupo 11 reactivo con IgE y biológicamente activo. Se puede usar Phl p 11 recombinante para identificar sensibilización a alérgeno del grupo 11 en pacientes y para inmunoterapia específica.

REFERENCIAS

1. Kay, A. B. 1997. Allergy and Allergic Disease. Blackwell Science, Oxford.
2. D'Amato, G., F. T. Spiekma, G. Liccardi, S. Jäger, M. Russo, K. Kontou-Fili, H. Nikkels, B. Wüthrich y S. Bonini. 1998. Pollen-related allergy in Europe. *Allergy* 53: 567.
3. Esch, R. E. 1999. Grass pollen allergens. In *Allergens and Allergen Immunotherapy*. R. F. Lockey y S. C. Bukantz, eds. Marcel Dekker, Inc., NY, pág. 103.
4. Laffer, S., R. Valenta, S. Vrtala, M. Susani, R. van Ree, D. Kraft, O. Schneider y M. Duchêne, 1994. Complementary DNA cloning of the major allergen Phl p I from timothy grass (*Phleum pratense*); recombinant Phl p I inhibits IgE binding to group I allergens from eight different grass species. *J. Allergy Clin. Immunol.* 94: 689.
5. Petersen, A., G. Schramm, A. Bufe, M. Schlaak y W.-M. Becker. 1995. Structural investigations of the major allergen Phl p I on the complementary DNA and protein level. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95: 987.
6. Dolecek, C., S. Vrtala, S. Laffer, P. Steinberger, D. Kraft, O. Scheiner y R. Valenta. 1993. Molecular characterization of Phl p II, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *FEBS Lett.* 335: 299.
7. 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 y 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.

8. Bufe, A., W.-M. Becker, G. Schramm, A. Petersen, U. Mamat y M. Schlaak. 1994. Major allergen Phl p Va (timothy grass) bears at least two different IgE-reactive epitopes. J. Allergy Clin. Immunol. 94: 173.

5 9. Bufe, A., G. Schramm, M. B. Keown, M. Schlaak y W.-M. Becker. 1995, Major allergen Phl p Vb in timothy grass is a novel pollen RNase. FEBS Lett. 363: 6.

10. Petersen, A., A. Bufe, G. Schramm, M. Schlaak y 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.

10 11. Vrtala, S., S. Fischer, M. Grote, L. Vangelista, A. Pastore, W. R. Sperr, P. Valent, R. Reichelt, D. Kraft y R. Valenta. 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.

15 12. Niederberger, V., B. Hayek, S. Vrtala, S. Laffer, A. Twardosz, L. Vangelista, W. R. Sperr, P. Valent, H. Rumpold, D. Kraft, K. Ehrenberger, R. Valenta y S. Spitzauer. 1999. Calcium-dependent immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound form of a cross-reactive two EF-hand timothy grass pollen allergen, Phl p 7. FASEB J. 13: 843.

20 13. Valenta, R., T. Ball, S. Vrtala, M. Duchêne, D. Kraft y O. Scheiner. 1994. cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 199: 106.

14. Suck, R., A. Petersen, S. Hagen, O. Cromwell, W. Becker y H. Fiebig. 2000. Complementary DNA cloning and expression of a newly recognized high molecular mass allergen Phl p 13 from timothy grass pollen (*Phleum pratense*). Clin. Exp. Allergy 30: 324.

25 15. Niederberger, V., S. Laffer, R. Fröschl, D. Kraft, H. Rumpold, S. Kapiotis, R. Valenta y S. Spitzauer. 1998. IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. J. Allergy Clin. Immunol. 101: 258.

30 16. Valenta, R., M. Duchêne, K. Pettenburger, C. Sillaber, P. Valent, P. Bettelheim, M. Breitenbach, H. Rumpold, D. Kraft y O. Scheiner. 1991. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. Science 253: 557.

17. Valenta, R., M. Duchêne, C. Ebner, P. Valent, C. Sillaber, P. Deviller, F. Ferreira, M. Tejkl, H. Edelmann, D. Kraft y O. Scheiner. 1992. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. J. Exp. Med. 175: 377.

