



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 319 218**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05812763 .0**

(96) Fecha de presentación : **02.12.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1817330**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **15.08.2007**

(54) Título: **Derivados de alérgenos de proteínas.**

(30) Prioridad: **02.12.2004 AT A 2028/2004**

(73) Titular/es: **BIOMAY AG.
Lazarettgasse 19, Top 1
1090 Wien, AT**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.05.2009

(72) Inventor/es: **Westrtschnig, Kerstin;
Focke, Margarete;
Valent, Peter;
Keller, Walter y
Valenta, Rudolf**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.05.2009

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Derivados de alérgenos de proteínas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para reducir la actividad alergénica de alérgenos de proteínas de tipo salvaje, derivados de alérgenos nuevos y estrategias para la vacunación contra la alergia.

10 La alergia es la alternancia específica hereditaria o adquirida de la capacidad de reacción frente a sustancias foráneas (es decir, no propias) que normalmente son inocuas (“alérgenos”). La alergia está relacionada con reacciones inflamatorias en los sistemas de órganos afectados (piel, conjuntiva, nariz, faringe, mucosa bronquial, tracto gastrointestinal), síntomas de enfermedades inmediatas, tales como rinitis alérgica, conjuntivitis, dermatitis, choque anafiláctico y asma, y manifestaciones de enfermedades crónicas, tales como las reacciones de etapas tardías en asma y dermatitis atópica.

15 La alergia de Tipo I representa una enfermedad de hipersensibilidad determinada genéticamente que afecta a aproximadamente el 20% de la población mundial industrializada. El sello patofisiológico de la alergia de Tipo I es la producción de anticuerpos de inmunoglobulina E (IgE) contra antígenos inocuos de otro tipo (alérgenos).

20 En la actualidad, la única forma causativa de tratamiento de la alergia es una inmunoterapia específica de alérgenos en la que las dosis de alérgenos en aumento se administran al paciente con el fin de inducir aptitudes específicas de alérgenos. Aunque diversos estudios han mostrado la eficacia clínica de la inmunoterapia específica de alérgenos, los mecanismos subyacentes no se comprenden en su totalidad.

25 La principal desventaja de la inmunoterapia específica de alérgenos es la dependencia del uso de extractos de alérgenos naturales que son difícil, si no imposible, de normalizar, al menos a nivel de producción industrial. Tales extractos de alérgenos naturales están constituidos por compuestos alergénicos y no alergénicos diferentes y por este motivo es posible que ciertos alérgenos no estén presentes en el extracto administrado o -incluso peor- que los pacientes puedan desarrollar nuevas especificidades de IgE a componentes en transcurso del tratamiento. Otra desventaja de la terapia basada en extractos resulta del hecho de que la administración de preparaciones de alérgenos biológicamente activos pueden inducir efectos secundarios anafilácticos.

30 La aplicación de técnicas de biología molecular en el campo de la caracterización de alérgenos ha permitido aislar los ADNc que codifican todos los alérgenos medioambientales relevantes y ha permitido la producción de alérgenos recombinantes. El uso de tales alérgenos recombinantes ha hecho posible determinar el perfil de reactividad del paciente individual tanto por procedimientos de diagnóstico *in vitro* (es decir, detección de anticuerpos IgE específicos de alérgenos en suero) como por experimentación *in vivo*. En base a esta tecnología, parece que es posible la posibilidad de desarrollar estrategias de vacunas basadas en componentes nuevos contra la alergia, en especial contra la alergia de Tipo I, que se ajustan al perfil de sensibilización del paciente. Sin embargo, debido a la similitud de los alérgenos recombinantes a sus homólogos naturales, los alérgenos recombinantes también presentan actividad alergénica significativa. Como los alérgenos recombinantes imitan estrechamente la actividad alergénica de los alérgenos de tipo salvaje, también están presentes para los alérgenos recombinantes todos los inconvenientes relacionados con esta actividad alergénica en inmunoterapia que aplica alérgenos naturales. Con el fin de mejorar la inmunoterapia, es necesario reducir la actividad alergénica de los alérgenos recombinantes de tal forma que la dosis de los alérgenos administrados se puede aumentar con sólo un bajo riesgo de efectos secundarios anafilácticos.

45 Se ha sugerido influir exclusivamente la actividad de células T específicas de alérgenos por medio de la administración de péptidos que contienen solamente epitopos de células T. Los epitopos de células T representan péptidos pequeños que resultan de la digestión proteolítica de alérgenos intactos por medio de células que representan antígenos. Tales epitopos de células T se pueden producir en forma de péptidos sintéticos. Los análisis dirigidos hasta la fecha con epitopos de células T, sin embargo, solamente han mostrado resultados escasos y baja eficacia. Se han considerado diversas explicaciones para la baja eficacia de la inmunoterapia basada en péptidos de células T: en primer lugar, puede ser difícil administrar la dosis óptima para conseguir la tolerancia en lugar de la activación de células T. En segundo lugar, los péptidos pequeños de epitopos de células T tendrán una semivida corta en el cuerpo. En tercer lugar, existe considerable evidencia de que la producción de IgE en individuos atópicos representa una respuesta inmune de memoria que no requiere nuevos cambios de clase y asimismo no se puede controlar por medio de citoquinas derivadas de células T. Las formas de terapia que están basadas exclusivamente en la administración de epitopos de células T pueden modular, por lo tanto, la actividad de células T específicas de alérgenos, pero pueden tener poca influencia sobre la producción de anticuerpos de IgE específicos de alérgenos por medio de células B de memoria cambiadas.

50 Se ha sugerido adicionalmente producir derivados o fragmentos de alérgenos hipoalergénicos por medio de tecnología de ADN recombinante o síntesis de péptidos. Tales derivados o fragmentos llevan epitopos de células T y pueden inducir anticuerpos de IgG que compiten con el reconocimiento por IgE del alérgeno nativo. Hace más de 20 años se demostró que la digestión proteolítica de los alérgenos producía fragmentos pequeños de alérgenos que en parte retenían su capacidad de unión a IgE pero no provocaban reacciones tipo inmediatas. Aunque la proteólisis de alérgenos es difícil de controlar y de normalizar, la biología molecular ha abierto nuevas vías para la producción de haptones de unión a IgE. Se ha sugerido que tales haptones de unión a IgE son útiles para la inmunización activa con riesgos reducidos de efectos anafilácticos y para la terapia pasiva para saturar la unión de células efectoras a IgE antes del contacto del alérgeno y así bloquear la liberación del mediador inducido por alérgenos.

ES 2 319 218 T3

- Otra sugerión fue producir versiones de alérgenos hipoalergénicos por medio de la modificación por ingeniería genética basada en la observación de que los alérgenos pueden aparecer de forma natural en forma de isoformas que se distinguen en solamente algunos residuos de aminoácidos y/o en conformaciones con capacidad de unión a IgE baja. Por ejemplo, la oligomerización del alérgeno principal del polen abedul, Bet v 1, por medio de modificación 5 por ingeniería genética proporcionó un trímero recombinante con actividad alergénica enormemente reducida. De manera alternativa, se ha sugerido que la introducción de mutaciones puntuales lleva a cambios conformacionales en la estructura del alérgeno y de ese modo interrumpe los epitopes de IgE discontinuos o afecta de forma directa la capacidad de unión a IgE (Valenta y col., Biol. Chem. 380 (1999), 815-824).
- 10 También se ha mostrado que la fragmentación del alérgeno en algunas partes (por ejemplo en dos partes) lleva a una pérdida casi completa de la capacidad de unión a IgE y actividad alergénica del alérgeno debido a la pérdida de sus pliegues similares a los natives (Vrtala y col. (J. Clin. Invest. 99 (1997), 1673-1681) para Bet v 1, Twardosz y col. (BBRC 239 (1997), 197-204) para Bet v 4, Hayek y col. (J. Immunol. 161 (1998), 7031-7039) para Aln g 4, Zeiler y col. (J. Allergy Clin. Immunol. 100 (1997), 721-727) para alérgenos de caspa bovina, Elfman (Int. Arch. Allergy 15 Immunol. 117 (1998), 167-173) para Lep d2), Westritschnig (J. Immunol. 172 (2004), 5684-5692) para Phlp 7, ...). La fragmentación de proteínas que contienen epitopes de IgE fundamentalmente discontinuos/conformacionales lleva a una reducción sustancial de la capacidad de unión a IgE del alérgeno. En base a este conocimiento, en la técnica anterior se investigó si tales fragmentos de alérgenos hipoalergénicos pueden inducir respuestas inmunológicas protectoras *in vivo*. (Westritschnig y col. (Curr. Opinion in Allergy and Clin. Immunol. 3 (2003), 495-500)).
- 20 En Vrtala S. y col. (Methods (2004) 32: 313-320) se describen las estrategias para convertir alérgenos en moléculas hipoalergénicas. Estas estrategias implican la producción de fragmentos de alérgenos, mutantes de alérgenos y derivados de alérgenos modificados químicamente.
- 25 El documento EP 1 403 280 se refiere a vacunas que comprenden una molécula hipoalergénica derivada del alérgeno de polen de festuca roja PhI p 7.
- En el artículo de Niederberger V. y col (PNAS (2004) 101: 14677-14682) se describe el uso de alérgenos modificados por ingeniería genética, en particular de fragmentos de Bet v 1 recombinantes para vacunación.
- 30 En Valenta R. y col. (Science (1991) 253: 557-560) se desvela la identificación de un alérgeno de polen de abedul que tiene una homología de secuencia elevada a las profilinas. Los autores de este artículo descubrieron que los anticuerpos de IgE de individuos alérgicos son capaces de unir la profilina de abedul sí como la profilina humana.
- 35 Un objeto de la presente invención es proporcionar medios y procedimientos para una inmunoterapia de alergia mejorada basada en el conocimiento arriba mencionado. Tales procedimientos y medios deberían ser eficaces, en relación con un bajo riesgo para el choque anafiláctico, fácilmente aplicables y adaptados a las necesidades de un paciente individual y fácilmente transformables en escalas industriales.
- 40 Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir derivados de alérgenos de proteínas de tipo salvaje con actividad alergénica reducida, que se caracteriza por las siguientes etapas:
- proporcionar un alérgeno de proteína de tipo salvaje con una actividad alergénica,
 - dividir dicho alérgeno de proteína de tipo salvaje en dos partes, teniendo dichas dos partes una actividad alergénica reducida o careciendo de actividad alergénica y
 - volver a unir dichos dos fragmentos en orientación inversa.
- 45 El presente procedimiento está basado en el hecho de que la fragmentación de proteínas que contienen epitopes de IgE fundamentalmente discontinuos/conformacionales lleva a una reducción sustancial de la capacidad de unión a IgE del alérgeno. Sin embargo, los fragmentos de ciertos alérgenos eran mucho menos inmunogénicos para inducir una respuesta de anticuerpo protectora (Westritschnig y col., (2004)).
- Con el presente procedimiento, se proporcionan derivados de alérgenos de proteínas nuevos y definidos que combinan las ventajas de los enfoques basados en epitopes de células B y células T. Al mismo tiempo, las desventajas de vacunación con fragmentos solamente o disposiciones sofisticadas de fragmentos (tales como haptenos de unión a IgE e intercambio con tres o más fragmentos) no están presentes para los derivados de alérgenos de la presente invención.
- 55 De hecho, se podría mostrar con la presente invención que los resultados óptimos se pueden obtener con la estructura que, con respecto a la integridad de los elementos de la estructura, se asemeja más estrechamente al alérgeno de tipo salvaje (es decir, con todos los aminoácidos del alérgeno de tipo salvaje), sin embargo, sin su actividad alergénica (o con una actividad alergénica suficientemente reducida). Por supuesto, si sólo se pierden (eliminan) unos pocos residuos de aminoácidos o se añaden (insertan) en el transcurso de la generación de los derivados de alérgenos o si las partes se combinan por medio de un enlace en lugar de una combinación directa, todavía están presentes las ventajas de acuerdo con la presente invención. Esta reducción o anulación de la actividad alergénica se consigue por medio del principio conocido y general de dividir el alérgeno en los fragmentos definidos. Además de este principio general, la presente invención vuelve a unir las dos partes del alérgeno obtenido en la orientación inversa que lleva a derivados de alérgenos que contienen esencialmente toda la información estructural relevante del alérgeno (ya que la secuencia de

ES 2 319 218 T3

aminoácidos está contenida en su totalidad o casi en su totalidad en los derivados de alérgeno de acuerdo con la presente invención) pero sólo con actividad alergénica restante baja (o sin ella) en comparación con el alérgeno de tipo salvaje.

Estos derivados "cabeza a cola" de acuerdo con la presente invención posibilitan una inmunoterapia adecuada, individual y eficaz para los pacientes alérgicos que se puede escalar fácilmente con etapas rutinarias. Los derivados de acuerdo con la presente invención inducen anticuerpos de IgE protectores que pueden bloquear la unión a IgE del paciente a los alérgenos de tipo salvaje e inhibir la desgranulación del basófilo inducido por el alérgeno.

El presente procedimiento es especialmente adecuado para la tecnología de ADN recombinante. Una vez que el derivado se ha construido por medio de la modificación por ingeniería genética, se puede obtener fácilmente en cantidades considerables por medio de la expresión transgénica a nivel industrial en huéspedes adecuados. Los derivados de alérgenos de acuerdo con la presente invención se pueden producir preferiblemente en un huésped con capacidad de expresión elevada.

Los alérgenos preferidos que se tienen que modificar por medio de la presente invención incluyen todos los alérgenos de proteínas principales disponibles, por ejemplo, según www.allergen.org/List.htm. Los grupos específicamente preferidos de alérgenos de acuerdo con la presente invención incluyen profilinas, en especial Phl p 12, alérgenos de abedul, en especial Bet v 4, alérgenos de ácaros del polvo, en especial Der p 2, alérgenos de ácaros de almacenamiento, en especial Lep d 2, alérgenos de festuca roja, en especial Phl p 7, y los alérgenos enumerados en la tabla A.

20 TABLA A

Alérgeno preferido que se va a modificar por medio de intercambio de acuerdo con la presente invención (incluyendo ejemplos de referencia)

25 ALÉRGENOS

Nombre especie

	Nombre alérgeno Nombre obsoleto	ID. Bioquím. Nombre obsoleto	PM	ADNc o proteína	Referencia, según nº
Ambrosia artemisiifolia					
	ambrosia corta				
	Amb a 1	antígeno E	8	C	8, 20
	Amb a 2	antígeno X	38	C	8, 21
	Amb a 3	Ra3	11	C	22
	Amb a 5	Ra5	5	C	11, 23
	Amb a 6	Ra6	10	C	24, 25
30	Amb a 7	Ra7	12	P	26
Ambrosia trifida					
	ambrosia gigante				
	Amb t 5	Ra5G	4, 4	C	9, 10, 27
Artemisia vulgaris					
	artemisa				
	Art v 1		27-29	C	28
	Art v 2		35	P	28A
	Art v 3	proteína transf. lípidos	12	P	53
40	Art v 4	profilina	14	C	29
Helianthus annuus					
	girasol				
	Hel a 1		34		29A
	Hel a 2	profilina	15.7	C	Y15210
Mercurialis annua					
	Mer a 1	profilina	14-15	C	Y13271
Caryophyllales					
	Chenopodium album				
	cenizo, bledo				
	Che a 1		17	C	AY049012, 29B
pie de ganso blanco					
55	Che a 2	profilina	14	C	AY082337
	Che a 3	polcalcina	10	C	AY082338
Salsola kali					
	barrilla pinchosa				
	Sal k 1		43	P	29C
Rosales					
	Humulus japonicus				
	lúpulo japonés				
	Hum j 4w		C		AY335187
Parietaria judaica					
	Par j 1	proteína transf. lip. 1	15	C	véase lista de isoalérgenos
65	Par j 2	proteína transf. lip. 2		C	véase lista de isoalérgenos
	Par j 3	profilina		C	véase lista de isoalérgenos
Parietaria officinalis					
	Par o 1	proteína transf. lípidos	15		29D

ES 2 319 218 T3

	B. Césped Poales				
	<i>Cynodon dactylon</i>				
	césped de las Bermudas				
5	Cyn d 1	32	C	30, S83343	
	Cyn d 7		C	31, X91256	
	Cyn d 12 profilina	14	C	31a, Y08390	
	Cyn d 15	9	C	AF517686	
	Cyn d 22w enolasa	datos		pendiente	
10	Cyn d 23 Cyn d 14	9	C	AF517685	
	Cyn d 24 p. relacionada patogén	21	P	pendiente	
	<i>Dactylis glomerata</i>				
	césped del huerto				
	Dac g 1 AgDg1	32	P	32	
15	Dac g 2	11	C	33, S45354	
	Dac g 3		C	33A, U25343	
	Dac g 5	31	P	34	
	<i>Festuca pratensis</i>				
	prado fescue				
	Fes p 4w	60	-		
20	<i>Holcus lanatus</i>				
	césped aterciopelado				
	Hol l 1		C	Z27084	
	<i>Lolium perenne</i>				
	césped de centeno				
25	Lol p 1 grupo I	27	C	35, 36	
	Lol p 2 grupo II	11	P	37, 37A, X73363	
	Lol p 3 grupo III	11	P	38	
	Lol p 5 Lol p IX, Lol p Ib	31/35	C	34, 39	
	Lol p 11 hom: inhibidor tripsina	16		39A	
30	<i>Phalaris aquatica</i>				
	césped canario				
	Pha a 1		C	40, S80654	
	<i>Phleum pratense</i>				
	festuca roja Phl p 1	27	C	X78813	
35	Phl p 2		C	X75925, 41	
	Phl p 4		P	41A	
	Phl p 5 Ag25	32	C	42	
	Phl p 6		C	Z27082, 43	
	Phl p 11 hom. inhibidor tripsina	20	C	AF521563, 43A	
	Phl p 12 profilina		C	X77583, 44	
40	Phl p 13 poligalacturonasa	55-60	C	AJ238848	
	<i>Poa pratensis</i>				
	pasto azul de Kentucky				
	Poa p 1 grupo I	33	P	46	
	Poa p 5	31/34	C	34, 47	
45	<i>Sorghum halepense</i>				
	Johnson grass				
	Sor h 1		C	48	

50

55

60

65

ES 2 319 218 T3

5	C. Árboles Arecales <i>Phoenix dactylifera</i> palmera de dátiles <i>Pho d 2</i>	profilina	14.3	C	Asturias p.c.
10	Fagales <i>Alnus glutinosa</i> aliso <i>Aln g 1</i> <i>Betula verrucosa</i> abetul <i>Bet v 1</i> <i>Bet v 2</i>	profilina	17	C	S50692
15	<i>Bet v 3</i> <i>Bet v 4</i> <i>Bet v 6 h: isoflavona reductasa</i> <i>Bet v 7</i>		15	C	véase lista de alérgenos M65179 X79267 X87153, S54819
20	<i>Carpinus betulus</i> carpe <i>Car b 1</i> <i>Castanea sativa</i> castaño <i>Cas s 1</i> <i>Cas s 5</i> quitinasa		8	C	véase lista de alérgenos P81531
25	<i>Cas s 8</i> proteína transf. lípidos 9,7 <i>Corylus avellana</i> avellano <i>Cor a 1</i>		33.5	C	53
30	<i>Cor a 2</i> profilina <i>Cor a 8</i> proteína transf. lípidos 9 <i>Cor a 9</i> lis prot. sim. globulina 40/?		17	C	véase lista de isoalérgenos
35	<i>Cor a 10</i> prot. unión luminal <i>Cor a 11</i> 7S prot. sim. vicilina		70	C	Beyer p.c. AJ295617 AF441864
40	<i>Quercus alba</i> roble blanco <i>Que a 1</i>		49	C	54
45	Lamiaceas Oleaceae <i>Fraxinus excelsior</i> fresno <i>Fra e 1</i>		17	C	58A, AF526295
50	<i>Ligustrum vulgare</i> aligustre <i>Lig v 1</i> <i>Olea europaea</i> olivo <i>Ole e 1</i> <i>Ole e 2</i> profilina <i>Ole e 3</i> <i>Ole e 4</i> <i>Ole e 5</i> superóxido dismutasa <i>Ole e 6</i> <i>Ole e 7</i> <i>Ole e 8</i> proteína unión Ca ²⁺ <i>Ole e 9</i> beta-1, 3-glucanasa <i>Ole e 10</i> glicosil hidrolasa hom.		20	P	58A 59, 60 60A 60B P80741 P80740 60C, U86342 60D, P81430 60E, AF078679 AF249675 60F, AY082335
55	<i>Syringa vulgaris</i> lila <i>Syr v 1</i> Plantaginaceae <i>Plantago lanceolata</i> plátano inglés <i>Pla l 1</i>		11	C	58A
			20	P	P842242