35 18. Mertens, N., E. Remaut y W. Fiers. 1995. Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids.

BiolTechnology 13: 175.

19. Ball, T., W. R. Sperr, P. Valent, J. Lidholm, S. Spitzauer, C. Ebner, D. Kraft y R. Valenta. 1999. Induction of antibody responses to new B cell epitopes indicates vaccination character of allergen immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* 29: 2026.

20. Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. J. MacDonald y W. J. Rutter. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemtstry* 18: 5294.

21. Frohman, M. A. 1993. Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods Enzymol.* 218: 340.

22. Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker y H. W. Boyer. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95.

23. Valent, P., J. Besemer, M. Muhm, O. Majdic, K. Lechner y P. Bettelheim. 1989. Interleukin 3 activates human blood basophils via high-affinity binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S. A.* 86: 5542.

24. Valenta, R., W. R. Sperr, F. Ferreira, P. Valent, C. Sillaber, M. Tejkl, M. Duchene, C. Ebner, K. Lechner, D. Kraft y O. Scheiner. 1993. Induction of specific histamine release from basophils with purified natural and recombinant birch pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91: 88.

25. Vrtala, S., K. Hirtenlehrer, L. Vangelista, A. Pastor, H.-G. Eichler, W. R. Sperr, P. Valent, C. Ebner, D. Kraft y R. Valenta. 1997. Conversion of the major birch pollen allergen, Bet v1, into two non-anaphylactic T-cell epitope-containing fragments: candidates for a novel form of specific immunotherapy, *J. Clin. Invest.* 99: 1673.

26. van Ree, R., D. R. Hoffman, W. van Dijk, V. Brodard, K. Mahieu, C. A. M. Koeleman, M. Grande, W. A. van Leeuwen y R. C. Aalberse. 1995. Lol p XI, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95: 970.

27. Calabozo, B., A. Diaz-Peralez, G. Salcedo, D. Barber y F. Polo. 2001. Structural and antigenic similarity between Pla 11 and Ole e 1, the major allergens of English plantain and olive pollens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107: S15.

28. Barderas, R., M. Villalba, R. Monsalve, E. Batanero, E. Gonzalez, S. Huecas, I. Cuesta, O. Palomares, P. Barral y R. Rodriguez. 2001. Isolation and cloning of Che a 1, allergen from *Chenopodium album* pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107: S19.

29. Valenta, R., J. Lidholm, V. Niederberger, B. Hayek, D. Kraft y H. Gronlund. 1999. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy

(CRD and CRIT) [Review]. Clin. Exp. Allergy 29: 896.

30. van der Veen, M. J., R. van Ree, R. C. Aalberse, J. Akkerdaas, S. J. Koppelman, H. M. Jansen y J. S. van der Zee. 1997. Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. J. Allergy Clin. Immunol. 100: 327.

5 31. Aalberse, R. C. y R. van Ree. 1997. Crossreactive carbohydrate determinants. Clin. Rev. Allergy Immunol. 15: 375.

32. Aalberse, R C. 1998. Clinical relevance of carbohydrate allergen epitopes. Allergy 53: 54.

10 33. Mari, A., P. Iacovacci, C. Afferni, B. Barletta, R. Tinghino, G. Di Felice y C. Pini. 1999. Specific IgE to crossreactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases. J. Allergy Clin. Immunol. 103: 1005.

34. van Ree, R y R C. Aalberse. 1999. Specific IgE without clinical allergy. J. Allergy Clin. Immunol. 103: 1000 35. Rossi y col., Allergy, 2001, 56, 1180-1185.