ES 2 319 218 T3

	Pinales				
	<i>Cryptomeria japonica</i>				
	sugi	Cry j 1	41-45	C	55, 56
		Cry j 2		C	57, D29772
5	<i>Cupressus arizonica</i>				
	ciprés				
		Cup a 1	43	C	A1243570
	<i>Cupressus sempervirens</i>				
	ciprés común				
		Cup s 1	43	C	véase lista de alérgenos
10		Cup s 3w	34	C	ref. pendiente
	<i>Juniperus ashei</i>				
	cedro de montaña				
		Jun a 1	43	P	P81294
		Jun a 2		C	57A, AJ404653
		Jun a 3	30	P	57B, P81295
15	<i>Juniperus oxycedrus</i>				
	enebro albar				
		Jun o 4 hom: calmodulina	29	C	57C, AF031471
	<i>Juniperus sabinaoides</i>				
	cedro de montaña				
		Jun s 1	50	?	58
20	<i>Juniperus virginiana</i>				
	cedro rojo occidental				
		Jun v 1	43	P	P81825, 58B
	Platanaceae				
25	<i>Platanus acerifolia</i>				
	plátano de Londres				
		Pla a 1	18	P	P82817
		Pla a 2	43	P	P82967
		Pla a 3 proteína transf. lípidos	10	P	Iris p.c.
30	D. Mites				
	<i>Acarus siro</i>	artrópodo			
	ácaro Aca s 13 prot. unión ácido gras.	14*	C		AJ006774
	<i>Blomia tropicalis</i>				
35	ácaro Blo t 1 cisteína proteasa	39	C		AF277840
	Blo t 3 tripsina	24*	C		Cheong p.c.
	Blo t 4 alfa amilasa	56	C		Cheong p.c.
	Blo t 5		C		U59102
	Blo t 6 quimotripsina	25	C		Cheong p.c.
	Blo t 10 tropomiosina	33	C		61
40	Blo t 11 paramiosina	110	C		AF525465, 61A
	Blo t 12 Bt1la		C		U27479
	Blo t 13 Bt6. prot. unión ácid. gras		C		U58106
	Blo t 19 pep hom. antimicrob.	7.2	C		Cheong p.c.
	<i>Dermatophagoides farinae</i>				
	ácaro del polvo doméstico americano				
45	Der f 1 cisteína proteasa	25	C		69
	Der f 2	14	C		70, 70A, véase lista isoalérgenos
	Der f 3 tripsina	30	C		63
	Der f 7	24-31	C		SW:Q26456, 71
	Der f 10 tropomiosina		C		72
50	Der f 11 paramiosina	98	C		72A
	Der f 14 mag3, apolipoforina		C		917686
	Der f 15 98k quitinasa	98	C		AF178772
	Der f 16 gelsolina/villina	53	C		71A
	Der f 17 proteína EF unión Ca	53	C		71A
	Der f 18w 60k quitinasa	60	C		Weber p.c.
55	<i>Dermatophagoides microcoras</i>				
	ácaro del polvo doméstico				
	Der m 1 cisteína proteasa	25	P		68
	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>				
	ácaro del polvo doméstico europeo				
	Der p 1 .antígeno P1, cist. prot.	25	C		62, véase lista isoalérgenos
	Der p 2	14	C		62A-C, véase lista isoalérgenos
60					

ES 2 319 218 T3

	gens				
5	Der f 3 trypsin	30	C	63	
	Der f 7	24-31	C	SW:Q26456, 71	
	Der f 10 tropomyosin		C	72	
	Der f 11 paramyosin	98	C	72A	
	Der f 14 mag3, apolipoprotein		C	DL7686	
	Der f 15 98k chitinase	98	C	AF178772	
	Der f 16 gelsolin/villin	53	C	71A	
	Der f 17 Ca binding EF protein	53	C	71B	
	Der f 18w 60k chitinase	60	C	Weber p.c.	
	Dermatophagoides microceras				
10	house dust mite				
	Der m 1 cysteine protease	25	P	68	
	Dermatophagoides pteronyssinus				
	European house dust mite				
	Der p 1 antigen Pi, cysteine protease	25	C	62, véase lista de isoalérgenos	
	Der p 2	14	C	62A-C, véase lista de isoaller-	
15	gens				
	Der p 3 tridósina	28/30	C	63	
	Der p 4 amilasa	60	P	64	
	Der p 5	14	C	65	
	Der p 6 quimotripsina	25	P	66	
	Der p 7	22/28	C	67	
	Der p 8 glutación transferasa		C	67A	
20	Der p 9 pro. serina colagenol		?	67B	
	Der p 10 tropomiosina	36	C	Y14906	
	Der p 14 prot. similar apolipoforina		C	Epton p.c.	
	Euroglyphus maynei				
	ácaro Eur m 2		C	véase lista de isoalérgenos	
	Eur m 14 apolipoforina	177	C	AF149827	
25	Glycyphagus domesticus				
	ácaro de almacenamiento				
	Gly d 2		C	72B, véase lista de isoalérgenos	
	Lepidoglyphus destructor				
	ácaro de almacenamiento				
	Lep d 2 Lep d 1	15	C	73, 74, 74A, véase lista de isoalérgenos	
30	Lep d 5		C	75, AJ250278	
	Lep d 7		C	75, AJ271058	
	Lep d 10 tropomiosina		C	75A, AJ250096	
	Lep d 13		C	75, AJ250279	
	Tyrophagus putrescentiae				
	ácaro de almacenamiento				
	Tyr p 2		C	75B, Y12690	
35	E. Animales				
	Bos domesticus				
	ganado doméstico				
	Bos d 2 Ag3, lipocalina	20	C	76, véase lista de alérgenos	
40	(véase también alimentos)				
	Bos d 3 hom S100 unión Ca	11	C	L39834	
	Bos d 4 alta-lactalbumina	14.2	C	M18780	
	Bos d 5 beta-lactoglobulina	18.3	C	X14712	
	Bos d 6 albúmina de suero	67	C	Y73993	
	Bos d 7 inmunoglobulina	160		77	
	Bos d 8 caseinas	20-30		77	
45	Canis familiaris				
	(Canis domesticus)				
	Can f 1	25	C	78, 79	
	perro Can f 2	27	C	78, 79	
	Can f 3 albumina		C	S72946	
	Can f 4	18	P	A59491	

50

55

60

65

ES 2 319 218 T3

	Equus caballus				
	caballo doméstico				
5	Equ c 1	lipocalina	25	C	U70823
	Equ c 2	lipocalina	18.5	P	79A, 79B
	Equ c 3	Ag3 - albúmina	67	C	79C, X74045
	Equ c 4		17	P	79D
	Equ c 5	Agx	17	P	Goubran Botros p.c.
	Felis domesticus				
10	gato (saliva)				
	Fel d 1	gato-1	38	C	15
	Fel d 2	albúmina		C	79E, XB4842
	Fel d 3	cistatina	11	C	79F, AF238996
	Fel d 4	lipocalina	22	C	AY497902
	Fel d 5w	inmunoglobulina A	400		Adedoyin p.c.
	Fel d 6w	inmunoglobulina B			
	800-				
	1000				
15		Adedoyin p.c.			
	Fel d 7w	inmunoglobulina G	150		Adedoyin p.c.
	Cavia porcellus				
	conejillo de indias				
	Cav p 1	homólogo de lipocalina	20	P	SW: P83507, 80
	Cav p 2		17	P	SW: P83508
20	Mus musculus				
	ratón (orina)				
	Mus m 1	MUP	19	C	81, 81A
	Rattus norvegicus				
	rata (orina)				
	Rat n 1		17	C	82, 83
25					
	F. Hongo (moho)				
	1. Ascomycota				
	1.1 Dothideales				
30	Alternaria alternata				
	Alt a 1		28	C	UB2633
	Alt a 2		25	C	63A, U62442
	Alt a 3 prot choque del calor		70	C	U87807, U87808
	Alt a 4 prot disulfidoisomerasa		57	C	X84217
35	Alt a 6 prot P2 ácido ribosomal	11		C	X78222, U87806
	Alt a 7 proteína YCP4		22	C	X78225
	Alt a 10 aldehido deshidrogenasa	53		C	X78227, P42041
	Alt a 11 enolasa		45	C	U82437
	Alt a 12 prot P1 ácido ribosomal	11		C	X84216
40	Cladosporium herbarum				
	Cla h 1		13		83B, 83C
	Cla h 2		23		83B, 83C
	Cla h 3 aldehido deshidrogenasa	53		C	X78228
	Cla h 4 prot P2 ácido ribosomal	11		C	X78223
	Cla h 5 proteína YCP4		22	C	X78224
45	Cla h 6 enolasa		46	C	X78226
	Cla h 12prot P1 ácido ribosomal	11		C	X85180
	1.2 Eurotiales				
	Aspergillus flavus				
	Asp f1 13 prot serina alcalina		34		84
50	Aspergillus fumigatus				
	Asp f 1		18	C	M83781, S39330
	Asp f 2		37	C	U56938
	Asp f 3 proteína peroxisomal		19	C	U20722
	Asp f 4		30	C	AJ001732
	Asp f 5 metaloproteasa		40	C	Z30424
55	Asp f 6 Mn superóxido dismut		26.5	C	U53561
	Asp f 7		12	C	AJ223315
	Asp f 8 prot P2 ribosomal		11	C	AJ224333
	Asp f 9		34	C	AJ223327
	Asp f 10 proteasa aspartica		34	C	X85092
60	Asp f 11 lisomerasa peptidil-prolyl	24			B4A
	Asp f 12 prot choque del calor	90		C	85
	Asp f 13 prot serina alcalina		34		84B
	Asp f 15		16	C	AJ002026
	Asp f 16		43	C	93643813
	Asp f 17			C	AJ224865
65	Asp f 18 prot serina vacuolar		34		84C
	Asp f 22w enolasa		46	C	AF284645
	Asp f 23 L3 proteína ribosomal		41	C	85A, AF464911

ES 2 319 218 T3

	Aspergillus niger				
	Asp n 14 beta-xilosidasa	105	C		AF108944
	Asp n 18 proteasa serina vacuolar	34	C		84B
	Asp n 25 3-fitasa B	66-100		C	85B, P34754
5	Asp n ?	85	C		Z84377
	Aspergillus oryzae				
	Asp o 13 proteasa serina alcalina	34	C		X17561
	Asp o 21 TAKA-amilasa A	53	C		D00434, M33218
	Penicillium brevicompactum				
10	Pen b 13 proteasa serina alcalina	33			86A
	Penicillium chrysogenum				
	(formerly P. notatum)				
	Pen ch 13 proteasa serina alcalina	34			87
	Pen ch 18 proteasa serina vacuolar	32			87
	Pen ch 20 N-acetil glucosaminidas	68			87A
15	Penicillium citrinum				
	Pen c 3 prot. mem. peroxisomal	18			86B
	Pen c 13 proteasa serina alcalina	33			86A
	Pen c 19 prot. P70 choque calor	70	C		U64207
	Pen c 22w enolasa	46	C		AF254643
20	Pen c 24 factor 1 beta elongación		C		AY363911
	Penicillium oxalicum				
	Pen o 18 proteasa serina vacuolar	34			87B
	1.3 Hypocreales				
25	Fusarium culmorum				
	Fus c 1 prot. P2 ribosomal	11*	C		AY077706
	Fus c 2 prot. similar tioredoxina	13*	C		AY077707
	1.4 Onygenales				
30	Trichophyton rubrum				
	Tri r 2		C		88
	Tri r 4 proteasa serina		C		88
	Trichophyton tonsurans				
	Tri t 1	30	P		88A
35	Tri t 4 proteasa serina	83	C		88

40

45

50

55

60

65

ES 2 319 218 T3

	1.5 Saccharomycetales			
	<i>Candida albicans</i>			
	Cand a 1	40	C	89
	Cand a 3 proteina peroxisomal	29	C	AY136739
5	<i>Candida boidinii</i>			
	Cand b 2	20	C	J04984, J04985
	2. Basidiomycotina			
10	2.1 Hymenomycetes			
	<i>Psilocybe cubensis</i>			
	Psi c 1			
	Psi c 2 ciclofilina	16		89A
	<i>Coprinus comatus</i>			
	matacandil			
15	Cop c 1 prot. cremallera leucina	11	C	AJ132235
	Cop c 2			AJ242791
	Cop c 3			AJ242792
	Cop c 5			AJ242793
	Cop c 7			AJ242794
20	2.2 Urediniomycetes			
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			
	Rho m 1 enolasa	47	C	89B
25	Rho m 2 proteasa serina vacuolar	31	C	AY547285
	2.3 Ustilaginomycetes			
	<i>Malassezia furfur</i>			
30	Mala f 2 MF1, proteina membrana peroxisional	21	C	AB011804, 90
	Mala f 3 MF2 proteina membrana peroxisional	20	C	AB011805, 90
	Mala f 4 malato deshidrogenasa mitochondrial	35	C	AF084828, 90A
35	<i>Malassezia sympodialis</i>			
	Mala s 1		C	X96486, 91

40

45

50

55

60

65

ES 2 319 218 T3

	Mala s 5	18*	C	AJ011955
	Mala s 6	17*	C	AJ011956
	Mala s 7		C	AJ011957, 91A
	Mala s 8	19*	C	AJ011958, 91A
5	Mala s 9	37*	C	AJ011959, 91A
	Mala s 10 prot. 70 choque calor	86	C	AJ428052
	Mala s 11 Mn superóxido dismut	23	C	AJ540421
	3. Deuteromycotina			
	3.1 Tuberculariales			
10	<i>Epicoccum purpurascens</i> (antes <i>E. nigrum</i>)			
	Epi p 1 serina proteasa	30	P	SW:PB3340, 91B
	G. Insectos			
15	<i>Aedes aegyptii</i> mosquito			
	Aed a 1 apirase	68	C	L12389
	Aed a 2	37	C	M33157
20	<i>Apis mellifera</i> abeja de la miel			
	Api m 1 fosfolipasa A2	16	C	92
	Api m 2 hialuronidasa	44	C	93
	Api m 4 melitina	3	C	94
	Api m 6	7-8	P	Kettner p.c.
25	Api m 7 serina proteasa CUB	39	C	AY127579
	<i>Bombus pennsylvanicus</i> abejarrón			
	Bom p 1 fosfolipasa	16	P	95
	Bom p 4 proteasa		P	95
30	<i>Blattella germanica</i> cucaraché alemana			
	Bla g 1 Bd90k		C	
	Bla g 2 proteasa aspártica	36	C	96
	Bla g 4 calicina	21	C	97
	Bla g 5 γ-glutación transferasa	22	C	98
35	Bla g 6 troponina C	27	C	98

40

45

50

55

60

65

ES 2 319 218 T3

	<i>Periplaneta americana</i>				
	cucaracha americana				
	Per a 1	Cr-PII			
	Per a 3	Cr-PI			
5	Per a 7	tropomiosina	72-78	C	98A Y14854
	<i>Chironomus kienensis</i>				
	mosquilla Chi k 10	tropomiosina	37	C	
	<i>Chironomus thummi thummi</i>				
	mosquilla Chi t 1-9	hemoglobina	32.5*	C	AJ012184
10	Chi t 1.01	componente III	16	C	99 P02229
	Chi t 1.02	componente IV	16	C	P02230
	Chi t 2.0101	componente I	16	C	P02221
	Chi t 2.0102	componente IX	16	C	P02221
	Chi t 3	componente II-beta	16	C	P02222
15	Chi t 4	componente IIIA	16	C	P02231
	Chi t 5	componente VI	16	C	P02224
	Chi t 6.01	componente VIIA	16	C	P02226
	Chi t 6.02	componente IX	16	C	P02223
	Chi t 7	componente VIIIB	16	C	P02225
	Chi t 8	componente VIII	16	C	P02227
20	Chi t 9	componente X	16	C	P02228
	<i>Ctenocephalides felis felis</i>				
	piojo del gato				
	Cte f 1				
	Cte f 2	Mlb	27	C	AF231352
25	Cte f 3		25	C	
	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>				
	oruga procesionaria del pino				
	Tha p 1		15	P	PIR:A59396, 99A
	<i>Lepisma saccharina</i>				
	pececillo de plata				
30	Lep s 1	tropomiosina	36	C	AJ309202
	<i>Dolichovespula maculata</i>				
	avispon cara blanca				
	Dol m 1	fosfolipasa A1	35	C	100
	Dol m 2	hialuronidasa	44	C	101
35	Dol m 5	antígeno 5	23	C	102, 103
	<i>Dolichovespula arenaria</i>				
	avispon amarillo				
	Dol a 5	antígeno 5	23	C	104

40

45

50

55

60

65

ES 2 319 218 T3

	Polistes annularies					
	avispa Pol a 1	fosfolipasa A1	35	P	105	
	Pol a 2	hialuronidasa	44	P	105	
	Pol a 5	antígeno 5	23	C	104	
5	Polistes dominulus					
	avispa de papel mediterránea					
	Pol d 1					Hoffman p.c.
	Pol d 4 serina proteasa		32-34	C		Hoffman p.c.
	Pol d 5					P81656
10	Polistes exclamans					
	avispa Pol e 1	fosfolipasa A1	34	P	107	
	Pol e 5	antígeno 5	23	C	104	
	Polistes fuscatus					
	avispa Pol f 5	antígeno 5	23	C	106	
15	Polistes gallicus					
	avispa Pol g 5	antígeno 5	24	C	P83377	
	Polistes metricus					
	avispa Pol m 5	antígeno 5	23	C	106	
	Vespa crabro					
	avispón europeo					
20	Vesp c 1 fosfolipasa		34	P	107	
	Vesp c 5 antígeno 5		23	C	106	
	Vespa mandarina					
	avispón asiático gigante					
	Vesp m 1					Hoffman p.c.
	Vesp m 5					P81657
25	Vespula flavopilosa					
	chaqueta amarilla Ves f 5 antígeno 5		23	C	106	
	Vespula germanica					
	chaqueta amarilla Ves g 5 antígeno 5		23	C	106	
	Vespula maculifrons					
30	chaqueta amarilla					
	Ves m 1 fosfolipasa A1		33.5	C	108	
	Ves m 2 hialuronidasa			44	P	109
	Ves m 5 antígeno 5		23	C	104	
	Vespula pensylvanica					
	chaqueta amarilla					
35	Ves p 5 antígeno 5		23	C	106	
	Vespula squamosa					
	chaqueta amarilla					
	Ves s 5 antígeno 5		23	C	106	

40

45

50

55

60

65

ES 2 319 218 T3

	<i>Vespa vidua</i>				
	avispa Ves vi 5	antígeno 5	23	C	106
	<i>Vespa vulgaris</i>				
	chaqueta amarilla				
5	Ves v 1	fosfolipasa A1	35	C	105A
	Ves v 2	hyaluronidase	44	P	105A
	Ves v 5	antígeno 5	23	C	104
	<i>Myrmecia pilosula</i>				
	hormiga saltadora australiana				
10	Myr p 1			C	X70256
	Myr p 2			C	S81785
	<i>Solenopsis geminata</i>				
	hormiga de fuego tropical				
	Sol g 2				Hoffman p.c.
	Sol g 4				Hoffman p.c.
15	<i>Solenopsis invicta</i>				
	hormiga de fuego Sol i 2		13	C	110, 111
	Sol i 3		24	C	110
	Sol i 4		13	C	110
	<i>Solenopsis saevissima</i>				
20	hormiga de fuego brasileña				
	Sol s 2				Hoffman p.c.
	<i>Triatoma protracta</i>				
	chinche besucona de California				
	Tria p 1	Procalina	20	C	AF179004, 111A.
25					
	R. Alimentos				
	<i>Gadus callarias</i>				
	bacalao				
	Gad c 1	alérgeno M	12	C	112, 113
30	<i>Salmo salar</i>				
	salmón atlántico				
	Sal s 1	parvalbúmina	12	C	X97824
	<i>Bos domesticus</i>				
	ganado doméstico				
35					

40

45

50

55

60

65

ES 2 319 218 T3

	Bos d 4 (leche)	alfa-lactalbúmina	14.2	C	M18780
	Bos d 5	beta-lactoglobulina	10.3	C	X14712
5	véase también animales				
	Bos d 6	albúmina de suero	67	C	M73993
	Bos d 7	inmunoglobulina	160		77
	Bos d 8	caseinas	20-30		77
10	<i>Gallus domesticus</i> pollo				
	Gal d 1	ovomucoide	28	C	114, 115
	Gal d 2	ovalbúmina	44	C	114, 115
	Gal d 3	Ag22, conalbúmina	78	C	114, 115
	Gal d 4	lisozima	14	C	114, 115
	Gal d 5	albúmina de suero	69	C	X60688
15	<i>Metapenaeus ensis</i> gamba Met e 1	tropomiosina		C	U06008
	<i>Penaeus aztecus</i> gamba Pen a 1	tropomiosina	36	P	116
	<i>Penaeus indicus</i> gamba Pen i 1	tropomiosina	34	C	116A
20	<i>Penaeus monodon</i> gamba tigre negro				
	Pen m 1	tropomiosina	38	C	
	Pen m 2	arginina quinasa	40	C	AF479772, 117
25	<i>Todarodes pacificus</i> calamar Tod p 1	tropomiosina	38	P	117A
	<i>Helix aspersa</i> caracol de jardín marrón				
	Hel as 1	tropomiosina	36	C	Y14855, 117B
	<i>Haliotis midae</i> oreja de mar				
30	Hal m 1		49		117C
	<i>Rana esculenta</i> rana comestible				
	Ran e 1	parvalbúmina alfa	11,9*	C	AJ315959
	Ran e 2	parvalbúmina beta	11,7*	C	AJ414730
35	<i>Brassica juncea</i> mostaza Oriental				
	Bra j 1	2s albúmina	14	C	118
	<i>Brassica napus</i> colza				
40	Bra n 1	2s albúmina	15	P	118A, P80208