LISTA DE SECUENCIAS

15

<110> Pharmacia Diagnostics AB

<120> Alérgeno novedoso

20

<130> P05497SE

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.1

25

<210> 1

<211> 143

<212> PRT

<213> Phleum pratense

30

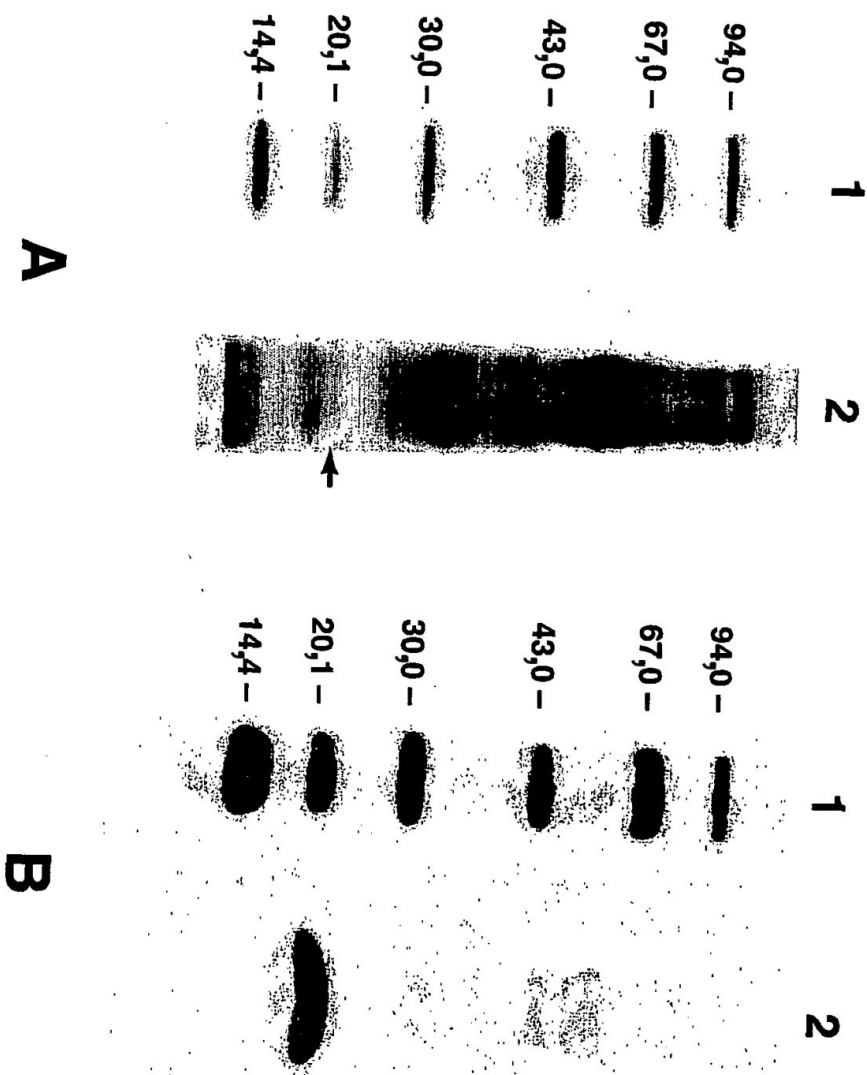
<400> 1

Asp	Lys	Gly	Pro	Gly	Phe	Val	Val	Thr	Gly	Arg	Val	Tyr	Cys	Asp	Pro	1	5	10	15
Cys	Arg	Ala	Gly	Phe	Glu	Thr	Asn	Val	Ser	His	Asn	Val	Gln	Gly	Ala	20	25	30	
Thr	Val	Ala	Val	Asp	Cys	Arg	Pro	Phe	Asn	Gly	Gly	Glu	Ser	Lys	Leu	35	40	45	
Lys	Ala	Glu	Ala	Thr	Thr	Asp	Gly	Leu	Gly	Trp	Tyr	Lys	Ile	Glu	Ile	50	55	60	
Asp	Gln	Asp	His	Gln	Glu	Glu	Ile	Cys	Glu	Val	Val	Leu	Ala	Lys	Ser	65	70	75	80
Pro	Asp	Thr	Thr	Cys	Ser	Glu	Ile	Glu	Glu	Phe	Arg	Asp	Arg	Ala	Arg	85	90	95	
Val	Pro	Leu	Thr	Ser	Asn	Asn	Gly	Ile	Lys	Gln	Gln	Gly	Ile	Arg	Tyr	100	105	110	
Ala	Asn	Pro	Ile	Ala	Phe	Phe	Arg	Lys	Glu	Pro	Leu	Lys	Glu	Cys	Gly	115	120	125	
Gly	Ile	Leu	Gln	Ala	Tyr	Asp	Leu	Arg	Asp	Ala	Pro	Glu	Thr	Pro	130	135	140		