45

50

55

60

65

ES 2 319 218 T3

	<i>Brassica rapa</i>					
	nabo Bra r 2	hom: prohevina	25		P81729	
	<i>Hordeum vulgare</i>					
5	cebada Hor v 15	BMAI-1		15	C	119
	Hor v 16	alfa-amilasa				
	Hor v 17	beta-amilasa				
	Hor v 21	hordeina gamma-3	34	C		119A,
	SW:P80198					
10	<i>Secale cereale</i>					véase lista isoalérgenos
	Dentenosec c 20	secalina				
	<i>Triticum aestivum</i>					
	trigo Tri a 18	aglutinina				
	Tri a 19	gliadina omega-5	65	P	PIR:A59156	
15	<i>Zea mays</i>					
	:maiz	Ze m 14 proteína tranfer. lípidos	9	P	P19656	
	<i>Oryza sativa</i>					
	arroz Ory s 1			C		119B, U31771
	<i>Apium graveolens</i>					
20	apio Api g 1	hom: Bet v 1	16*	C	Z48967	
	Api g 4	profilina			AF129423	
	Api g 5		55/58	P	P81943	
	<i>Daucus carota</i>					
	zahahoria Dau c 1	hom: Bet v 1	16	C	117D, véase lista isoalérgenos	
	Dau c 4	profilina		C	AF456482	
	<i>Corylus avellana</i>					
	avellana					
25	Cor a 1.04	hom: Bet v 1	17	C	véase lista isoalérgenos	
	Cor a 2	profilina	14	C	AF327622	
	Cor a 8	proteína tranfer. lípidos	9	C	AF329829	
	<i>Malus domestica</i>					
	manzana Mal d 1 hom: Bet v 1			C	véase lista isoalérgenos	
	Mal d 2 hom: taumatina			C	AJ243427	
30	Mal d 3 proteína tranfer. lípidos	9	C	Pastorello p.c.		
	Mal d 4 profilina	14,4*	C	véase lista isoalérgenos		
	<i>Pyrus communis</i>					
35	pera Pyr c 1 hom: Bet v 1		18	C	AF05730	
	Pyr c 4 profilina		14	C	AF129424	
	Pyr c 5 hom: isoflavona reductasa	33,5	C	AF071477		
	<i>Persea americana</i>					
	aguacate Pers a 1	endoquitinasa	32	C	Z78202	
	<i>Prunus armeniaca</i>					
40	albaricoque					
	Pru ar 1	hom: Bet v 1		C	U93165	
	Pru ar 3 prot. transf. lipid	9	P			
	<i>Prunus avium</i>					
	cereza dulce					
	Pru av 1 hom: Bet v 1			C	U66076	
45	Pru av 2 hom: taumatina			C	U32440	
	Pru av 3 prot. transf. lipid	10	C	AF221501		
	Pru av 4 profilina	15	C	AF129425		
	<i>Prunus domestica</i>					
	ciruela europea					
	Pru d 3 prot. transf. lipid	9	P	119C		
50	<i>Prunus persica</i>					
	melocotón Pru p 3 prot. transf. lipid	10	P	P81402		
	Pru p 4 Profilina	14	C	véase lista de alérgenos		
	<i>Asparagus officinalis</i>					
	espárrago					
	Aspa o 1 prot. transf. lipid	9	P	119D		
55	<i>Crocus sativus</i>					
	azafrán	Cro s 1	21		Varasteh A-R p.c.	
	<i>Lactuca sativa</i>					
	lechuga					
	Lac s 1	prot. transf. lipid	9		Vieths p.c.	
	<i>Vitis vinifera</i>					
60	uva Vit v 1	prot. transf. lipid	9	P	P80274	
	<i>Musa x paradisiaca</i>					
	plátano Mus xp 1	profilina	15	C	AF377948	
	<i>Ananas comosus</i>					
	piña					
	Ana c 1 Profilina		15	C	AF377949	
65	Ana c 2 bromelaina		22,8*	C	119E-G, D14059	
	<i>Citrus limon</i>					
	limón Cit l 3 prot. transf. lipid	9	P	Torrejon p.c.		
	<i>Citrus sinensis</i>					

ES 2 319 218 T3

	naranja dulce				
	Cit s 1 proteína similar germina	23	P	Torrejon p.c.	
	Cit s 2 profilina	14	P	Torrejon p.c.	
	Cit s 3 proteína transf. lípidos	9	P	Torrejon p.c.	
5	Litchi chinensis				
	Litchi Lit c 1	15	C	AY049013	
	Sinapis alba				
	mostaza amarilla				
	Sin a 1 2S albúmina	14	C	120	
	Glycine max				
10	soja	Gly m 1 RPS	7	P	120A
	Gly m 2	8	P	A57106	
	Gly m 3 profilina	14	C	véase lista de alérgenos	
	Gly m 4 (SAM22) PR-10 prot.	17	C	X60043, 120B	
	Vigna radiata				
	judía mung				
15	Vig r 1 PR-10 proteína	15	C	AY792956	
	Arachis hypogaea				
	cacahuete Ara h 1 vicilina	63.5	C	L34402	
	Ara h 2 conglutina	17	C	177197	
	Ara h 3 glicinina	60	C	AF093541	
	Ara h 4 glicinina	37	C	AF086821	
20	Ara h 5 profilina	15	C	AF059616	
	Ara h 6 hom: conglutina	15	C	AF092846	
	Ara h 7 hom: conglutina	15	C	AF091737	
	Ara h 8 PR-10 proteína	17	C	AY328088	
	Lens culinaris				
	lenteja Len c 1 vicilina	47	C	véase lista de alérgenos	
25	Len c 2 prot. biotinilada semilla	66	P	120C	
	Pisum sativum				
	guisante Pis s 1 vicilina	44	C	véase lista de alérgenos	
	Pis s 2 convicilina	63	C	pendiente	
	Actinidia chinensis				
	kiwi Act c 1 proteasa cisteína	30	P	P00785	
30	Act c 2 prot. similar taumatina	24	P	SW:PB1370, 121	
	Capsicum annuum				
	pimiento				
	Cap a 1w prot. similar osmotina	23	C	AJ297410	
	Cap a 2 profilina	14	C	AJ417552	
35	Lycopersicon esculentum				
	tomate Lyc e 1 profilina	14	C	AJ417553	
	Lyc e 2 b-fructofuranosidasa	50	C	véase lista de alérgenos	
	Lyc e 3 prot. transf. lípidos	6	C	U81996	
	Solanum tuberosum				
	patata Sola t 1 patatina	43	P	P15476	
	Sola t 2 inhibidor D catepsina	21	P	P16348	
40	Sola t 3 inhib. proteasa cisteína	21	P	P20347	
	Sola t 4 inhib. proteasa aspártica	16+4	P	P30941	
	Bertholletia excelsa				
	nuez de Pará				
	Ber e 1 2S albúmina	9	C	P04403, M17146	
	Ber e 2 lis prot. almacen semilla glob.	29	C	AY221641	
45	Juglans nigra				
	nuez negra				
	Jug n 1 2S albúmina	19*	C	AY102930	
	Jug n 2 prot. similar vicilina	56*	C	AY102931	
	Juglans regia				
	nuez inglesa				
50	Jug r 1 2S albúmina		C	U66866	
	Jug r 2 vicilina	44	C	RF066055	
	Jug r 3 prot. transf. lípidos	9	P	Pastorello	
	Anacardium occidentale				
	Anacardo Ana o 1 prot. similar vicilina	50	C	véase lista de alérgenos	
	Ana o 2 prot. similar legumina	55	C	AF453947	
55	Ana o 3 2S albúmina	14	C	AY081853	
	Ricinus communis				
	semilla de ricino				
	Ric c 1 2S albúmina		C	P01089	
	Sesamum indicum				
	sésamo Ses i 1 2S albúmina	9	C	121A, AF240005	
	Ses i 2 2S albúmina	7	C	AF091841	
60	Ses i 3 7S prot. similar vicilina	45	C	AF240006	
	Ses i 4 oleosín	17	C	AAC23840	
	Ses i 5 oleosín	15	C	AAD42942	
	Cucumis melo				
	melón bordado				

ES 2 319 218 T3

	Cuc m 1 serina proteasa	66	C	D32206	
	Cuc m 2 profilina	14	C	AY271295	
	Cuc m 3 p. rel. patogénesis PR-1	16*	P	P83834	
5	I. Otros				
	Anisakis simplex				
	nematodo				
	Ani s 1	24	P	121B, A59069	
	Ani s 2	97	C	AF173004	
10	Ani s 3	41	C	121C, Y19221	
	Ani s 4	9	P	P83885	
	Argas reflexus				
	garrapata de paloma				
	Arg r 1	17	C	AJ697694	
	Ascaris suum				
15	gusano Asc s 1	10	P	122	
	Carica papaya				
	papaya Car p 3w	23, 4*	C	122A, M15203	
	Dendronephthya nipponica				
	coral suave				
	Den n 1	53	P	122B	
20	Hevea brasiliensis				
	goma (latex)				
	Hev b 1	factor elongación	P	123, 124	
	Hev b 2	1, 3-glucanasa	C	125	
	Hev b 3	24	P	126, 127	
25	Hev b 4	componente de	P	128	
		complejo microhelix			
	Hev b 5	115	C	U42640	
	Hev b 6.01 precursor haveína	16	C	M36986, p02877	
	Hev b 6.02 haveína	20	C	M36986, p02877	
	Hev b 6.03 fragmento C-terminal	5	C	K36986, p02877	
30	Hev b 7.01 hom patatina de R-serum 42	14	C	U80598	
	Hev b 7.02 hom patatina de C-serum 44	C		AJ223038	
	Hev b 8 profilina	14	C	véase lista de isoalérgenos	
	Hev b 9 enolasa	51	C	AJ132580	
35					
	Hev b 10 Mn superóxido dism.	26	C	véase lista de isoalérgenos	
	Hev b 11 quitinasa clase 1	C		véase lista de isoalérgenos	
	Hev b 12 proteína transf. lípidos	9,3	C	AY057860	
	Hev b 13 esterasa	42	P	P83269	
	Homo sapiens				
	autoalérgenos humanos				
40	Hom s 1	73*	C	Y14314	
	Hom s 2	10, 3*	C	X80909	
	Hom s 3	20, 1*	C	X89905	
	Hom s 4	36*	C	Y17711	
	Hom s 5	42, 6*	C	P02538	
45	Triplochiton scleroxylon				
	obreche Trip s 1	quitinasa clase 1	38, 5	P	Respch1 p.c.

Referencias

- 50 1. **Marsh, D.G., and L.R. Freidhoff.** 1992. ALBE, an allergen database. IUIS, Baltimore, MD, Edition 1.0.
2. **Marsh, D. G., L. Goodfriend, T. P. King, H. Lowenstein, and T. A. E. Platts-Mills.** 1986. *Allergen nomenclature*. Bull WHO 64:767-770.
- 55 3. **King, T.P., P.S. Norman, and J.T. Cornell.** 1964. Isolation and characterization of allergen from ragweed pollen. II. *Biochemistry* 3: 458-468.
4. **Lowenstein, H.** 1980. Timothy pollen allergens. *Allergy* 35: 188-191.
- 60 5. **Aukrust, L.** 1980. Purification of allergens in *Cladosporium herbarum*. *Allergy* 35: 206-207.
6. **Demerec, M., E. A. Adelberg, A. J. Clark, and P. E. Hartman.** 1966. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* 54:61-75.
- 65 7. **Bodmer, J. G., E. D. Albert, W. F. Bodmer, B. Dupont, H. A. Erlich, B. Mach, S. G. E. Marsh, W. R. Mayr, P. Parham, T. Sasuki, G. M. Th. Schreuder, J. L. Strominger, A. Svejgaard, and P. I. Terasaki.** 1991. Nomenclature for factors of the HLA system, 1990. *Immunogenetics* 33:301-309.

ES 2 319 218 T3

8. **Griffith, I.J., J. Pollock, D.G. Klapper, B.L. Rogers, and A.K. Nault.** 1991. Sequence polymorphism of Amb a I and Amb a II, the major allergens in *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed). *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 96: 296-304.
- 5 9. **Roeber, M., D. G. Klapper, L. Goodfriend, W. B. Bias, S. H. Hsu, and D. G. Marsh.** 1985. Immunochemical and genetic studies of Amb t V (Ra5G), an Ra5 homologue from giant ragweed pollen. *J. Immunol.* 134: 3062-3069.
- 10 10. **Metzler, W. J., K. Valentine, M. Roeber, M. Friedrichs, D. G. Marsh, and L. Mueller.** 1992. Solution structures of ragweed allergen Amb t V. *Biochemistry* 31: 5117-5127.
11. **Metzler, W. J., K. Valentine, M. Roeber, D. G. Marsh, and L. Mueller.** 1992. Proton resonance assignments and three-dimensional solution structure of the ragweed allergen Amb a V by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 31: 8697-8705.
- 15 12. **Goodfriend, L., A.M. Choudhury, J. Del Carpio, and T.P. King.** 1979. Cytochromes C: New ragweed pollen allergens. *Fed. Proc.* 38: 1415.
13. **Ekramoddoullah, A. K. M., F. T. Kisil, and A. H. Sehon.** 1982. Allergenic cross reactivity of cytochrome c from Kentucky bluegrass and perennial ryegrass pollens. *Mol. Immunol.* 19:1527-1534.
- 20 14. **Ansari, A. A., E. A. Killoran, and D. G. Marsh.** 1987. An investigation of human response to perennial ryegrass (*Lolium perenne*) pollen cytochrome c (Lol p X). *J. Allergy Clin. Immunol.* 80: 229-235.
- 25 15. **Morgenstern, J.P., I.J. Griffith, A.W. Brauer, B.L. Rogers, J.F. Bond, M.D. Chapman, and M. Kuo.** 1991. Amino acid sequence of Fel d I, the major allergen of the domestic cat: protein sequence analysis and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9690-9694.
16. **Griffith, I.J., S. Craig, J. Pollock, X. Yu, J.P. Morgenstern, and B.L. Rogers.** 1992. Expression and genomic structure of the genes encoding FdI, the major allergen from the domestic cat. *Gene* 113: 263-268.
- 30 17. **Weber, A., L. Marz, and F. Altmann.** 1986. Characteristics of the asparagine-linked oligosaccharide from honeybee venom phospholipase A2. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 321-324.
18. **Weber, A., H. Schroder, K. Thalberg, and L. Marz.** 1987. Specific interaction of IgE antibodies with a carbohydrate epitope of honey bee venom phospholipase A2. *Allergy* 42: 464-470.
- 35 19. **Stanworth, D. R., K. J. Dorrington, T. E. Hugli, K. Reid, and M. W. Turner.** 1990. Nomenclature for synthetic peptides representative of immunoglobulin chain sequences. *Bulletin WHO* 68: 109-111.
- 20 20. **Rafnar, T., I. J. Griffith, M. C. Kuo, J. F. Bond, B. L. Rogers, and D.G. lappar.** 1991. Cloning of Amb a I (Antigen E), the major allergen family of short ragweed pollen. *J. Biol. Chem.* 266: 1229-1236.
21. **Rogers, B.L., J.P. Morgenstern, I.J. Griffith, X.B. Yu, C.M. Counsell, A.W. Brauer, T.P. King, R.D. Garman, and M.C. Kuo.** 1991. Complete sequence of the allergen Amb a II: recombinant expression and reactivity with T cells from ragweed allergic patients. *J. Immunol.* 147: 2547-2552.
- 45 22. **Klapper, D.G., L. Goodfriend, and J.D. Capra.** 1980. Amino acid sequence of ragweed allergen Ra3. *Biochemistry* 19: 5729-5734.
23. **Ghosh, B., M.P. Perry, T. Rafnar, and D.G. Marsh.** 1993. Cloning and expression of immunologically active recombinant Amb a V allergen of short ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen. *J. Immunol.* 150: 5391-5399.
- 50 24. **Roeber, M., R. Hussain, D. G. Klapper, and D. G. Marsh.** 1983. Isolation and properties of a new short ragweed pollen allergen, Ra6. *J. Immunol.* 131: 706-711.
25. **Lubahn, B., and D.G. Klapper.** 1993. Cloning and characterization of ragweed allergen Amb a VI (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91: 338.
26. **Roeber, M., and D.G. Marsh.** 1991. Isolation and characterization of allergen Amb a VII from short ragweed pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87: 324.
- 60 27. **Goodfriend L, Choudhury AM, Klapper DG, Coulter KM, Dorval G, DelCarpio J, Osterland CK.** Ra5G, a homologue of Ra5 in giant ragweed pollen: isolation, HLA-DR-associated activity and amino acid sequence. *Mol Immunol* 22: 899-906, 1985.
28. **Himly M, Jahn-Schmid B, Dedic A, Kelemen P, Wopfner N, Altmann F, van Ree R, Briza P, Richter K, Ebner C, Ferreira F.** Art v 1, the major allergen of mugwort pollen, is a modular glycoprotein with a defensin-like and a hydroxyproline-rich domain. *FASEB J* 17: 106-108, 2003.

- 28A. Nilsen, B. M., K. Sletten, M. O'Neill, B. Smestead Paulsen, and H. van Halbeek. 1991. Structural analysis of the glycoprotein allergen Art v II from pollen of mugwort (*Artemesia vulgaris*). *J. Biol. Chem.* 266: 2660-2668.
29. Wopfner N, Willeroidee M, Hebenstreit D, van Ree R, Aalbers M, Briza P, Thalhamer J, Ebner C, Richter K, Ferreira F. Molecular and immunological characterization of profilin from mugwort pollen. *Biol Chem* 383: 1779-1789, 2002.
- 29A. Jimenez A, Moreno C, Martinez J, Martinez A, Bartolome B, Guerra F, Palacios R 1994. Sensitization to sunflower pollen: only an occupational allergy? *Int Arch Allergy Immunol* 105: 297-307.
- 29B. Barderas R, Villalba M, Lombardero M, Rodriguez R. Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 127: 47-54, 2002.
- 29C. Carnés J, Fernández-Caldas E, Casanova M, Lahoz C, Colás C. Immunochemical characterization of Salsola kali pollen extracts. *Allergy* 56, Supplement 68: 274, 2001.
- 29D. Giuliani A, Pini C, Bonini S, Mucci N, Ferroni L, Vicari G: Isolation and purification of a major allergen from *Parietaria officinalis* pollen. *Allergy* 42: 434-440, 1987.
30. Smith, P.M., Suphioglu, C., Griffith, I.J., Theriault, K., Knox, R.B. and Singh, M.B. 1996. Cloning and expression in yeast *Pichia pastoris* of a biologically active form of Cyn d 1, the major allergen of Bermuda grass pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98: 331-343.
31. Suphioglu, C., Ferreira, F. and Knox, R.B. 1997. Molecular cloning and immunological characterisation of Cyn d 7, a novel calcium-binding allergen from Bermuda grass pollen. *FEBS Lett.* 402: 167-172.
- 31a. Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez J, Martinez A, and Palacios R. 1997. Cloning and high level expression of Cynodon dactylon (Bermuda grass) pollen profilin (Cyn d 12) in *Escherichia coli*: purification and characterization of the allergen. *Clin Exp Allergy* 27: 1307-1313.
32. Mecheri, S., G. Peltre, and B. David. 1985. Purification and characterization of a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen: The Ag Dg 1. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 78: 283-289.
33. Roberts, A.M., L.J. Bevan, P.S. Flora, I. Jepson, and M.R. Walker. 1993. Nucleotide sequence of cDNA encoding the Group II allergen of Cocksfoot/Orchard grass (*Dactylis glomerata*), Dac g II. *Allergy* 48: 615-623.
- 33a. Guerin-Marchand, C., Senechal, H., Bouin, A.P., Leduc-Brodard, V., Taudou, G., Weyer, A., Peltre, G. and David, B. 1996. Cloning, sequencing and immunological characterization of Dac g 3, a majorallergen from *Dactylis glomerata* pollen. *Mol. Immunol.* 33: 797-806.
34. Klysner, S., K. Welinder, H. Lowenstein, and F. Matthiesen. 1992. GroupVallergens in grass pollen IV. Similarities in amino acid compositions and amino terminal sequences of the group V allergens from *Lolium perenne*, *Poa pratensis* and *Dactylis glomerata*. *Clin. Exp. Allergy* 22: 491-497.
35. Perez, M., G. Y. Ishioka, L. E. Walker, and R.W. Chesnut. 1990. cDNAcloningand immunological characterization of the rye grass allergen Lol p I. *J. Biol. Chem.* 265: 16210-16215.
36. Griffith, I. J., P. M. Smith, J. Pollock, P. heerakulpisut, A. Avjioglu, S. Davies, T. Hough, M. B. Singh, R. J. Simpson, L. D. Ward, and R. B. Knox. 1991. Cloning and sequencing of Lol p I, the major allergenic protein of ryegrass pollen. *FEBS Letters* 279: 210-215.
37. Ansari, A. A., P. Shenbagamurthi, and D.G. Marsh. 1989. Complete amino acid sequence of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p II. *J. Biol. Chem.* 264: 11181-11185.
- 37a. Sidoli, A., Tamborini, E., Giuntini, I., Levi, S., Volonte, G., Paini, C., De Lalla, C., Siccardi, A.G., Baraille, F.E., Galliani, S. and Arosio, P. 1993. Cloning, expression, and immunological characterization of recombinant *Lolium perenne* allergen Lol p II. *J. Biol. Chem.* 268: 21819-21825.
38. Ansari, A. A., P. Shenbagamurthi, and D. G. Marsh. 1989. Complete primary structure of a *Lolium perenne* (perennial rye grass) pollen allergen, Lol p III: Comparison with known Lol p I and II sequences. *Biochemistry* 28: 8665-8670.
39. Singh, M. B., T. Hough, P. Theerakulpisut, A. Avjioglu, S. Davies, P. M. Smith, P. Taylor, R. J. Simpson, L. D. Ward, J. McCluskey, R. Puy, and R.B. Knox. 1991. Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: Intracellular targeting to the amyloplost. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 1384-1388.
- 39a. van Ree R, Hoffman DR, van Dijk W, Brodard V, Mahieu K, Koeleman CA, Grande M, van Leeuwen WA, Aalberse RC. 1995. Lol p XI, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitorrelated proteins. *J Allergy Clin Immunol* 95: 970-978.