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N°: 1.
- 5
2. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la secuencia de ácido nucleico de los nucleótidos 1-429 de la Figura 2 y que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1.
- 10
3. Un procedimiento para producir Ph1 p 11 recombinante, que comprende las etapas
- expresar la molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en un organismo huésped; y
 - purificar el Ph1 p 11 recombinante producido.
- 15
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el organismo huésped es un huésped procariota, preferentemente *E. coli*.
5. Uso de un polipéptido Ph1 p 11 que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N°: 1 para la producción de un fármaco para inmunoterapia de pacientes alérgicos a polen de gramíneas que muestran reactividad de anticuerpo de IgE frente a Ph1 p 11.
- 20
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5 para la producción de un fármaco para inmunoterapia de pacientes alérgicos a polen de fleo que muestran reactividad de anticuerpo de IgE frente a Ph1 p 11.
- 25
7. Un polipéptido Ph1 p 11 producido recombinantemente o sintetizado químicamente que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N°: 1.

Fig. 1



▽

Fig. 3

ruler	1	60
Phl p11		DK--GPGFVVTGRVYCDPCRAGFETNVSHNVQG
A54002		DK--GPGFVVTGRVYCDPCRAGFETNVSHNVEG
1815759	MASLR--ALS	VIAVAVLFA
S31710	MASLR--TIP	VIFG-ILFYV
P33050	MASV	PAPATTTAAVILCLCVVLSCAAADDNLPDYVIQGRVYCDTCRAGFVTNVTEYIAG
2765366	MAKSIIIQAP-ALCFLSLLGFAYSES----	FFFVEGKVYCDNCRTQFVTKLSTYMKG
P13447	MAKAI	VLLSA--LCILALANFAHCRP---E
2832664	MASKA	IFFFVSAVCLSSLAGVAIADADD
398899		DRFQIQGSVYCDTCRVQFVTRL
S43242		SKFLEG
S43244		ARENK---NPFVXRGRVYCDTCXVXFETPASTYISG
3256212		EDVPQPPV---PQFHIQGGVYCDTCRARFITE
926885		SEFIPG
		EDVPQPPV---PQFHIQGGVYCDTCRARFITE
		SEFIPG
		EDVPQPPV---SQFYIQGGVYCDTCRARFITE
		SEFIPG
		EDVPQPPV---SQFYIQGGVYCDTCRAGFITE
		SEFIPG
ruler	61	120
Phl p11		ATVAVDCRPFNGGESKLKAEATTDGLGWYKIEIDQDHQEEICEVVLAKSPD
A54002		ATVAVDCRPFNGGESKLKAEATTDKDGWYKIEIDQDHQEEICEVVLAKSPDKSCSEIEEF
1815759	AKVRLECRHFGT	NVLER
S31710	AKVRLECKHFGT	DKVERAIDGVTDETGT
P33050	AKVRLECKHFGT	GKLER
2765366	AKVSLECRNREGGTLIYSSDSETDKSGTYRIPVDGDH	EEEEICEIALKKSSDPDCSEVSKD
P13447	ATVKLQCRNISTEAETFS	VEGVTDKDGKYLTVNGDHENDICEVT
2832664	AKVKLECRSRTNGT	VTLTKEAVTDKTSYRMEVTGDHEEEVCELVLVESPD
398899	AVVRLECKDRRTMELTYS	SHEARTDSTGSYKILVNEHDHDEQFCDAMLVRSSQLRCSNVSPG
S43242	ASIRLQCKDRENGKIT	TFTEIGYTRAEGLYSMLVEGDHKNFCEITLISSGREDCDEIPVE
S43244	ASIRLQCKDRENGKIT	TFTEIGYTRAEGLYSMLVEGDHKNFCEITLISSGRKDCDEIPVE
3256212	AGVRLQCKDRENGKIT	TFTEVGYTRAEGLYSMLIERDHKNFCEITLLSSSRKDCDEIPIE
926885	ASVRLQCKEKKNGDIT	TFTEVGYTRAEGLYSMLVERDHKNFCEITLISSGSKDCNEIPTE
ruler	121	175
Phl p11		---RDRARVPLTSNNGIKQQGIRYANPIAFFRKEPLKECGGILQAYDLR
A54002		---RDRARVPLTSNNGIKQQGIRYANPIAFFRKEPLKECGGILQAY
1815759	---RDRAPVLLTRNVGISDN-	LRLANPLGYLKDVPLPVCGDLLKMFKLADDDDDQ
S31710	---RDRARVLLTRNVGICDN-	LRLANPLGYLKDYHCPS-AALLKQFDLADDDNE
P33050	---RDRAGVLLTRNVGISDS-	LRPANPLGYFKDVPLPVCAALLKQLDSDDDDQ
2765366	PFLKKSARISLTKNNGIS-	TPVRLANPLGFMKKKPLPECAKALRELGMNPDDVIO
P13447	---YEKARIECSDNVGI-	HNAVRFANPLFFMKAESVQGCKEALDELGLFPLEF
2832664	AYLRNAAKISLTANDGIV	SHETRIVNPLGFMVQTPSAECPAAFKELGIVPDG
398899	---HDRARVTLTRENGIASD-	DRFANMGMFLRDAAMPGCADIMKLYQETE
S43242	GWAKPSLKF	KLNTVNG----TTRTINPIGFFKKEALPKCTQVYNKLGMYPPNM
S43244	GWVKPSLKF	KLNTVNG----TTRTINPIGFFKKEALPKCTQVYNKLGMYPPNM
3256212	GWVKPSLKF	MLNTVNG----TTRTINPLGFFKKEALPKCPQVFNKLGMYPPNM
926885	GWAKPSLKF	ILNTVNG----TTRTVNPLGFFKKEALPKCAQVYNKLGMYPPNM