40. **Suphioglu**, C. and **Singh**, M.B. 1995. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of Pha a 1 and four isoforms of Pha a 5, the major allergens of canary grass pollen. *Clin. Exp. Allergy* 25: 853-865.
- 5 41. **Dolecek**, C., **Vrtala**, S., **Laffer**, S., **Steinberger**, P., **Kraft**, D., **Scheiner**, O. and **Valenta**, R. 1993. Molecular characterization of Phl p II, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *FEBS Lett.* 335: 299-304.
- 10 41A. **Fischer** S., **Grote** M., **Fahlbusch** B., **Muller** WD, **Kraft** D., **Valenta** R. 1996. Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol* 98: 189-198.
- 15 42. **Matthiesen**, F., and H. **Lowenstein**. 1991. Group V allergens in grass pollens. I. Purification and characterization of the group V allergen from *Phleum pratense* pollen, Phl p V. *Clin. Exp. Allergy* 21: 297-307.
43. **Petersen**, A., **Bufé**, A., **Schramm**, G., **Schlaak**, M. and **Becker**, W.M. 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: 55-59.
- 20 43A. **Marknell DeWitt** A., **Niederberger** V., **Lehtonen** P., **Spitzauer** S., **Sperr** WR, **Valent** P., **Valenta** R., Lidholm J. Molecular and immunological characterization of a novel timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phl p 11. *Clin Exp Allergy* 32: 1329-1340, 2002.
- 25 44. **Valenta**, R., **Ball**, T., **Vrtala**, S., **Duchene**, M., **Kraft**, D. and **Scheiner**, O. 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: 106-118.
46. **Esch**, R. E., and D. G. **Klapper**. 1989. Isolation and characterization of a major cross-reactive grass group I allergenic determinant. *Mol. Immunol.* 26: 557-561.
- 25 47. **Olsen**, E., L. **Zhang**, R. D. **Hill**, F. T. **Kisil**, A. H. **Sehon**, and S. **Mohapatra**. 1991. Identification and characterization of the Poa p IX group of basic allergens of Kentucky bluegrass pollen. *J. Immunol.* 147: 205-211.
- 30 48. **Ayjioglu**, A., M. **Singh**, and R.B. **Knox**. 1993. Sequence analysis of Sor h I, the group I allergen of Johnson grass pollen and its comparison to rye-grass Lol p I (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91: 340.
52. **Kos** T., **Hoffmann-Sommergruber** K., **Ferreira** F., **Hirschwehr** R., **Ahorn** H., **Horak** F., **Jager** S., **Sperr** W., **Kraft** D., **Scheiner** O. 1993. Purification, characterization and N-terminal amino acid sequence of a new major allergen from European chestnut pollen-Cas s 1. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 1086-92.
- 40 53. **Díaz-Perales** A., **Lombardero** M., **Sánchez-Monge** R., **García-Sellés** FJ., **Pernas** M., **Fernández-Rivas** M., **Barber** D., **Salcedo** G. 2000. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of Artemisia pollen, Castaneae nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* 30: 1403-1410.
54. **Ipsen**, H., and O.C. **Hansen**. 1991. The NH₂-terminal amino acid sequence of the immunochemically partial identical major allergens of alder (*Alnus glutinosa*) Aln g I, birch (*Betula verrucosa*) Bet v I, hornbeam (*Carpinus betulus*) Car b I and oak (*Quercus alba*) Que a I pollens. *Mol. Immunol.* 28: 1279-1288.
- 45 55. **Tanai**, M., S. **Ando**, M. **Usui**, M. **Kurimoto**, M. **Sakaguchi**, S. **Inouye**, and T. **Matuhasi**. 1988. N-terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (Cry j I). *FEBS Lett.* 239: 329-332.
56. **Griffith**, I.J., A. **Lussier**, R. **Garman**, R. **Koury**, H. **Yeung**, and J. **Pollock**. 1993. The cDNA cloning of Cry j I, the major allergen of *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar) (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91: 339.
57. **Sakaguchi**, M., S. **Inouye**, M. **Tanai**, S. **Ando**, M. **Usui**, and T. **Matuhasi**. Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Allergy* 45: 309-312, 1990.
- 55 57A. **Yokoyama** M., **Miyahara** M., **Shimizu** K., **Kino** K., **Tsunoo** H. Purification, identification, and cDNA cloning of Jun a 2, the second major allergen of mountain cedar pollen. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 195-202, 2000.
- 57B. **Midoro-Horiuti** T., **Goldblum** RM, **Kurosaki** A., **Wood** TG, **Brooks** EG. Variable Expression of Pathogenesis Related Protein Allergen in Mountain Cedar (*Juniperus ashei*) Pollen. *J Immunol* 164: 2188-2192, 2000.
- 60 57C. **Tinghino** R., **Barletta** B., **Palumbo** S., **Afferni** C., **Iacovacci** P., **Mari** A., **Di Felice** G., **Pini**, C. Molecular characterization of a cross-reactive *Juniperus oxycedrus* pollen allergen, Jun o 2: a novel calcium-binding allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101: 772-777, 1998.
58. **Gross** GN, **Zimburean** JM, **Capra** JD. Isolation and partial characterization of the allergen in mountain cedar pollen. *Scand J Immunol* 8: 437-441, 1978.
- 65 58A. **Obispo** TM, **Melero** JA, **Carpizo** JA, **Carreira** J., **Lombardero** M. The main allergen of *Olea europaea* (Ole e I) is also present in other species of the oleaceae family. *Clin Exp Allergy* 23: 311-316, 1993.

- 58B. **Midoro-Horiuti T, Goldblum RM, Brooks EG.** Identification of mutations in the genes for the pollen allergens of eastern red cedar (*Juniperus virginiana*). *Clin Exp Allergy* 31: 771-778, 2001.
- 5 59. **Lombardero M., Barbas J.A., Moscoso del Prado J., Carreira J.** cDNA sequence analysis of the main olive allergen, Ole e I. *Clin. Exp. Allergy* 24: 765-770, 1994.
- 10 60. **Villalba, M., E. Batanero, C. Lopez-Otin, L.M. Sanchez, R.I. Monsalve, M.A. Gonzalez de la Pena, C. Lahoz, and R. Rodriguez.** Amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen (*Olea europaea*). *Eur. J. Biochem.* 216: 863-869, 1993.
- 15 60A. **Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez J, Martinez A, Palacios R.** Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* 100: 365-372, 1997.
- 15 60B. **Batanero E, Villalba M, Ledesma A, Puente XS, Rodriguez R.** Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. *Eur J Biochem* 241: 772-778, 1996.
- 20 60C. **Batanero E, Ledesma A, Villalba M, Rodriguez R.** Purification, amino acid sequence and immunological characterization of Ole e 6, a cysteine-enriched allergen from olive tree pollen. *FEBS Lett.* 410: 293-296, 1997.
- 20 60D. **Tejera ML, Villalba M, Batanero E, Rodriguez R.** Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* 104: 797-802, 1999.
- 25 60E. **Ledesma A, Villalba M, Rodriguez R.** Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca (2+)-binding protein from olive pollen with allergenic activity. *FEBS Lett.* 466: 192-196, 2000.
- 25 60F. **Barral P, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Villalba M, Rodriguez R.** A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecies [correction of interspecie] cross-reactivity. *J Immunol* 172: 3644-3651, 2004.
- 30 61. **Yi FC, Cheong N, Shek PC, Wang DY, Chua KY, Lee BW.** Identification of shared and unique immunoglobulin E epitopes of the highly conserved tropomyosins in *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 32: 1203-1210, 2002.
- 35 61A. **Ramos JD, Cheong N, Lee BW, Chua KY.** cDNA cloning and expression of Blo t 11, the *Blomia tropicalis* allergen homologous to paramyosin. *Int Arch Allergy Immunol* 126: 286-293, 2001.
- 35 62. **Chua, K. Y., G. A. Stewart, and W. R. Thomas.** Sequence analysisof cDNA encoding for a major house dust mite allergen, Der p I. *J. Exp. Med.* 167: 175-182, 1988.
- 40 62A. **Chua, K. Y., C. R. Doyle, R. J. Simpson, K. J. Turner, G. A. Stewart, and W. R. Thomas.** Isolation of Cdna coding for the major mite allergen Der p II by IgE plaque immunoassay. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91: 118-123, 1990.
- 45 62B. **Smith AM, Benjamin DC, Derewenda U, Smith WA , Thomas WR, Chapman MD.** Sequence polymorphisms and antibody binding to the group 2 dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 124: 61-63, 2001.
- 45 62C. **Smith AM, Benjamin DC, Hozic N, Derewenda U, Smith WA, Thomas WR, Gafvelin G, van Hage-Hamsten M, Chapman MD.** The molecular basis of antigenic cross-reactivity between the group 2 mite allergens. *J Allergy Clin Immunol* 107: 977-984, 2001.
- 50 63. **Smith WA, Thomas WR.** Comparative analysis of the genes encoding group 3 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae*. *Int Arch Allergy Immunol* 109: 133-140, 1996.
- 55 64. **Lake, F.R., L.D. Ward, R.J. Simpson, P.J. Thompson, and G.A. Stewart.** House dust mite-derived amylase: Allergenicity and physicochemical characterisation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87: 1035-1042, 1991.
- 60 65. **Tovey, E. R., M. C. Johnson, A. L. Roche, G. S. Cobon, and B. A. Baldo.** Cloning and sequencing of a cDNA expressing a recombinant house dust mite protein that binds human IgE and corresponds to an important low molecular weight allergen. *J. Exp. Med.* 170: 1457-1462, 1989.
- 60 66. **Yasueda, H., T. Shida, T. Ando, S. Sugiyama, and H. Yamakawa.** 1991. Allergenic and proteolytic properties of fourth allergens from Dermatophagoides mites. In: "Dust Mite Allergens and Asthma. Report of the 2nd international workshop" A. Todt, Ed., UCB Institute of Allergy, Brussels, Belgium, pp. 63-64.
- 65 67. **Shen, H.-D., K.-Y. Chua, K.-L. Lin, K.-H. Hsieh, and W.R. Thomas.** Molecular cloning of a house dust mite allergen with common antibody binding specificities with multiple components in mite extracts. *Clin. Exp. Allergy* 23: 934-940, 1993.

- 67A. O'Neil GM, Donovan GR, Baldo BA. Cloning and characterisation of a major allergen of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase. *Biochim Biophys Acta*, 1219: 521-528, 1994.
- 5 67B. King C, Simpson RJ, Moritz RL, Reed GE, Thompson PJ, Stewart GA. The isolation and characterization of a novel collagenolytic serine protease allergen (Der p 9) from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* 98: 739-747, 1996.
- 10 68. Lind P, Hansen OC, Horn N. The binding of mouse hybridoma and human IgE antibodies to the major fecal allergen, Der p I of *D. pteronyssinus*. *J. Immunol.* 140: 4256-4262, 1988.
- 15 69. Dilworth, R. J., K. Y. Chua, and W. R. Thomas. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust allergen Der f I. *Clin. Exp. Allergy* 21: 25-32, 1991.
- 15 70. Nishiyama, C., T. Yunki, T. Takai, Y. Okumura, and H. Okudaira. Determination of three disulfide bonds in a major house dust mite allergen, Der f II. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 101: 159-166, 1993.
- 20 70A. Trudinger, M., K. Y. Chua, and W. R. Thomas. cDNA encoding the major dust mite allergen Der f II. *Clin. Exp. Allergy* 21: 33-38, 1991.
- 20 71. Shen HD, Chua KY, Linv WL, vHsieh KH, vThomas WR. Molecular cloning and immunological characterization of the house dust mite allergen Der f 7. *Clin Exp Allergy* 25: 1000-1006, 1995.
- 25 71A. Tategaki A, Kawamoto S, Aki T, Jyo T, Suzuki O, Shigeta S, Ono K. Newly described house dust mite allergens. *ACI International suppl.* 1: 74-76, 2000.
72. Aki T, Kodama T, Fujikawa A, Miura K, Shigeta S, Wada T, Jyo T, Murooka Y, Oka S, Ono K. Immunological characterisation of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. *J Allergy Clin Immunol* 96: 74-83, 1995.
- 30 72A. Tsai L, Sun Y, Chao P, Ng H, Hung M, Hsieh K, Liaw S, Chua K. Sequence analysis and expression of a cDNA clone encoding a 98-kDa allergen in *Dermatophagoides farinae*. *Clin Exp Allergy* 29: 1606-1613, 1999.
- 35 72B. Gafvelin G, Johansson E, Lundin A, Smith AM, Chapman MD, Benjamin DC, Derewenda U, Van Hage-Hamsten M. Cross-reactivity studies of a new group 2 allergen from the dust mite *Glycyphagus domesticus*, Gly d 2, and group 2 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Lepidoglyphus destructor*, and *Tyrophagus putrescentiae* with recombinant allergens. *J Allergy Clin Immunol* 107: 511-518, 2001.
- 40 73. Van Hage-Hamsten, M., T. Bergman, E. Johansson, B. Persson, H. Jornvall, B. Harfast, and S.G.O. Johansson. N-terminal amino acid sequence of major allergen of the mite *Lepidoglyphus destructor* (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91: 353, 1993.
74. Varela J, Ventas P, Carreira J, Barbas JA, Gimenez-Gallego G, Polo F. Primary structure of Lep d I, the main *Lepidoglyphus destructor* allergen. *Eur J Biochem* 225: 93-98, 1994.
- 45 74A. Schmidt M, van der Ploeg I, Olsson S, van Hage Hamsten M. The complete cDNA encoding the *Lepidoglyphus destructor* major allergen Lep d 1. *FEBS Lett* 370: 11-14, 1995.
75. Eriksson TLJ, Rasool O, Huecas S, Whitley P, Crameri R, Appenzeller U, Gafvelin G, van Hage-Hamsten M. Cloning of three new allergens from the dust mite *Lepidoglyphus destructor* using phage surface display technology. *Eur. J. Biochem.* 268: 287-294, 2001.
- 50 75A. Saarne T, Kaiser L, Rasool O, Huecas S, van Hage-Hamsten M, Gafvelin G: Cloning and characterisation of two IgE-binding proteins, homologous to tropomyosin and a-tubulin, from the mite *Lepidoglyphus destructor*. *Int Arch Allergy Immunol* 130: 258-265, 2003.
- 55 75B. Eriksson TL, Johansson E, Whitley P, Schmidt M, Elsayed S, van Hage-Hamsten M. Cloning and characterisation of a group II allergen from the dust mite *Tyrophagus putrescentiae*. *Eur. J. Biochem.* 251 (1-2), 443-447, 1998.
- 60 76. Rautiainen J, Rytkonen M, Pelkonen J, Pentikainen J, Perola O, Virtanen T, Zeiler T, Mantyjarvi R. BDA20, a major bovine dander allergen characterized at the sequence level is Bos d 2. Submitted.
77. Gjesing B, Lowenstein H. Immunochemistry of food antigens. *Ann Allergy* 53: 602, 1984.
- 65 78. de Groot, H., K.G.H. Goei, P. van Swieten, and R.C. Aalberse. Affinity purification of a major and a minor allergen from dog extract: Serologic activity of affinity-purified Can f I and Can f I-depleted extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87: 1056-1065, 1991.
79. Konieczny, A. Personal communication; *Immunologic Pharmaceutical Corp.*

- 79A. **Bulone**, V. Separation of horse dander allergen proteins by two-dimensional electrophoresis. Molecular characterisation and identification of Equ c 2.0101 and Equ c 2.0102 as lipocalin proteins. *Eur J Biochem* 253: 202-211, 1998.
- 5 79B. Swiss-Prot acc. P81216, P81217.
- 79C. **Dandeu** J. P., **Rabillon** J., **Divanovic** A., **Carmi-Leroy** A., **David** B. (1993). Hydrophobic interaction chromatography for isolation and purification of Equ c 1, the horse major allergen. *J. Chromatogr.* 621: 23-31.
- 10 79D. **Goubran Botros** H., **Rabillon** J., **Grégoire** C., **David** B., **Dandeu** J.P. 1998. Thiophilic absorption chromatography: purification of Equ c 2 and Equ c 3, two horse allergens from horse sweat. *J. Chromatogr. B* 710: 57-65.
- 15 79E. **Hilger** C, **Kohnen** M, **Grigioni** F, **Lehnert** C, **Hentges** F. Allergic cross-reactions between cat and pig serum albumin. *Allergy* 52: 179-187, 1997; and **Hilger** C, **Grigioni** F, **Hentges** F. Sequence of the gene encoding cat (*Felis domesticus*) serum albumin. *Gene* 169: 295-296, 1996.
- 20 79F. **Ichikawa** K, **Vailes** LD, **Pomes** A, **Chapman** MD. Molecular cloning, expression and modeling of cat allergen, cystatin (Fel d 3), a cysteine protease inhibitor. *Clin Exp Allergy, In Press* 2001.
- 25 80. **Fahlbusch** B, **Rudeschko** O, **Szilagyi** U, **Schlott** B, **Henzgen** M, **Schlenvoigt** G, **Schubert** H. Purification and partial characterization of the major allergen, Cav p 1, from guinea pig *Cavia porcellus*. *Allergy* 57: 417-422, 2002.
- 25 81. **McDonald**, B., M. C. **Kuo**, J. L. **Ohman**, and L. J. **Rosenwasser**. 1988. A 29 amino acid peptide derived from rat alpha 2 euglobulin triggers murine allergen specific human T cells (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 83: 251.
- 30 81A. **Clarke**, A. J., P. M. **Cissold**, R. A. **Shawi**, P. **Beattie**, and J. **Bishop**. 1984. Structure of mouse urinary protein genes: differential splicing configurations in the 3'-non-coding region. *EMBO J* 3: 1045-1052.
- 30 82. **Longbottom**, J. L. 1983. Characterization of allergens from the urines of experimental animals. *McMillan Press*, London, pp. 525-529.
- 35 83. **Laperche**, Y., K. R. **Lynch**, K. P. **Dolans**, and P. **Feigelsen**. 1983. Tissue-specific control of alpha 2u globulin gene expression: constitutive synthesis in submaxillary gland. *Cell* 32: 453-460.
- 35 83A. **Bush RK**, **Sanchez H**, **Geisler D**. 1999. Molecular cloning of a major *Alternaria alternata* allergen, rAlt a 2. *J Allergy Clin Immunol* 104: 665-671.
- 40 83B. **Aukrust L**, **Borch SM**. 1979. Partial purification and characterization of two *Cladosporium herbarum* allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 60: 68-79.
- 45 83C. **Sward-Nordmo M**, **Paulsen BS**, **Wold JK**. 1988. The glycoprotein allergen Ag-54 (Cla h II) from *Cladosporium herbarum*. Structural studies of the carbohydrate moiety. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 85: 288-294.
- 45 84. **Shen**, et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103: S157, 1999.
- 50 84A. **Crameri** R. Epidemiology and molecular basis of the involvement of *Aspergillus fumigatus* in allergic diseases. *Contrib. Microbiol.* Vol. 2, Karger, Basel (in press).
- 50 84B. **Shen**, et al. (manuscript submitted), 1999.
- 55 84C. **Shen HD**, **Ling WL**, **Tan MF**, **Wang SR**, **Chou H**, **Han SIH**. Vacuolar serine proteinase: A major allergen of *Aspergillus fumigatus*. 10th International Congress of Immunology, Abstract, 1998.
- 55 85. **Kumar A**, **Reddy LV**, **Sochanik A**, **Kurup VP**. 1993. Isolation and characterization of a recombinant heat shock protein of *Aspergillus fumigatus*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91: 1024-1030.
- 55 85A. **Saxena S**, **Madan T**, **Muralidhar K**, **Sarma PU**. 2003. cDNA cloning, expression and characterization of an allergenic L3 ribosomal protein of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exp Immunol* 134: 86-91.
- 60 85B. **Baur X**, **Melching-Kollmuss S**, **Koops F**, **Strassburger K**, **Zober A**. IgE-mediated allergy to phytase- a new animal feed additive. *Allergy* 57: 943-945, 2002.
- 60 86A. **Shen HD**, **Lin WL**, **Tsai JJ**, **Liaw SF**, **Han SH**. 1996. Allergenic components in three different species of *Penicillium*: crossreactivity among major allergens. *Clin Exp Allergy* 26: 444-451.
- 65 86B. **Shen**, et al. Abstract; The XVIII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Brussels, Belgium, 3-7 July 1999.