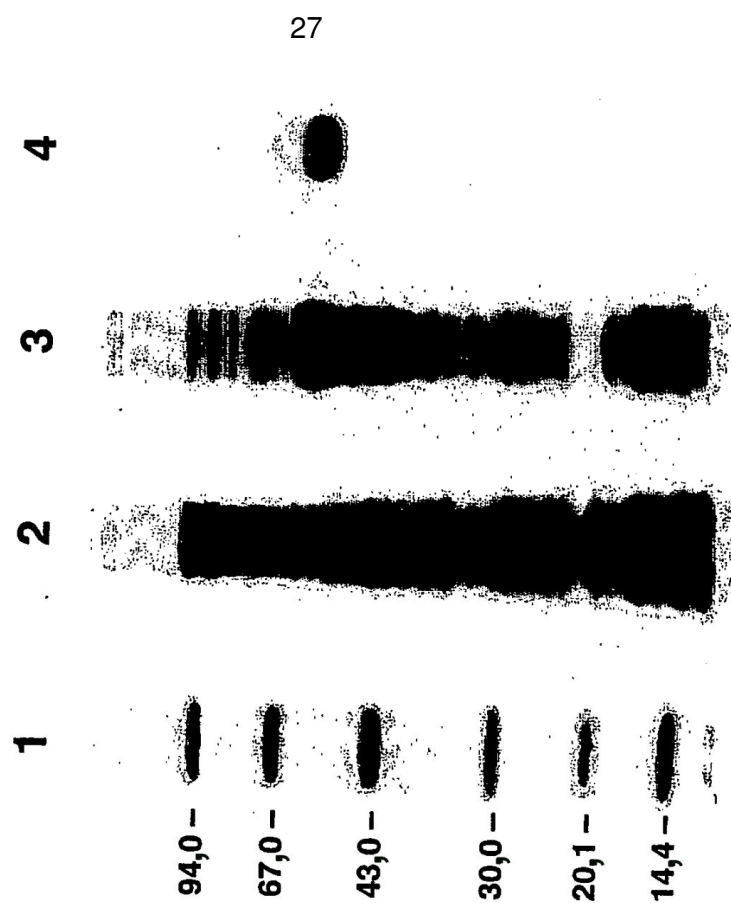


Fig. 4

Fig. 5