ES 2 319 218 T3

87. **Shen HD, Lin WL, Tam MF, Wang SR, Tzean SS, Huang MH, Han SH.** Characterization of allergens from *Penicillium oxalicum* and *P. notatum* by immunoblotting and N-terminal amino acid sequence analysis. *Clin Exp Allergy* 29: 642-651, 1999.
- 5 87A. **Shen HD, Liaw SF, Lin WL, Ro LH, Yang HL, Han SH.** Molecular cloning of cDNA coding for the 68 kDa allergen of *Penicillium notatum* using MoAbs. *Clin Exp Allergy* 25: 350-356, 1995.
- 10 87B. **Shen HD, Wang CW, Lin WL, Lai HY, Tam MF, Chou H, Wang SR, Han SH.** cDNA cloning and immunologic characterization of Pen o 18, the vacuolar serine protease major allergen of *Penicillium oxalicum*. *J Lab Clin Med* 137: 115-124, 2001.
- 15 88. **Woodfolk JA, Wheatley LM, Piyasena RV, Benjamin DC, Platts-Mills TA.** 1998. Trichophyton antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity. Sequence homology to two families of serine proteinases. *J Biol Chem* 273: 29489-96.
- 88A. **Deuell, B., L.K. Arruda, M.L. Hayden, M.D. Chapman and T.A.E. Platts-Mills.** 1991. Trichophyton tonsurans Allergen I. *J. Immunol.* 147: 96-101.
- 20 89. **Shen, H.D., K.B. Choo, H.H. Lee, J.C. Hsieh, and S.H. Han.** 1991. The 40 kd allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Allergy* 21: 675-681.
- 89A. **Horner WE, Reese G, Lehrer SB.** 1995. Identification of the allergen Psi c 2 from the basidiomycete *Psilocybe cubensis* as a fungal cyclophilin. *Int Arch Allergy Immunol* 107: 298-300.
- 25 89B. **Chang CY, Chou H, Tam MF, Tang RB, Lai HY, Shen HD.** Characterization of Enolase Allergen from *Rhodotorula mucilaginosa*. *J Biomed Sci* 9: 645-655, 2002.
90. **Yasueda H, Hashida-Okado T, Saito A, Uchida K, Kuroda M, Onishi Y, Takahashi K, Yamaguchi H, Takesako K, Akiyama K.** Identification and cloning of two novel allergens from the lipophilic yeast, *Malassezia furfur*. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 240-244, 1998. NB: strain TIMM2782 (Teikyo University Institute for Medical Mycology) equal to strain CBS1878 (Central Bureau von Schimmelkulturen).
- 30 90A. **Onishi Y, Kuroda M, Yasueda H, Saito A, Sono-Koyama E, Tunasawa S, Hashida-Okado T, Yagihara T, Uchida K, Yamaguchi H, Akiyama K, Kato I, Takesako K.** Two-dimensional electrophoresis of *Malassezia* allergens for atopic dermatitis and isolation of Mal f 4 homologs with mitochondrial malate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 261: 148-154, 1999. NB: strain TIMM2782 (Teikyo University Institute for Medical Mycology) equal to strain CBS1878 (Central Bureau von Schimmelkulturen).
- 40 91. **Schmidt M, Zargari A, Holt P, Lindblom L, Hellman U, Whitley P, van der Ploeg I, Harfast B, Scheynius A.** The complete cDNA sequence and expression of the first major allergenic protein of *Malassezia furfur*, Mal f 1. *Eur J Biochem* 246: 181-185, 1997. NB: strain ATCC no. 42132 (American Type Culture Collection).
- 45 91A. **Rasool O, Zargari A, Almqvist J, Eshaghi H, Whitley P, Scheynius A.** Cloning, characterization and expression of complete coding sequences of three IgE binding *Malassezia furfur* allergens, Mal f 7, Mal f 8 and Mal f 9. *Eur J Biochem* 267: 4355-4361, 2000. NB: strain ATCC no. 42132 (American Type Culture Collection).
- 91B. NB: strain 4625 (Indian Agricultural Research Institute, PUSA; New Delhi, India).
- 50 92. **Kuchler, K., M. machl, M. J. Sippel, and G. Kreil.** 1989. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honey bee venom glands: The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *Eur. J. Biochem.* 184: 249-254.
93. **Gmachl, M., and G. Kreil.** 1993. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3569-3573.
- 55 93A. **Hoffman DR.** 1977. Allergens in bee venom III. Identification of allergen B as an acid phosphatase. *J Allergy Clin. Immunol.* 59: 364-366.
94. **Habermann, E.** 1972. Bee and wasp venoms. *Science* 177: 314-322.
- 60 95. **Hoffman DR, Jacobson RS.** 1996. Allergens in Hymenoptera venom XXVII: Bumblebee venom allergy and allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97: 812-821.
- 95A. **Hoffman DR, El-Choufani AE, Smith MM, de Groot H.** 2001. Occupational allergy to bumblebee venom: Allergens of *Bombus terrestris*. *J Allergy Clin Immunol In press.*

- 95B. **Helm R, Cockrell G, Stanley JS, Brenner RJ, Burks W, Bannon GA.** 1996. Isolation and characterization of a clone encoding a majore allergen (Bla g Bd90K) involved in IgE mediated cockroach hypersensitivity. *J Allerg Clin Immunol* 98: 172-180.
- 5 95C. **Pomes A, Melen E, Vailes LD, Retief JD, Arruda LK, Chapman MD.** 1998. Novel allergen structures with tandem amino acid repeats derived from German and American cockroach. *J Biol Chem* 273: 30801-30807.
- 10 96. **Arruda LK, Vailes LD, Mann BJ, Shannon J, Fox JW, Vedvick TS, Hayden ML, Chapman MD.** Molecular cloning of a major cockroach (*Blattella germanica*) allergen, Bla g 2. Sequence homology to the aspartic proteases. *J Biol Chem* 270: 19563-19568, 1995.
- 15 97. **Arruda LK, Vailes LD, Hayden ML, Benjamin DC, Chapman MD.** Cloning of cockroach allergen, Bla g 4, identifies ligand binding proteins (or calycins) as a cause of IgE antibody responses. *J Biol Chem* 270: 31196-31201, 1995.
- 20 98. **Arruda LK, Vailes LD, Benjamin DC, Chapman MD.** Molecular cloning of German Cockroach (*Blattella germanica*) allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 107: 295-297, 1995.
- 25 98A. **Wu CH, Wang NM, Lee MF, Kao CYY, Luo SF.** 1998. Cloning of the American cockroach Cr-PII allergens: Evidence for the existence of cross-reactive allergens between species. *J Allergy Clin Immunol* 101: 832-840.
- 98B. **Melen E, Pomés A, Vailes LD, Arruda LK, Chapman MD.** 1999. Molecular cloning of Per a 1 and definition of the cross-reactive Group 1 cockroach allergens. *J Allergy Clin Immunol* 103: 859-64.
- 25 98C. **Wu CH, Lee MF, Liao SC, Luo SF.** Sequencing analysis of cDNA clones encoding the American cockroach Cr-PI allergens. *J Biol Chem* 271: 17937-17943, 1996.
- 98D. **Wu CH, Lee MF, Wang NM, Luo SF.** Sequencing and immunochemical characterization of the American cockroach Per a 3 (Cr-PI) isoallergenic variants. *Molecular Immunol* 34: 1-8, 1997.
- 30 98E. **Santos ABR, Chapman MD, Aalberse RC, Vailes LD, Ferriani VPL, Oliver C, Rizzo MC, Naspitz CK, Arruda LK.** 1999. Cockroach allergens and asthma in Brazil: Identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. *J Allergy Clin Immunol* 104: 329-337.
- 35 98F. **Asturias JA, Gómez-Bayón N, Arilla MC, Martínez A, Palacios R, Sánchez-Gascón, Martínez J.** 1999. Molecular characterization of American cockroach tropomyosin (Periplaneta americana allergen 7), a cross-reactive allergen. *J Immunol* 162: 4342-4348.
99. **Mazur, G., X. Baur, and V. Liebers.** 1990. Hypersensitivity to hemoglobins of the Diptera family Chironomidae: Structural and functional studies of their immunogenic/allergenic sites. *Monog. Allergy* 28: 121-137.
- 40 99A. **Moneo I, Vega JM, Caballero ML, Vega J, Alday E.** Isolation and characterization of Tha p 1, a major allergen from the pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa*. *Allergy* 58: 34-37, 2003.
100. **Soldatova, L., L. Kochoumian, and T.P. King.** 1993. Sequence similarity of a hornet (*D. maculata*) venom allergen phospholipase A1 with mammalian lipases. *FEBS Letters* 320: 145-149.
- 45 101. **Lu, G., L. Kochoumian and T.P. King.** Whiteface hornet venom allergen hyaluronidase: cloning and its sequence similarity with other proteins (abst.). 1994. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93: 224.
102. **Fang, K. S. F., M. Vitale, P. Fehlner, and T. P. King.** 1988. cDNA cloning and primary structure of a white-faced hornet venom allergen, antigen 5. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85: 895-899.
- 50 103. **King, T. P., D. C. Moran, D. F. Wang, L. Kochoumian, and B.T. Chait.** 1990. Structural studies of a hornet venom allergen antigen 5, Dol m V and its sequence similarity with other proteins. *Prot. Seq. Data Anal.* 3: 263-266.
104. **Lu, G., M. Villalba, M.R. Coscia, D.R. Hoffman, and T.P. King.** 1993. Sequence analysis and antigen cross reactivity of a venom allergen antigen 5 from hornets, wasps and yellowjackets. *J. Immunol.* 150: 2823-2830.
- 55 105. **King, T. P. and Lu, G.** 1997. Unpublished data.
- 105A. **King TP, Lu G, Gonzalez M, Qian N and Soldatova L.** 1996. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98: 588-600.
106. **Hoffman, D.R.** 1993. Allergens in hymenoptera venom XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92: 707-716.
- 65 107. **Hoffman DR.** 1992. Unpublished data.

108. **Hoffman DR.** The complete amino acid sequence of a yellowjacket venom phospholipase (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 91: 187, 1993.
- 5 109. **Jacobson RS, Hoffman DR, Kemeny DM.** The cross-reactivity between bee and vespid hyaluronidases has a structural basis (abst). *J. Allergy Clin. Immunol.* 89: 292, 1992.
110. **Hoffman DR.** Allergens in Hymenoptera venom XXIV: The amino acid sequences of imported fire ant venom allergens Sol i II, Sol i III, and Sol i IV. *J. Allergy Clin. Immunol* 91: 71-78, 1993.
- 10 111. **Schmidt M, Walker RB, Hoffman DR, McConnell TJ.** Nucleotide sequence of cDNA encoding the fire ant venom protein Sol i II. *FEBS Letters* 319: 138-140, 1993.
- 111A. **Paddock CD, McKerrow JH, Hansell E, Foreman KW, Hsieh I, Marshall N.** Identification, cloning, and recombinant expression of procalin, a major triatomine allergen. *J Immunol* 167: 2694-2699, 2001.
- 15 112. **Elsayed S, Bennich H.** The primary structure of Allergen M from cod. *Scand J Immunol* 3: 683-686, 1974.
113. **Elsayed S, Aas K, Sletten K, Johansson SGO.** Tryptic cleavage of a homogeneous cod fish allergen and isolation of two active polypeptide fragments. *Immunochemistry* 9: 647-661, 1972.
- 20 114. **Hoffman, D. R.** 1983. Immunochemical identification of the allergens in egg white. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71: 481-486.
- 25 115. **Langeland, T.** 1983. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. IV. specific IgE antibodies to individual allergens in hen's egg white related to clinical and immunolgical parameters in egg-allergic patients. *Allergy* 38: 493-500.
- 30 116. **Daul CB, Slattery M, Morgan JE, Lehrer SB.** 1993. Common crustacea allergens: identification of B cell epitopes with the shrimp specific monoclonal antibodies. In: "Molecular Biology and Immunology of Allergens" (D. Kraft and A. Sehon, eds.). *CRC Press*, Boca Raton. pp. 291-293.
- 116A. **Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, Metcalfe DD, Subba Rao PV.** Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *J. Immunol.* 151: 5354-5363, 1993.
- 35 117. **Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, Chow LP.** Proteomics and Immunological Analysis of a Novel Shrimp Allergen, Pen m 2. *J Immunol* 170: 445-453, 2003.
- 117A. **Miyazawa M, Fukamachi H, Inagaki Y, Reese G, Daul CB, Lehrer SB, Inouye S, Sakaguchi M.** Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 98: 948-953, 1996.
- 40 117B. **Asturias JA, Eraso E, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Inacio F, Martinez A.** Cloning, isolation, and IgE-binding properties of *Helix aspersa* (brown garden snail) tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol* 128: 90-96, 2002.
- 117C. **Lopata AL, Zinn C, Potter PC.** Characteristics of hypersensitivity reactions and identification of a unique 49 kd IgE-binding protein (Hal-m-1) in abalone (*Haliotis midae*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 100: 642-648, 1997.
- 45 117D. **Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, Ahorn H, Ebner C, Laimer Da Camara Machado M, Pühringer H, Scheiner O, Breiteneder H.** Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross-reactivity with Bet v 1 and Api g 1. *Clin. Exp. Allergy* 29: 840-847, 1999.
- 50 118. **Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Menendez-Arias L, Lopez-Oti C, Villalba M, Rodriguez R.** Characterization of a new mustard allergen, Bra j IE. Detection of an allergenic epitope. *Biochem. J.* 293: 625-632 1993.
- 118A. **Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Lopez-Otin C, Fiador A, Fernandez C, Villalba M, Rodriguez R.** 1997. Detection, isolation and complete amino acid sequence of an aeroallergenic protein from rapeseed flour. *Clin Exp Allergy* 27: 833-841.
- 55 119. **Mena, M., R. Sanchez-Monge, L. Gomez, G. Salcedo, and P. Carbonero.** A major barley allergen associated with baker's asthma disease is a glycosylated monomeric inhibitor of insect alpha-amylase: cDNA cloning and chromosomal location of the gene. *Plant Molec. Biol.* 20: 451-458, 1992.
- 60 119A. **Palosuo K, Varjonen E, Kekki OM, Klemola T, Kalkkinen N, Alenius H, Reunala T.** Wheat omega-5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 634-638, 2001.
- 119B. **Xu H, Theerakulpisut P, Goulding N, Suphioglu C, Singh M. B. Bhalla P. L.** Cloning expression and immunological characterization of Ory s 1, the major allergen of rice pollen. *Gene* 164: 255-259, 1995.

- 119C. **Pastorello EA, Ortolani C, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Borga A, Bengtsson A, Incorvaia C, Berti C, Zanussi C.** Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: an *in vivo* and *in vitro* study. *J Allergy Clin Immunol*. 94: 699-707, 1994.
- 5 119D. **Diaz-Perales A, Tabar AI, Sanchez-Monge R, Garcia BE, Gomez B, Barber D, Salcedo G.** Characterization of asparagus allergens: a relevant role of lipid transfer proteins. *J Allergy Clin Immunol* 110: 790-796, 2002.
- 10 119E. **Galleguillos F, Rodriguez JC.** Asthma caused by bromelin inhalation. *Clin Allergy* 8: 21-24, 1978.
- 10 119F. **Baur X.** Studies on the specificity of human IgE-antibodies to the plant proteases papain and bromelain. *Clin Allergy* 9: 451-457, 1979.
- 15 119G. **Gailhofer G, Wilders-Truschnig M, Smolle J, Ludvan M.** Asthma caused by bromelain: an occupational allergy. *Clin Allergy* 18: 445-450, 1988.
- 20 120A. **Gonzalez R, Varela J, Carreira J, Polo F.** Soybean hydrophobic protein and soybean hull allergy. *Lancet* 346: 48-49, 1995.
- 20 120B. **Kleine-Tebbe J, Vogel L, Crowell DN, Haustein UF, Vieths S.** Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J Allergy Clin Immunol* 110: 797-804, 2002.
- 25 120C. **Sanchez-Monge R, Pascual CY, Diaz-Perales A, Fernandez-Crespo J, Martin-Esteban M, Salcedo G.** Isolation and characterization of relevant allergens from boiled lentils. *J Allergy Clin Immunol*. 106: 955-961, 2000.
- 30 121A. **Gavrovic-Jankulovic M, cIrkovic T, Vuckovic O, Atanaskovic-Markovic M, Petersen A, Gojic G, Buzrzer L, Jankov RM.** Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen. *J Allergy Clin Immunol* 110: 805-810, 2002.
- 35 121B. **Moneo I, Caballero ML, Gomez F, Ortega E, Alonso MJ.** Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol*. 106: 177-182, 2000.
- 40 121C. **Asturias JA, Eraso E, Martinez A.** 2000. Is tropomyosin an allergen in *Anisakis*? *Allergy* 55: 898-890.
- 45 122A. **Baur X, Konig G, Bencze K, Fruhmann G.** Clinical symptoms and results of skin test, RAST and bronchial provocation test in thirty-three papain workers: evidence for strong immunogenic potency and clinically relevant "proteolytic effects of airborne papain". *Clin Allergy* 12: 9-17, 1982.
- 50 122B. **Onizuka R, Kamiya H, Muramoto K, Goto R, Inoue K, Kumamoto K, Nakajima Y, Iida S, Ishigami F.** Purification of the major allergen of red soft coral (*Dendronephthya nipponica*). *Int Arch Allergy Immunol* 125: 135-143, 2001.
- 55 123. **Czuppon AB, Chen Z, Rennert S, Engelke T, Meyer HE, Heber M, Baur X.** The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. *J Allergy Clin Immunol* 92: 690-697, 1993.
- 60 124. **Attanayaka DPSTG, Kekwick RGO, Franklin FCH.** 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the rubber elongation factor gene from *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol* 16: 1079-1081.
- 60 125. **Chye ML, Cheung KY.** 1995. J 1,3-glucanase is highly expressed in Laticifers of *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol* 26: 397-402.
- 65 126. **Alenius H, Palosuo T, Kelly K, Kurup V, Reunala T, Makinen-Kiljunen S, Turjanmaa K, Fink J.** 1993. IgE reactivity to 14-kD and 27-kD natural rubber proteins in Latex-allergic children with Spina bifida and other congenital anomalies. *Int Arch Allergy Immunol* 102: 61-66.
- 65 127. **Yeang HY, Cheong KF, Sunderasan E, Hamzah S, Chew NP, Hamid S, Hamilton RG, Cardosa MJ.** 1996. The 14.6 kD (REF, Hev b 1) and 24 kD (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from Spina Bifida patients with Latex allergy. *J Allerg Clin Immunol* *in press*.

128. Sunderasan E, Hamzah S, Hamid S, Ward MA, Yeang HY, Cardosa MJ. 1995. Latex B-serum J-1,3-glucanase (Hev b 2) and a component of the microhelix (Hev b 4) are major Latex allergens. *J nat Rubb Res* 10: 82-99.

5 Con la presente modificación de separación/cabeza a cola se puede obtener una reducción significativa en la actividad alergénica. Dependiendo del procedimiento, esta actividad se puede extinguir en su mayor parte del alérgeno de proteína de tipo salvaje. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la reducción en la actividad alergénica se mide por medio de una reducción de la inhibición de la capacidad de unión a IgE de al menos el 10%, 10 preferiblemente al menos el 20%, en especial al menos el 30%, en comparación con el alérgeno de tipo salvaje. Se muestra un procedimiento preferido en el apartado de ejemplo a continuación.

Una forma alternativa, pero también preferida para definir la reducción en la actividad alergénica usa la medida de unión de IgE. La ausencia de unión de anticuerpos IgE de los sueros de pacientes sensibles a alérgenos, a una 15 transferencia de puntos se considera una indicación de la reducción más significativa. También este procedimiento se muestra en el apartado de ejemplo a continuación.

Los derivados obtenidos de acuerdo con la presente invención se pueden combinar fácilmente con un excipiente farmacéuticamente aceptable y terminar en una preparación farmacéutica.

20 Preferiblemente, los derivados se combinan con un adyuvante de vacuna adecuado y se terminan en una preparación de vacuna farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con una realización preferida, los derivados de acuerdo con la presente invención se combinan con otros alérgenos para proporcionar una vacuna de combinación. Tales alérgenos son preferiblemente alérgenos de tipo 25 salvaje, especialmente una mezcla de alérgenos de tipo salvaje, alérgenos de tipo salvaje recombinantes, derivados de alérgenos de proteínas de tipo salvaje o mezclas de los mismos. Tales mezclas se pueden realizar específicamente para las necesidades (perfil de alérgeno) de un cierto paciente.

30 En una realización preferida, una preparación farmacéutica como tal contiene adicionalmente un extracto de alérgeno.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un derivado de alérgeno de un alérgeno de proteína de tipo salvaje, teniendo dicho alérgeno de proteína de tipo salvaje una secuencia de aminoácidos de 1 a Z, caracterizado por que dicho derivado adyacentemente contiene -en orientación N-terminal o C-terminal- los dos fragmentos de alérgeno de tipo salvaje X a Z y 1 a X, teniendo dichos dos alérgenos de tipo salvaje una actividad alergénica reducida o ausencia de actividad alergénica.

35 Preferiblemente, el derivado de alérgeno de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que X a Z y 1 a X son al menos residuos de 30 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 50 residuos de aminoácidos, en especial al menos 60 residuos de aminoácidos.

Todavía se prefiere más, si X a Z y 1 a X difieren en longitud en el 50% o menos, preferiblemente en el 30% o menos, en especial en el 20% o menos.

40 Los derivados de alérgenos específicamente preferidos de acuerdo con la presente invención se seleccionan de un alérgeno de tipo I, preferiblemente de un alérgeno de la tabla A, más preferido del polen de la festuca roja (*Phelum pratense*), en especial Ph1 p 12, polen del abedul (*Betula verrucosa*), en especial Bet v 2 y Bet v 4, veneno contra la chaqueta amarilla (*Vespa vulgaris*), veneno contra la avispa de papel (*Polistes annularis*), polen de la Parietaria judaica, polen del césped de centeno, alérgenos de los ácaros del polvo, en especial Der p 2, etc.

45 Preferiblemente, los derivados de acuerdo con la presente invención se proporcionan en forma de una composición de alérgeno en la que no sólo está presente un alérgeno, si no dos o más. Los presentes derivados también se pueden mezclar con extractos de alérgeno que están complementados por los derivados de la presente invención para sustituir la ausencia de cantidades suficientes de alérgenos específicos en los extractos naturales. Las mezclas de alérgenos se necesitan específicamente en pacientes que tienen reacciones alergénicas a no solamente un alérgeno. Por lo tanto, 50 se prefiere proporcionar los presentes derivados en forma de combinación con alérgenos adicionales (otros) para proporcionar una vacuna de combinación.

Por lo tanto, los derivados de alérgenos de acuerdo con la presente invención se pueden combinar preferiblemente 55 con alérgenos de tipo salvaje para proporcionar una composición de alérgenos, en especial una mezcla de alérgenos de tipo salvaje, alérgenos de tipo salvaje recombinantes, derivados de alérgenos de proteínas de tipo salvaje o mezclas de los mismos (cada uno del mismo y/o diferente alérgeno y/o isoformas o mutantes de los mismos, siempre que se proporcione una reducción total de la actividad alergénica, en comparación con el alérgeno recombinante o proteína de tipo salvaje en la preparación en su totalidad).

60 Preferiblemente, la presente preparación contiene adicionalmente un extracto de alérgeno.

ES 2 319 218 T3

El alérgeno o composición de alérgeno de acuerdo con la presente invención preferiblemente contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un derivado de alérgeno de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento de immunoterapia específico de alérgeno.

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un derivado de alérgeno o una composición de alérgenos de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento para la inmunización pasiva.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un derivado de alérgeno o una composición de alérgenos de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento para la inmunización profiláctica.

Los derivados y composiciones de alérgenos de acuerdo con la presente invención se pueden usar para la inmunización profiláctica de individuos que lleva a una prevención eficaz de la alergia. Como los derivados y composiciones de alérgenos de acuerdo con la presente invención, como los derivados del alérgeno Der p 2, muestran una respuesta inmune alérgica reducida en comparación con el alérgeno de tipo salvaje, no llevan a efectos secundarios no deseados. De manera ventajosa, un medicamento como tal se puede administrar a niños de la edad de 1 a 3 años. Una vacunación como tal antes de que dicho niño se ponga en contacto con alérgenos previene la formación de anticuerpos de IgE específicos de alérgenos en dicho niño.

Preferiblemente, el medicamento contiene adicionalmente otros ingredientes adecuados, tales como adyuvantes, diluyentes, conservantes, etc.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención el medicamento comprende de 10 ng a 1 g, preferiblemente de 100 ng a 10 mg, en especial de 0,5 µg a 200 µg de dicho derivado de alérgeno recombinante por dosis de aplicación. Las formas preferidas de administración incluyen todas las pautas de administración convencionales descritas y sugeridas para la vacunación en general e immunoterapia de alergia específicamente (por vía oral, transdérmica, intravenosa, intranasal, mucosa, etc). La presente invención incluye un procedimiento para tratar y prevenir la alergia por medio de la administración de una cantidad eficaz de las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un derivado de alérgeno de acuerdo con la presente invención que se caracteriza por las siguientes etapas:

- proporcionar una molécula de ADN que codifica un derivado de alérgeno de acuerdo con la presente invención,
- transformar una célula hospedadora con dicha molécula de ADN y
- expresar dicho derivado en dicha célula hospedadora y aislar dicho derivado.

Preferiblemente, dicho huésped es un huésped con elevada capacidad de expresión.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, un “huésped con capacidad de expresión elevada” es un huésped que expresa una proteína de interés en una cantidad de al menos 10 mg/l de cultivo, preferiblemente de al menos 15 mg/l, más preferiblemente de al menos 20 mg/l. Por supuesto, la capacidad de expresión depende también del huésped seleccionado y el sistema de expresión (por ejemplo, vector). Los huéspedes preferidos de acuerdo con la presente invención son *E. coli*, *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis*, células vegetales por ejemplo, derivadas del tabaco), etc.

Por supuesto, los derivados de alérgenos de acuerdo con la presente invención también se pueden producir por medio de cualquier otro procedimiento adecuado, en especial síntesis química o síntesis semi-química.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un derivado de profilina que se puede obtener a partir de una primera molécula de profilina de tipo salvaje por medio de un procedimiento de acuerdo con la presente invención o un derivado de alérgeno de una primera molécula de profilina de tipo salvaje de acuerdo con la presente invención para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades alérgicas causadas por una segunda molécula de profilina de tipo salvaje.

Resultó sorprendente que los anticuerpos inducidos por y dirigidos a derivados de profilina de una primera molécula de profilina de tipo salvaje de acuerdo con la presente invención también se unen a otras moléculas de profilina de tipo salvaje. Por lo tanto, dichos derivados se pueden emplear para el tratamiento o prevención de una serie de enfermedades alérgicas. Tales derivados de profilina se pueden usar en forma de vacunas de amplio espectro que permiten inmunizar individuos con solamente una o dos moléculas inmunogénicas. La profilina representa un alérgeno que está expresado en todas las células eucarióticas y representa así un pan-alérgeno que puede inducir alergias inhalativas (por ejemplo, rinoconjuntivitis, asma) así como síndromes de alergia oral después de la ingestión oral (prurito e hinchazón de labios y la lengua) en pacientes sensibles.

Por ejemplo, el derivado Phl p 12 intercambiado, MP12, induce anticuerpos de IgG después de la inmunización que reconocen profilinas a partir de tanto pólennos como de alimentos derivados de plantas. Los anticuerpos inducidos por

ES 2 319 218 T3

MP 12 inhiben IgE del suero de pacientes que se une a profilinas a partir de pólenes y también a profilinas derivadas de alimentos derivados de plantas. Así pues, el MP 12 así como otras moléculas de profilinas intercambiadas son adecuadas para el tratamiento de sensibilización cruzada de polen-alimento atribuible a la alergia a las profilinas.

5 De acuerdo con una realización preferida, dichas primeras y dichas segundas moléculas de profilinas se seleccionan del grupo que está constituido por Phl p 12, Bet v 2, Art v 4, Ana c, Api g 4, Mus xp 1, Cor a 2, y Dau c 4.

10 En especial, estos alérgenos son adecuados para usarse de acuerdo con la presente invención gracias a sus similitudes estructurales. Sin embargo, es obvio que también se pueden usar, por consiguiente, otros alérgenos que comparten similitudes estructurales unas entre otras.

Dicha primera molécula de profilina es preferiblemente Phl p 12 y dicha segunda molécula de profilina se selecciona preferiblemente del grupo que está constituido por Bet v 2, Art v 4, Ana c, Api g 4, Mus xp 1, Cor a 2, y Dau c 4.

15 Los experimentos revelaron que especialmente los derivados de Phl p 12 se pueden usar en forma de vacunas de amplio espectro. Un derivado particular preferido está constituido por una proteína de fusión, en la que los aminoácidos 1 a 77 del Phl p 12 de tipo salvaje se condensan en el extremo N-terminal a los aminoácidos 78 a 131 (véase Fig. 1).

20 Los derivados de profilina Bet v 2, Art v 4, Ana c, Api g 4, Mus xp 1, Cor a 2, y Dau c 4 como se desvela en la presente memoria descriptiva y que se pueden obtener por medio de un procedimiento de acuerdo con la presente invención se usan preferiblemente para el tratamiento y/o prevención de sensibilización al polen-alimento atribuible a la alergia a la profilina.

25 La presente invención se describe adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos y las figuras de dibujos, todavía sin estar restringida a los mismos.

La Figura 1 muestra una representación esquemática de la estructura primaria de MP 12 (un alérgeno Phl p 12 intercambiado de acuerdo con la presente invención) en comparación con Phl p 12 de tipo salvaje;

30 La Figura 2 muestra espectros CD de Phl p 12 de tipo salvaje y MP12. La elipticidad por residuo medio $[\theta]$ (eje y) de Phl p 12 y el derivado MP12 se muestra para un intervalo de longitudes de onda (eje x);

35 La Figura 3 muestra tinción con Coomassie de un SDS PAGE al 14% cargado con fracciones de MP12 recombinante que se expuso a una columna de poliprolina. La banda M representa el marcador de peso molecular, la banda 1 representa la fracción de flujo, las bandas 2-4 las fracciones de lavado, las bandas 5-6 las fracciones de elución. Los pesos moleculares (kDa) se indican en el margen izquierdo;

40 La Figura 4 muestra la reactividad a IgE de Phl p 12 y MP12 punteados en nitrocelulosa. Las proteínas punteadas, así como la albúmina de suero humano (HSA) a efectos de control negativo, se expusieron a sueros de 24 pacientes alérgicos a Phl p 12 (bandas 1-24). La banda N representa suero de un individuo de control no alérgico. Los anticuerpos unidos a IgE se detectaron con anticuerpos de anti-IgE humanos;

45 La Figura 5 muestra la inducción de la liberación de histamina por basófilos en dos pacientes alérgicos a Phl p 12. Los granulocitos de pacientes se incubaron con varias concentraciones (eje x) de Phl p 12 (cuadrados) y MP12 (círculos). El porcentaje de histamina total liberada en el sobrenadante se expone en el eje y;

50 La Figura 6 muestra la reactividad de antisueros de conejo con profilinas de polen de festuca roja, abedul y altamisa. Los antisueros de conejo activados contra Phl p 12 (rombos) y MP12 (cuadrados) se analizaron para detectar la reactividad a Phl p 12 (A), Bet v 2 (B), y profilina de altamisa (C) por medio de ELISA. Las diluciones de sueros se muestran en el eje x, los valores OD correspondientes en el eje y. Los sueros preinmunes correspondientes no exponen ninguna reactividad;

55 La Figura 7 muestra la inhibición de la desgranulación de basófilos inducidos por rPhl p 12 por medio de anti-rPhl p 12 (P12) y anti IgG inducido por MP12. Los basófilos de rata se han cargado con IgE de ratón específico de Phl p 12;

La Figura 8 muestra una representación esquemática de la estructura primaria y generación de Der p 2 Híbrido (un alérgeno Der p 2 intercambiado de acuerdo con la presente invención) en comparación con Der p 2 de tipo salvaje;

60 La Figura 9 muestra un SDS PAGE tintado con Coomassie que contiene extractos de proteínas de BL21 (DE3) que expresa rDer p 2 y derivados de rDer p 2 en forma de proteínas marcadas his (bandas 1), rDer p 2 purificado, fragmentos de rDer p 2 y rDer p 2 híbrido (bandas 2) y un marcador molecular (bandas M).

65 La Figura 10 muestra un análisis espectroscópico de masas de rDer p 2 purificado y derivados de rDer p 2. Los ejes x muestran las relaciones masa/carga y las intensidades de señal se exponen en los ejes y como porcentajes de las señales más intensas.

ES 2 319 218 T3

La Figura 11 muestra espectros CD ultravioleta lejano de Der p 2 purificado recombinante, fragmentos de rDer p 2 y rDer p 2 híbrido. Los espectros de las proteínas se expresan como elipticidades por residuo medio (eje y) a longitudes de onda proporcionadas (eje x).

5 La Figura 12 muestra el reconocimiento por IgE de Der p 2 recombinante y derivados de Der p 2 recombinante. Se analizaron los sueros de 17 individuos alérgicos a los ácaros (bandas 1-17), un individuo no alérgico (banda 18) y tampón sin suero (banda 19), para detectar la reactividad a IgE con Der p 2 recombinante transferido por puntos, fragmentos de rDer p 2, rDer p 2 híbrido y BSA. Se detectó IgE unido con anticuerpos anti IgE humano marcado 125I y se visualizaron por autorradiografía.

10 10 La Figura 13 muestra la activación de basófilos por medio de Der p 2 recombinante y derivados de rDer p 2 como se mide por expresión de CD203c. Las muestras de sangre de 10 pacientes alérgicos a ácaros se expusieron a 10 µg/ml de rDer p 2 recombinante, cada uno de los fragmentos de Der p 2, una mezcla de los fragmentos, αIgE o tampón. Se muestran los resultados de tres pacientes representativos. La expresión de CD203c se determinó por análisis FACS y se expone como Índice medio de fluorescencia (abreviadamente en inglés MFI).

15 20 La Figura 14 muestra la activación de basófilos por medio de Der p 2 recombinante y derivados de rDer p 2 como se mide por expresión de CD203c. Las muestras de sangre de 10 pacientes alérgicos a ácaros se expusieron a diversas conversaciones de rDer p 2 recombinante y rDer p 2 híbrido, algE o tampón (eje x). Se muestran los resultados de seis pacientes representativos. La expresión de CD203c se determinó por análisis FACS y se expone como Índice de estimulación (abreviadamente en inglés SI).

25 25 La Figura 15 muestra la evolución de IgG₁ específico de Der p 2 inducido por inmunización de ratones con rDer p 2 y derivados de rDer p 2. Se inmunizaron grupos de cinco ratones cada uno con rDer p 2 purificado o derivados de rDer p 2 y se determinaron los anticuerpos de IgG₁ inducidos por medio de ELISA. Los valores de densidad óptica (OD 405 nm) expuestos en el eje y corresponden al nivel de anticuerpos de IgG₁ en el suero de ratón. Los resultados se muestran en forma de gráficos por casillas en los que el 50% de los valores están dentro de las casillas y los valores no extremos entre las barras. Las líneas dentro de las casillas indican los valores medianos. Los círculos blancos y estrellas indican los valores extremos y extremos de cada grupo de ratones.

30 35 La Figura 16 muestra la baja actividad alergénica *in vivo* de derivados de rDer p 2 visualizados por medio de la liberación de β-hexosaminidasa de células RBL. Se cargaron células con leucemia basófila de rata (abreviadamente en inglés RBL) con suero de rata obtenido antes (Preinmunsuero) y después (inmunsuero) de la inmunización con alérgeno rDer p 2 de tipo salvaje y derivados de rDer p 2. La liberación de β-hexosaminidasa se indujo con rDer p 2 y se expone como el porcentaje de liberación total de β-hexosaminidasa (valores medios ±SD para los cinco sueros de cada grupo de ratones) (eje y).

40 40 La Figura 17 muestra la reactividad de antisuero de conejo con profilinas de polen de festuca roja (Phl p 12), polen de abedul (Bet v 2), polen de altamisa (Art v 4), anacardo (Ana c), apio (Api g 4), plátano (Mus xp 1), avellana (Cor a 2), y zanahoria (Dau c 4). El antisuero de conejo activado contra Phl p 12 (rombos) y MP12 (cuadrados) se analizó para detectar la reactividad a dichas profilinas por medio de ELISA. Las diluciones de suero se muestran en el eje x, los valores OD correspondiente en el eje y. Los sueros preinmunes correspondientes no mostraron ninguna reactividad.

Ejemplos

45 En los ejemplos 1 a 5 se ilustran los principios de la presente invención por medio de un alérgeno de profilina, la profilina del polen de la festuca roja Phl p 12. Los ejemplos 6 a 11 se refieren al alérgeno principal del ácaro (*Dermatophagoides pteronyssinus*), Der p 2. Los ejemplos 12 y 13 muestran la reactividad cruzada de Phl p 12 con las profilinas de otras fuentes distintas al polen de la festuca roja, demostrando en consecuencia la adecuación para usar derivados de Phl p 12 en forma de vacunas para enfermedades alérgicas causadas por otras profilinas.

Ejemplo 1

55 55 Caracterización de un derivado hipoalergénico de la profilina del polen de festuca roja

a) Generación, expresión y purificación de una variante hipoalergénica de la profilina del polen de festuca roja, Phl p 12.

60 65 La técnica de solapamiento por PCR se usó para modificar por ingeniería genética un derivado de Phl p 12 intercambiado. La plantilla de PCR era el ADNc que codifica la profilina del polen de festuca roja, Phl p 12, subclonada en el vector de expresión pet17b. Los siguientes cebadores se usaron para generar dos fragmentos por PCR que contienen las secuencias de solapamiento así como los sitios de restricción NdeI y EcoRI y una secuencia que codifica un residuo 6 x Histidina C-terminal para la purificación de la proteína. Para el fragmento 1 se usaron el cebador MDE-1: 5'CATATGAGGCCGGCGCGTCATC3' y el cebador MDE-2: 5'GTACGTCTGCCACGCCATCATGCCTGTT CAAC3', para el fragmento 2, se usaron el cebador MABC-1: 5'GTTGAACAAGGCATGATGTCGTG-GCAGACG3' y el cebador MABC-2: 5'GAATTCTTAATGGTGATGGTATGGTACCCT-GGATGACCATGTA3'. En la siguiente etapa, ambos productos de PCR obtenidos como se describe se usaron como plantillas para la reacción de PCR por

ES 2 319 218 T3

solapamiento usando el cebador MDE-1 y MABC-2 para general el ADN que codifica el derivado Phl p 12 (es decir, MP12) (esquemáticamente representado en la Figura 1). El ADN que codifica MP-12 se clonó en el sistema de vector pBluscript (Stratagene) y la secuencia de ADN se confirmó por secuenciación de doble hebra (MWG Biotech, Alemania).

5 Para la purificación de la proteína, el ADNc que codifica MP-12 tenía que subclonarse en un sistema de vector de expresión pet117b usando las enzimas de restricción NdeI y EcoRI y la secuencia de ADN se volvió a confirmar por secuenciación de doble hebra (MWG Biotech).

10 Para la purificación de la proteína, MP-12 se expresó en *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Stratagene, East Kew, Australia) en cultivo líquido. Se cultivó *E. Coli* a una OD₆₀₀ de 0,4 en medio LB que contiene 100 mg/de ampicilina. Se indujo la expresión de las proteínas recombinantes por medio de la adición de isopropil-b-D-galactosidasa hasta una concentración final de 1 mM y el cultivo adicional durante 4 horas adicionales a 37°C. Se recogieron las células de *E. coli* de un cultivo de 500 ml por centrifugación, se volvieron a suspender en tampón A (NaH₂PO₄ 100 15 mM, Tris 10 mM, Urea 8M, pH 7,5). Después de la centrifugación a 20.000 rpm, 30 min., el sobrenadante se transfirió a una columna de agarosa Ni-NTA (Quiagen, Hilden, Alemania) y la elución de la proteína MP-12 marcada 6 x His se realizó usando el tampón A con valores de pH decrecientes. La proteína eluyó a un pH de 4,9 y se volvió a plegar posteriormente por diálsis etapa a etapa contra tampón A, pH 7,5, que contiene Urea 6-0 M. La etapa final de la diálsis se realizó contra solución salina tamponada con fosfato (PBS), en la que MP12 era soluble como se muestra 20 por medio de los experimentos de centrifugación.

La pureza de la proteína se confirmó por medio de SDS PAGE y se realizó la cuantificación usando un kit Micro BCA (Pierce, EE.UU.).

25 b) Análisis de estructura secundaria

Las medidas del dicroismo circular (abreviadamente en inglés CD) se llevaron a cabo en un espectropolarímetro Jasco J-715 usando una célula con longitud de recorrido de 0,1 cm equilibrada a 20°C. Los espectros se registraron 30 con una resolución de 0,5 nm a una velocidad de exploración de 100 nm/min y resultaron de la determinación del promedio de 3 exploraciones. Se corrigió la línea basal de los espectros finales por medio de la sustracción de los espectros MilliQ obtenidos bajo condiciones idénticas. Los resultados se equiparon con el programa de estimación de la estructura secundaria J-700.

35 Los resultados indican una cantidad considerable de estructura secundaria del derivado. El espectro de Phl p 12 está caracterizado con un mínimo a 218 nm y un máximo marcado por debajo de 200 nm, mientras que el mínimo del derivado se desplaza una longitud de onda más pequeña y el cruce de cero de la curva es inferior está por debajo de 200 nm (Fig. 2). Estos resultados son indicativos de una porción en aumento de una estructura secundaria en espiral aleatoria dentro del derivado.

40 c) Derivado de Phl p 12 hipoalergénico carece de afinidad para la poliprolina

45 La afinidad a la poliprolina es una característica común a las profilinas de varios organismos. Se ha demostrado que el derivado de Phl p 12 hipoalergénico, MP12, no se une a la poliprolina y exhibe así propiedades bioquímicas alteradas.

Aproximadamente 5 µg de MP12 recombinante purificado en PBS se sometió a una columna de agarosa activada 50 con CbBr cargada con poliprolina (Amersham Bioscience, Üppsala, Suecia) equilibrada con PBS. Después de recoger el flujo, la columna se lavó con 3 volúmenes (PBS) y la elución se realizó con PBS 5 x 1 ml que contiene Urea 2 M ó 6 M, respectivamente. Aliquotas de diez µl del flujo, las fracciones de lavado y las fracciones de elución se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS PAGE) al 14% y las proteínas se visualizaron por medio de tinción Coomassie (Fig. 3). Los resultados indican una pérdida del sitio de unión a la poliprolina debido a la reorganización de la estructura primaria de Phl p 12.

55 Ejemplo 2

Reducción de la capacidad de unión a IgE de MP12

60 a) MP12 muestra capacidad de unión a IgE sumamente reducida

La capacidad de unión a IgE de MP12 recombinante se comparó a la de Phl p 12 recombinante de tipo salvaje por medio de análisis de transferencia de puntos usando sueros de 24 pacientes sensibles a profilina (Fig. 4). Phl p 12 y MP12 así como albúmina de suero humano (HSA) a efectos de control se puntearon sobre nitrocelulosa y se sondearon 65 con sueros de 24 pacientes sensibles a profilina. Se detectaron los anticuerpos unidos a IgE usando anticuerpos anti-IgE humanos marcados ¹²⁵I. Todos los pacientes mostraron reactividad a IgE con Phl p 12 de tipo salvaje, mientras que ninguno de los 24 pacientes reaccionaron con MP12 o con la proteína de control HSA (Fig. 4).

ES 2 319 218 T3

Para cuantificar la reducción de la capacidad de unión a IgE de MP12, se realizaron inhibiciones de fase fluida. Para este fin se preincubó el suero de seis pacientes sensibles a profilina con bien 10 µg de Phl p 12 bien de MP12 y subsiguientemente se incubó con Phl p 12 unido a placas de ELISA (5 µg/ml). Los anticuerpos unidos a IgE se detectaron con un anticuerpo anti-IgE humano marcado con fosfatasa alcalina (Pharmingen). La inhibición de la unión a IgE se calculó con la siguiente fórmula: % de inhibición = 100 x [(A - B) / A]; A representando los valores OD obtenidos después de la incubación de suero con BSA, B representando los valores OD después de la incubación de suero con Phl p 12 o MP12, respectivamente.

La capacidad de MP12 para inhibir la unión de IgE a Phl p 12 se muestra como el porcentaje de inhibición en la Tabla 2, que varía entre el 20% y el 40% con inhibición media del 31,2% para MP12, mientras que la inhibición conseguida con Phl p 12 variaba entre el 76% y el 91% (media del 86%).

TABLA 2

15 *Inhibición de anticuerpo que se une a Phl 12 inmovilizado usando Phl p 12 y MP12. La unión del anticuerpo IgE se inhibió por medio de la preincubación de los sueros de 6 pacientes sensibles a profilina con Phl p 12 de tipo salvaje o MP12. La inhibición media de unión del anticuerpo se calculó y se expuso*

20	Nombre proteína	Secuencia de aminoácidos	Númer o de amino- ácidos	Pi calcu-lado	PM (kDa)	Integridad estructural
25	Phl p 12	<code>MSWQTYVDEHLMCEIEGHHLASAAILGHDGTWVAQS ADFPQFKPEEITGIMKDFDEPGHLAPTMVAGAKYM VIQCEPGAVIRGKKKGAGGGITIKKTGQALVVGIVYDEPM TPGQCNIAVVERLGDYLVEQGM</code>	131	4,92	14,1	+
30	MP12	<code>MEPGAVIRGKKKGAGGGITIKKTGQALVVGIVYDEPMTPGQ CNMVERLGDYLVEQGMMSWQTYVDEHLMCEIEGH HLASAAILGHDGTWVAQSADFPQFKPEEITGIMKDFD EPGHLAPTMVAGAKYIVIQGHHHHHH</code>	137	5,68	15	+

b) MP12 muestra actividad alergénica reducida

Después, el Phl p 12 intercambiado se comparó con Phl p 12 de tipo salvaje para detectar su capacidad para inducir la liberación de histamina de basófilos de pacientes alérgicos a profilina.

40 Los granulocitos se aislaron de las muestras de sangre heparinizadas de pacientes alérgicos al polen de festuca roja por medio de sedimentación en Dextrano. Después del aislamiento, las células se incubaron con varias concentraciones de Phl p 12, MP12 o, a efectos de control, con un anticuerpo anti-IgE humano monoclonal (Immunotech, Marsella, Francia). La histamina liberada en el sobrenadante se midió por medio de radioinmunoensayo (Immunotech). La histamina total se determinó después de la congelación/descongelación de las células. Los resultados se expresan como valores medios de determinaciones duplicadas, y representan el porcentaje de la histamina total.

45 Como se ilustra en la Fig. 5, Phl p 12 indujo la liberación de histamina enérgica y dependiente de dosis en basófilos de ambos pacientes, proporcionando una liberación de histamina máxima en concentraciones entre 10^{-5} - 10^{-4} µg/ml, mientras que no se observó liberación de histamina con MP12 en concentraciones de hasta 10^{-2} µg/ml indicando una reducción de más de 1000 veces de actividad alergénica. Además, la liberación de histamina máxima de basófilos después de la adición de MP12 era considerablemente inferior a la conseguida con Phl p 12 de tipo salvaje.

55 Ejemplo 3

La inmunización con MP12 induce a los anticuerpos de IgG que reconocen Phl p 12 de tipo salvaje así como las profilinas de otros pólenes

60 Con el fin de analizar, si la inmunización con Phl p 12 intercambiado induce anticuerpos de IgG que reaccionan con Phl p 12 de tipo salvaje y profilinas de otros pólenes, se inmunizaron conejos tres veces con Phl p 12 o Mp12 usando adyuvantes completos e incompletos de Freund (200 µg/inyección) (Charles River, Kisslegg, Alemania). Las muestras de suero se obtuvieron en intervalos de cuatro semanas. Los sueros se almacenaron a -20°C hasta análisis.

65 La reactividad de los anticuerpos de IgE inducidos por Phl p 12 y MP12 se estudió por medio de ELISA (Fig. 6). Se cubrieron Phl p 12 así como las profilinas de abedul (Bet v 2) y artemisa sobre placas ELISA (5 µg/ml) y se incubaron con diluciones en serie de antisueros de conejo (1:200-1: 64000). Se detectaron los anticuerpos de conejo unidos con un antisuero de burro anti-conejo marcado con peroxidasa diluida 1:1000 (Amersham Pharmacia Biotech).

ES 2 319 218 T3

MP12 indujo una respuesta de anticuerpo anti-Phl p 12 de IgG, que se podía comparar a la inducida con Phl p 12 de tipo salvaje (Fig. 6A). Además, ambos, los anticuerpos de IgG inducidos por Phl p 12 y MP12, reaccionaron de forma cruzada con profilinas de abedul y artemisa (Fig. 6B, C).

5 Ejemplo 4

Los anticuerpos anti-MP12 inhiben la unión de IgE de suero de pacientes alérgicos al polen del césped a Phl p 12 en su totalidad

10 La capacidad de IgG de conejo inducido por MP12 para inhibir la unión de IgE de pacientes alérgicos a Phl p 12 se investigó por medio de un ensayo de competición ELISA. Las placas ELISA (Nunc Maxisorp, Roskilde, Dinamarca) se cubrieron con Phl p 12 (1 µg/ml) y se preincubaron bien con una dilución 1:250 de cada uno de los antisueros anti-
15 MP12 o bien el antisuero Phl p 12 y, a efectos de control, con los sueros preinmunes correspondientes. Después de lavar, las placas de incubaron con suero diluido 1:3 de siete pacientes alérgicos al polen de césped sensibles a Phl p 12 y se detectaron los anticuerpos IgE unidos con un anticuerpo de rata anti-IgE humano monoclonal (Phamingen, San
20 Diego, CA), diluido 1:1000, seguido de un antisuero de oveja anti-rata Ig unido a HRP diluido 1:2000 (Amersham). El porcentaje de inhibición de la unión de IgE conseguido por medio de la preincubación con el antisuero del anti-peptido o anti-mutante se calculó como sigue: % de inhibición de la unión de IgE = $100 - \frac{OD_1}{OD_p} \times 100$. OD₁ y OD_p representan las extinciones después de la preincubación con los sueros inmunes de conejos y los sueros preinmunes correspondientes, respectivamente. Como se muestra en la Tabla 3, la inhibición de la unión de IgE de pacientes a Phl p 12 conseguida con anticuerpos anti-Phl p 12 estaba entre el 30,2% y el 66,7% (inhibición media al 49,8%). Asimismo, se observó una considerable reducción de la reactividad de IgE anti Phl p 12, que varía entre el 10,8% y el 27,6% (inhibición media al 20,8%) con anticuerpos activados contra MP12 (Tabla 3).

25

TABLA 3

Inhibición de la unión de IgE de pacientes alérgicos a rPhl p 12 por medio de anticuerpos de conejos. El porcentaje de inhibición de la unión de IgE a rPhl p 12 se consiguió por medio de la preincubación con antisuero de conejo (anti-MP12, anti-Phl p 12 de conejo) para siete pacientes alérgicos a Phl p 12 y se expone la inhibición media calculada

Paciente	% inhibición	
	Anti-Phl p 12	anti-MP12
1	66,7	27,6
2	53,8	18,8
3	46,0	16,2
4	43,2	18,9
5	45,7	27,0
6	30,2	10,8
7	63,0	26,1
media	49,8	20,8

Ejemplo 5

55 *El antisuero anti-MP12 inhibe la desgranulación de basófilos. La relevancia biológica y la actividad protectora posible de los anticuerpos de IgG inducidos por péptidos se investigó en un sistema de modelo celular definido usando células con leucemia basófila de rata (RBL) que se cargaron con IgE específico de alérgenos*

60 Las células RBL-2H3 se sembraron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos (4×10^4 células/pocillo), se incubaron durante 24 horas a 37°C usando CO₂ al 7%. La sensibilización pasiva se llevó a cabo con el suero de ratón que contiene IgE reactivo con profilina a una dilución final de 1:30 durante 2 horas. Los anticuerpos no unidos se eliminaron por medio del lavado de la fase celular dos veces en tampón de Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, NaH₂PO₄ 0,4 mM, D-glucosa 5,6 mM, NaHCO₃ 12 mM, HEPES 10 mM y BSA al 0,1% p/v, pH 7,2). Las células RBL, precargadas con IgE de ratón específico de Phl p 12, se expusieron a rPhl p 65 12 (0,005 µg/ml). Phl p 12 se preincubó en tampón de Tyrode con el 0%, 2%, 5%, 7,5% ó 10% v/v de antisuero de conejo de un conejo inmunizado con Phl p 12, un conejo inmunizado con MP12 o el suero preinmune correspondiente durante 2 horas a 37°C.

ES 2 319 218 T3

Se añadió Phl p 12 preincubado a las células RBL durante 30 minutos en una atmósfera humidificada a 37°C y sus sobrenadantes se analizaron para detectar la actividad de β -hexosaminidasa por medio de la incubación con 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosamida 80 μ M (Sigma-Aldrich, Viena, Austria) en tampón citrato (0,1M, pH 4,5) durante 1 h a 37°C. Se detuvo la reacción por medio de la adición de tampón glicina 100 μ l (glicina 0,2M, NaCl 0,2M, pH 10,7) y se midió la fluorescencia a λ_{ex} : 360/ λ_{em} : 465 nm usando un lector de microplacas de fluorescencia (Spectrafluor, Tecan, Austria). Los resultados se reseñan como unidades de fluorescencia y porcentaje de β -hexosaminidasa total liberada después de lisis de células con Triton X-100 al 1%.

Como se ilustra en la Fig. 7, ambos, la preincubación de Phl p 12 con concentraciones en aumento (2%-10% v/v) de anticuerpos anti-MP12 de conejo y con anticuerpos anti-Phl p 12 de conejo llevó a una inhibición dependiente de dosis de la liberación del mediador inducida por rPhl p 12 de RBL que se habían precargado con IgE de ratón específico de Phl p 12. No se observó una desgranulación de basófilos cuando el alérgeno se preincubó con las mismas concentraciones de Ig preinmune.

15 Ejemplo 6

Expresión, purificación y caracterización de un derivado hipoalergénico del alérgeno Dermatophagoides pteronyssinus Der p 2 (Der p 2 Híbrido)

La alergia a los ácaros del polvo doméstico (HDM) pertenece a la alergia más común de todo el mundo que afecta a más del 50% de todos los pacientes alérgicos. *Dermatophagoides pteronyssinus* se identificó como la fuente más importante de alérgenos en el polvo doméstico en Europa.

Se han caracterizado veinte grupos de alérgenos de ácaros hasta el momento, y los alérgenos del grupo 2 se han identificado como los alérgenos de ácaros principales, contra los que se sensibilizan más del 80% de los pacientes alérgicos a los ácaros y principalmente se localizan en las heces de los ácaros. Los alérgenos del grupo 2 se caracterizaron primero como alérgenos de 14.000-18.000 Da con una actividad de unión a IgE elevada. El aislamiento y análisis de clones de ADNc que codifican Der p 2 revelaron después que Der p 2 comprende un alérgeno con residuos de 129 aminoácidos, un peso molecular de 14.000 Da y sin sitios N-glicosilación. Los alérgenos del grupo 2 contienen tres enlaces disulfuros y están constituidos por dos hojas β anti-paralelas. Los epitopes de células T de Der p 2 se localizan en todas las regiones de la proteína y los epitopes de IgE resultaron ser conformacionales.

Los estudios de inmunoterapia con extractos de ácaros brutos han demostrado que los efectos secundarios sistémicos peligrosos pueden tener lugar durante la inmunoterapia con extractos de HDM (Akcakaya, N., y col. (2000) Ann Allergy Asthma Immunol 85: 317) así como la inducción de nuevas reactividades de IgE a mariscos (van Ree, R., y col. (1996) Allergy 51: 108).

Para superar las desventajas de la inmunoterapia basada en extractos, se han aplicado diversas estrategias para desarrollar derivados de alérgenos hipoalergénicos. En el caso de Der p 2, las variantes se desarrollaron con reactividad de IgE reducida destruyendo enlaces disulfuros por mutagénesis dirigida al sitio, destrozando los enlaces disulfuros a través de una delección N- y C-terminal, o introduciendo mutaciones. Sin embargo, su actividad biológica es cuestionable.

En los siguientes ejemplos se produjeron dos fragmentos recombinantes del alérgeno del grupo 2 de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 2) que comprenden aa 1-53 y aa 54-129, para destruir epitopes de células B conformacionales y para retener los epitopes de células T principales. De forma adicional, se construyó una molécula de Der p 2 híbrido recombinante (aa 54-129 + 1-53), en la que los dos fragmentos r Der p 2 se recombinaron en orden inverso por “splicing” por solapamiento de la extensión de genes basado en PCR.

Se construyeron dos fragmentos recombinantes de Der p 2 que comprenden los aminoácidos (aa) 1-53 y aa 54-129 por amplificación por PCR como se describe en el ejemplo 1 (véase la Fig. 8). Se generó una molécula de Der p 2 híbrido en orden inverso (aa 54-129 + 1-53) por “splicing” por solapamiento de la extensión de genes basado en PCR. (Linhart y col., FASEB J.16 (2002), 1301-1303).

55 a) *Expresión in E. coli y purificación de fragmentos de Der p 2, Der p 2 y Der p 2 híbrido*

El ADNc que codifica Der p 2 marcados His, fragmentos de Der p 2 (aa 1-53 y aa 54-129) y Der p 2 híbrido (aa 54-129 + 1-53) se generó por medio de amplificación por PCR usando cebadores (MWG, Ebersberg, Alemania), como se indica en la Tabla 4 y se obtuvo un ADNc de Der p 2 por medio de transcripción inversa de ARN de Der p 2.

TABLA 4

Cebador	Secuencia
5	1(F) 5'- <u>GGAATTCCATATGGATCAAGTCGATGTC</u> -3'
10	2(R) 5'- <u>GGAATTCC</u> TTAGT <u>GATGGT</u> GATGGT <u>GATGTT</u> CAATTAGCGGT-3'
15	3(F) 5'- <u>GGAATTCCATATGATCAAAGCCTCAAT</u> -3'
20	4(R) 5'- <u>GGAATTCC</u> TTAGT <u>GATGGT</u> GATGGT <u>GATGATCGCGG</u> ATTTA-3'
25	5(solapamiento) 5'-CTTGACATCGACTTGATCATCGCGGATTTAGCAT-3'
30	6(solapamiento) 5'-CATGCTAAATCCGCGATGATCAAGTCGATGTCAAA-3'

Se indican los cebadores de avance (F), inversos (R) y de solapamiento. Los sitios EcoRI y NdeI están subrayados. Los nucleótidos que codifican las marcas His se muestran en negrita/cursiva.

Los cebadores 1 y 4 se usaron para la amplificación del ADNc de rDer p 2, los cebadores 1 y 2 para el ADNc que codifica el fragmento 1 de rDer p 2 (aa 1-53) y los cebadores 3 y 4 para el ADNc del fragmento 2 de rDer p 2 (aa 54-129). Se generó el rDer p 2 híbrido por “splicing” por solapamiento de la extensión de genes basado en PCR usando los cebadores 2 y 3 y los dos cebadores de solapamiento 5 y 6. Los cebadores cadena arriba contenían in sitio NdeI y EcoRI y los cebadores cadena abajo contenían un sitio EcoRI así como seis codones His. Los productos de PCR se cortaron con NdeI/EcoRI, se purificaron sobre gel y se subclonaron en los sitios NdeI/EcoRI del plásmido pET17b. El procedimiento de cloruro de calcio se usó para la transformación de los plásmidos en la cepa de *E. coli* XL-1 Blue. El ADN de plásmido se aisló por medio del kit NucleoBond AX maxi-prep (Macherey-Nagel, Alemania) y la secuencia de las inserciones de ADNc se confirmaron por medio de secuenciación de ambas hebras de ADN en un sistema de secuenciación automatizado (MWG, Alemania).

Las proteínas recombinantes que contienen colas de Hexahistidina C-terminal se expresaron en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) en cultivo líquido por inducción con isopropil-β-tiogalactopiranosida (IPTG) 0,5 mM a una OD 600 de 1 durante 5 horas a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación a 4.000 x g durante 15 minutos a 4°C.

Los sedimentos bacterianos obtenidos a partir de 11 cultivos líquidos se volvieron a suspender en 10 ml de imidazol 25 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1% v/v y se trataron con lisozima 100 µg durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lisaron por medio de 3 ciclos de congelación/descongelación (-70°C/+50°C), el ADN se degradó por incubación con DNasa I 1 µg durante 10 minutos a temperatura ambiente y los desechos celulares se retiraron por centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El fragmento 1 de rDer p 2 se encontró en la fracción soluble y se purificó en condiciones nativas sobre columnas de afinidad con resina de Ni-NTA (QIAGEN, Alemania).

El rDer p 2, fragmento 2 de rDer p 2 y rDer p 2 híbrido se encontraron en el sedimento en la fracción corporal de inclusión, que se solubilizó con urea 8M, NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-Cl 10 mM, pH 8 durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los residuos insolubles se retiraron por centrifugación (10.000 x g, 15 min., 4°C) y rDer p 2, fragmento 2 de rDer p 2 y rDer p 2 híbrido se purificaron en condiciones de desnaturización sobre columnas de afinidad con resina de Ni-NTA (QIAGEN).

Las fracciones, que contienen proteínas recombinantes de más del 90% de pureza se dializaron contra NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7 y las concentraciones de proteínas finales se determinaron por Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce, EE.UU.).

La construcción de una molécula híbrida como se describe anteriormente interrumpió al menos una de las dos hojas β de Der p 2 y el enlace disulfuro entre C8 y C119 y de ese modo los epitopes de IgE conformacionales de Der p 2 se destruyeron y los epitopes de células T principales se conservaron. Los derivados de rDer p 2 se sobreexpresaron a medida que las bandas visibles en *E. coli* proporcionaban una acumulación distinta (Fig. 9, bandas 1). El fragmento 1 de rDer p 2 se encontraba en la fracción soluble, mientras que las otras proteínas se acumulaban en las fracciones corporales de inclusión insoluble pero se podían solubilizar en urea. El rDer p 2 y el derivado de rDer p 2 se purificaron por cromatografía de afinidad con níquel (Fig. 9, bandas 2) proporcionando un cultivo de 20 a 30 mg de proteína/1 *E. coli*. Después de volver a plegar por diáfragma, rDer p 2, fragmento 1 de rDer p 2 y rDer p 2 híbrido permanecieron solubles en tampones fisiológicos a concentraciones de 0,5 mg/ml a 1 mg/ml, mientras que el fragmento 2 de rDer p 2 sólo permaneció soluble en una concentración inferior a 0,1 mg/ml. El análisis de SDS PAGE indicó una pureza de más del 90% de las proteínas, que migraron en formas monoméricas y formas diméricas (Fig. 9, bandas 2).

ES 2 319 218 T3

b) Espectrometría de masas por desorción mediante láser asistida por matriz y tiempo de vuelo con ionización (MALDI TOF) de rDer p 2 y derivados de rDer p 2

Los espectros de masas por desorción mediante láser se adquirieron en un modo lineal con un instrumento de tiempo de vuelo Compact MALDI II (Kratos, U.K.; piCHEM, Austria). Las muestras se disolvieron en acetonitrilo al 10%, ácido trifluoracético al 0,1% y se usó el ácido Alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico (disuelto en acetonitrilo al 60%, ácido trifluoracético al 0,1%) en forma de una matriz. Para la preparación de la muestra, se depositó una mezcla 1:1 de proteína y solución matriz sobre la diana y se secó al aire.

El análisis de las cuatro proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF reveló masas moleculares de 15.072,9 Da, 6.806,7 Da, 9.216,3 Da y 15.001,8 Da para rDer p 2, fragmento 1 de rDer p 2, fragmento 2 de rDer p 2 y rDer p 2 híbrido, respectivamente, que son de conformidad con las masas teóricas de las proteínas calculadas a partir de sus secuencias de aminoácidos (Fig. 10).

c) Análisis de dicroismo circular (CD)

Los espectros CD de las proteínas recombinantes purificadas se registraron en un espectropolarímetro JASCO J715 que se había calibrado en longitud de onda con vidrio de neodimio de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se realizaron las medidas CD con rDer p 2 y derivados de rDer p 2 ($c = 0,1 \text{ mg/ml}$ a $0,5 \text{ mg/ml}$) disueltos en agua doble destilada a temperatura ambiente. Se usó una cubeta de cuarzo circular con una longitud de recorrido de 0,1 cm, y los espectros se registraron con resolución de 0,2 nm a una velocidad de exploración de 50 nm/min. Se determinó el promedio de la señal de los espectros por medio de la acumulación de al menos tres exploraciones y los resultados se expresan como la elipticidad de residuo media en una longitud de onda proporcionada.

El espectro CD ultravioleta lejano del Der p 2 purificado recombinante, muestra una banda negativa de 217 nm, que indica una conformación de hoja β (Fig. 11). En contraposición, los espectros CD de los derivados de rDer p 2 indican que estas proteínas no están principalmente plegadas. El fragmento 1 de rDer p 2 muestra una conformación en hélice aleatoria típica, identificada por medio de una banda negativa a -200 nm. También el fragmento 2 de rDer p 2 muestra una conformación en hélice aleatoria predominante, aunque la intensidad de la señal era muy baja. El espectro de rDer p 2 híbrido absorbió principalmente la conformación en hélice aleatoria con cantidades pequeñas de estructuras en hoja β (Fig. 11). La destrucción de la conformación tridimensional se podría confirmar por medio de análisis de dicroismo circular, mostrando una pérdida o reducción de la estructura en hoja β en los derivados de rDer p 2 en comparación con rDer p 2 de tipo salvaje.

Ejemplo 7

Der p 2 híbrido recombinante (rDer p 2 híbrido) muestra una capacidad de unión a IgE sumamente reducida

Se analizaron Der p 2 purificado recombinante, los dos fragmentos de rDer p 2, fragmento 1 (aa 1-53) y fragmento 2 (aa 54-129) y rDer p 2 híbrido para detectar la reactividad de IgE por medio de ensayos de transferencia por puntos no desnaturalizantes. Se puncionaron dos microlitros de las proteínas purificadas (0,1 mg/ml) y, a efectos de control, BSA sobre bandas de membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Alemania). Las bandas de nitrocelulosa que contienen las proteínas transferidas por puntos se bloquearon en tampón A (Na_2HPO_4 40 mM, Na_2HPO_4 0,6 mM, pH 7,5, 0,5% [v/v] Tween 20, BSA al 0,5% [p/v], NaN_3 0,05% [p/v]) y se incubaron con suero de pacientes alérgicos a los ácaros, suero de una persona no alérgica (diluciones 1:10) o tampón A sin suero. Se detectaron los anticuerpos unidos a IgE con anticuerpos de anti-IgE humanos marcados con ^{125}I y se visualizaron por autorradiografía.

La capacidad de unión a IgE del alérgeno rDer p 2 de tipo salvaje se comparó con los dos fragmentos de rDer p 2 y rDer p 2 híbrido por medio de ensayos de transferencia por puntos no desnaturalizantes. El suero de 17 individuos alérgicos a los ácaros (bandas 1-17) mostraron reactividad de IgE variante a rDer p 2 puncionado con nitrocelulosa, mientras que no se pudo detectar la reactividad de IgE al fragmento 1 de rDer p 2.

Solamente 3 sueros mostraron una unión muy débil al fragmento 2 de rDer p 2 y 2 sueros reaccionaron con rDer p 2 híbrido (Fig. 12). El suero de una persona no alérgica así como tampón sin suero no mostraron reactividad de IgE a rDer p 2 o a derivados de rDer p 2 (Fig. 12 bandas 18, 19). No se encontró reactividad de IgE a la proteína de control, BSA (Fig. 12). Como consecuencia de la pérdida de la conformación y así pues los epitopes de IgE conformacionales (véase el ejemplo 7), se podría mostrar que los derivados de rDer p 2 han perdido casi completamente su capacidad de unión a IgE en comparación con rDer p 2 de tipo salvaje.

Ejemplo 8

Actividad alergénica reducida de los derivados de rDer p 2 como se determina por expresión de CD 203c

Se obtuvieron muestras de sangre heparinizada de pacientes alérgicos. Las muestras de sangre (100 μl) se incubaron con varias concentraciones de rDer p 2, fragmentos de rDer p 2, rDer p 2 híbrido, un anticuerpo anti-IgE monoclonal (Immunotech, Marsella, Francia), o PBS durante 15 minutos (37°C). La expresión de CD 203c se determinó como se describe (Hauswirth, A. W., y col. (2002) J Allergy Clin Immunol 110: 102.).

La regulación hacia arriba de CD 203c se ha descrito como un marcador de sustitución para la activación de basófilos inducida por alérgenos y la desgranulación (Hauswirth, A. W., y col. (2002)). Por lo tanto, se comparó la actividad alergénica de Der p 2 recombinante, fragmentos de rDer p 2 y rDer p 2 híbrido midiendo la regulación hacia arriba de CD 203c en basófilos de pacientes alérgicos a los ácaros del polvo doméstico (Fig. 13, 14). La Fig. 13 muestra resultados representativos de 3 pacientes. La incubación de basófilos con 10 µg/ml de rDer p 2 de tipo salvaje reguló hacia arriba de forma significativa la expresión de CD 203c en cada uno de los pacientes analizados, mientras que no se obtuvo regulación hacia arriba con la misma concentración de los fragmentos individuales o con una mezcla equimolar de los dos fragmentos (Fig. 13). De forma adicional, los basófilos de los mismos 10 pacientes se expusieron a concentraciones diferentes (5 µg/ml-0,32 ng/ml) de rDer p 2 y rDer p 2 híbrido en etapas de dilución 1:5. La figura 14 muestra los resultados de 6 pacientes representativos. La exposición de basófilos con rDer p 2 híbrido resultó en una regulación hacia arriba de la expresión CD 203c en concentraciones entre 40 ng/ml y 5.000 ng/ml, mientras que rDer p 2 de tipo salvaje indujo la regulación hacia arriba de CD 203c todavía a concentraciones entre 8-200 ng/ml. En 8 de los 10 pacientes, el rDer p 2 híbrido tenía una capacidad reducida de más de diez veces para activar basófilos en comparación con rDer p 2.

Los anticuerpos anti-IgE humanos indujeron una regulación hacia arriba de la expresión CD 203c en los basófilos de todos los pacientes, mientras que no se obtuvo regulación hacia arriba con el tampón solo (Fig. 13 + 14).

La determinación de la expresión de CD 203c en basófilos de pacientes alérgicos a los ácaros indica una actividad biológica reducida de rDer p 2 híbrido en comparación con rDer p 2 de tipo salvaje y no se puede observar actividad biológica con los fragmentos de rDer p 2. Además, los ensayos de activación de basófilos usando células RBL indican que los anticuerpos de IgE inducidos con los derivados eran menos anafilácticos. Estos resultados indican que los derivados de rDer p 2 hipoalergénicos inducirán menos efectos secundarios mediados por IgE que el alérgeno Der p 2 de tipo salvaje cuando se usa para inmunoterapia.

Ejemplo 9

Los derivados de rDer p 2 inducen anticuerpos de IgG específicos de rDer p 2 en ratones de forma similar que el alérgeno rDer p 2 de tipo salvaje

Se inmunizaron grupos de cinco ratones BALB/c hembras de ocho semanas de edad con 5 µg de proteínas purificadas (rDer p 2, fragmento 1 de rDer p 2, fragmento 2 de rDer p 2 o rDer p 2 híbrido), adsorbiéron a 200 µl de AluGel-S (SERVA Electrophoresis, Alemania) por vía subcutánea en el cuello en intervalos de 4 semanas durante un periodo de 20 semanas. Se recogieron las muestras de sangre un día antes de cada inmunización y se almacenaron a -20°C.

Se cubrieron placas ELISA (Greiner, Austria) con rDer p 2 diluido en PBS ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) durante toda una noche a 4°C. Las placas se lavaron dos veces con PBST (PBS; Tween 20 al 0,05% v/v) y se bloquearon con tampón de bloqueo (PBST; BSA al 1% p/v) durante 3 horas a temperatura ambiente. El suero de los ratones se diluyó 1:1000 para la medida de IgG1 específico de Der p 2 en PBST; se añadió BSA p/v al 0,5% y 100 µl de esta solución por pocillo durante toda la noche a 4°C.

Las placas se lavaron 5 veces con PBST y los anticuerpos unidos a IgG1 se detectaron con un anticuerpo IgG1 de rata anti-ratón monoclonal (BD Pharmigen, EE.UU.), seguido de la adición de anticuerpos IgG de cabra anti-rata marcados con peroxidasa de rábano picante (Amersham Bioscience, Suecia) como se describe (Vrtala, S., y col. (1996) J Allergy Clin Immunol 98: 913).

Los niveles de IgG₁ específicos de Der p 2 se determinaron en muestras de suero obtenidas de ratones después de la inmunización con rDer p 2 y derivados de rDer p 2 (Fig. 15). rDer p 2 así como los derivados de rDer p 2 eran inmunogénicos e indujeron respuestas de IgG₁ en los ratones después de la segunda inmunización (semana 8) (Fig. 15). Después de la segunda inmunización las respuestas de IgG₁ inducidas con el fragmento 1 de rDer p 2 y rDer p 2 híbrido eran incluso superiores que las inducidas con rDer p 2 (Fig. 15). Después de la última inmunización, las respuestas de IgG₁ inducidas con los derivados de rDer p 2 eran comparables a las inducidas con la molécula rDer p 2 de tipo salvaje (Fig. 15).

Ejemplo 10

Los anticuerpos de IgG1 inducidos por inmunización con derivados de rDer p 2 inhiben la unión de IgE de pacientes alérgicos a los ácaros a rDer p 2 de tipo salvaje

Se cubrieron placas ELISA (Greiner, Austria) con rDer p 2 purificado 100 µl, diluido con PBS hasta una concentración de 5 µg/ml, durante toda una noche a 4°C. Después de lavar las placas dos veces con PBST y bloquear con tampón de bloqueo (PBST; BSA al 1% p/v) durante 3 horas a temperatura ambiente, las placas se incubaron durante toda la noche a 4°C con antisueros de anti-rDer p 2, fragmento 1 de anti-rDer p 2, fragmento 2 de anti-rDer p 2 o anti-rDer p 2 híbrido o los sueros preinmunes correspondientes. Los antisueros de ratón se diluyeron 1:20 y se diluyeron los antisueros de conejo 1:100 en PBST; BSA al 0,5% p/v. Después de lavar, las placas se incubaron con sueros diluidos 1:10 de pacientes alérgicos a los ácaros durante toda una noche a 4°C y los anticuerpos humanos unidos a IgE se detectaron con anticuerpos anti-IgE de cabra humanos unidos por HRP (KPL, EE.UU.) diluidos en PBST 1:2500;

ES 2 319 218 T3

BSA al 0,5% p/v como se ha descrito (44, 45). El porcentaje de inhibición de la unión a IgE se calculó como sigue: $100 - (\text{ODs}/\text{ODp}) \times 100$, donde ODs y ODp representan los coeficientes de extinción después de la preincubación con el suero inmune y el suero preinmune, respectivamente.

- 5 Los anticuerpos IgG1 de ratón inducidos por la inmunización con rDer p 2 y los derivados de rDer p 2 se investigaron para detectar su capacidad para inhibir la unión de IgE de pacientes alérgicos a los ácaros a rDer p 2 en experimentos de competición ELISA.

10 El porcentaje de inhibición de la unión de IgE de pacientes alérgicos a rDer p 2 de tipo salvaje por medio de anticuerpos IgG de ratón se muestra en las Tablas 5 y 6.

15 La inhibición obtenida con los anticuerpos anti-rDer p2 de ratón estaba entre el 61% y el 87% (media del 75%), mientras que los anticuerpos de anti-rDer p 2 híbrido de ratón, anticuerpos del fragmento 1 de anti-Der p 2 y anticuerpos del fragmento 2 de rDer p 2 inhibieron la unión de IgE de suero a rDer p 2 de tipo salvaje entre el 47% y el 76% (media del 62%), entre el 48% y el 66% (media del 54%) y entre el 24% y el 52% (media del 41%), respectivamente (Tabla 5).

TABLA 5

% Inhibición de unión de IgE						
	Anticuerpos	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	media
	fragmento 1 de rDer p 2	48	66	53	50	54
	fragmento 2 de rDer p 2	39	50	52	24	41
	rDer p 2 híbrido	59	76	64	47	62
	rDer p 2	61	87	77	73	75

20 En experimentos adicionales, los conejos se inmunizaron con rDer p 2 purificado y los tres derivados de rDer p 2. La capacidad del antisuero de conejo para inhibir la unión de IgE de pacientes alérgicos a los ácaros a rDer p 2 también se analizó por medio de ensayos de inhibición por ELISA con un resultado similar al obtenido para los sueros de ratón (Tabla 6). Los anticuerpos anti-Der p 2 de conejo inhibieron la unión de IgE de pacientes a rDer p 2 entre el 47% y el 89% (media del 66%), mientras que los anticuerpos de anti-rDer p 2 híbrido inhibieron la unión de IgE humano entre el 20% y el 86% (media del 59%). La inhibición obtenida con los anticuerpos del fragmento 1 de anti-rDer p 2 de conejo estaba entre el 26% y el 70% (media del 52%) y la inhibición con los anticuerpos del fragmento 2 de anti-rDer p 2 de conejo estaba entre el 32% y el 54% (media del 42%). Usando una mezcla de los anticuerpos del anti-fragmento 1 y el anti-fragmento 2, la inhibición de la unión de IgE de pacientes a rDer p 2 de tipo salvaje se aumentó ligeramente sólo hasta una media del 55% (Tabla 6).

45 TABLA 6

% Inhibición de unión de IgE							
	Anticuerpos	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	media
	fragmento 1 rDer p 2	59	70	49	26	57	52
	fragmento 2 rDer p 2	40	49	33	32	54	42
	fragmento 1 + fragmento 2	60	69	44	38	66	55
	rDer p 2 híbrido	61	86	61	20	67	59
	rDer p 2	60	89	53	47	78	66

60 La inmunización de ratones mostró la inmunogenicidad de todos los tres derivados de rDer p 2 por medio de su capacidad para inducir respuestas de anticuerpos IgG. La unión de IgE de pacientes alérgicos a los ácaros a Der p 2 se inhibió por medio de anticuerpos de IgG inducidos con cada uno de los derivados de rDer p 2 pero los anticuerpos de IgG inducidos por rDer p 2 híbrido indicó una capacidad inhibitoria mejor en comparación con los anticuerpos de IgG inducidos con los dos fragmentos individuales e incluso con una mezcla de los anticuerpos IgG inducidos por los fragmentos 1 y 2. Estos resultados son de importancia, ya que los anticuerpos de bloqueo mostraron desempeñar una función principal en SIT con alérgenos recombinantes.

ES 2 319 218 T3

Los anticuerpos de anti-Der p 2 y derivados de anti-Der p 2 inducidos por medio de la inmunización de la unión de IgE de pacientes alérgicos a los ácaros a rDer p 2 como se muestra en un ensayo de inhibición por ELISA.

Der p 2 híbrido induce los anticuerpos de bloqueo en el presente modelo de ratón; la immunogenicidad se aumenta 5 de forma significativa por medio del intercambio de fragmentos.

Ejemplo 11

10 Las vacunas basadas en derivados de rDer p 2 tienen una alergenicidad reducida *in vivo* en comparación con una vacuna basada en rDer p 2 de tipo salvaje

Las células con leucemia basófila de rata (RBL) (sublínea RBL-2H3) se sembraron en placas ELISA (Nunc, Dinamarca) (100 µl: células 4 x 104) en medio de cultivo (RPMI 1649100 ml, FCS al 10%, L-Glutamine 4 mM, Piruvato de sodio 2 mM, HEPES 10 mM, 2-Mercaptoetanol 100 mM, Pen/Strep al 1%) durante toda una noche a 15 37°C, CO₂ al 5%.

Las células se cargaron con 2 µl de suero obtenido de ratones inmunizados con rDer p 2, fragmento 1 de rDer p 2, fragmento 2 de rDer p 2 y rDer p 2 híbrido durante 2 horas a 37°C, se lavaron dos veces con 200 µl de tampón 20 Tyrode/BSA (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, 0,5 mM MgCl₂, CaCl₂ 1,8 mM, NaH₂PO₄ 0,4 mM, D-glucosa 5,6 mM, NaHCO₃ 12 mM, ácido N-2-hidroxietilpirazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 10 mM, albúmina de suero bovino al 0,1%, pH 7,2) (Sigma-Aldrich, Austria) y se estimularon con Der p 2 (c = 0,3 µg/ml). La liberación total de β-hexosaminidasa se indujo por medio de la adición de Triton X-100 10 ml al 10% v/v (Merck, Alemania).

Para medir la liberación de β-hexosaminidasa, se incubó 50 µl de una solución del ensayo (4-metilumbeliferil-N-25 acetil-p-D-glucosaminida 80 µM en tampón de citrato 0,1M, pH 4,5) con 50 µl de sobrenadante durante 1 hora a 37°C, CO₂ al 5%.

La reacción se detuvo por medio de la adición de tampón glicina 100 µl (glicina 0,2M, NaCl 0,2M, pH 10,7) y se 30 midió la fluorescencia en λem: 360nm λem: 465nm usando un lector de microplacas de fluorescencia (Dynatech MR 7000, Dynatech Laboratories, EE.UU.). Los resultados se muestran como porcentajes medios de la liberación total de β-hexosaminidasa.

Para investigar si la vacunación con derivados de rDer p 2 induce respuestas inmunes alérgicas al alérgeno Der 35 p 2 de tipo salvaje, los ratones se inmunizaron con rDer p 2, fragmento 1 de rDer p 2, fragmento 2 de rDer p 2 y rDer p 2 híbrido, respectivamente. Despues, las muestras de suero de los ratones se usaron para cargar células RBL para cuantificar la respuesta inmune alérgica al alérgeno rDer p 2 de tipo salvaje por medio de experimentos de desgranulación de RBL. La liberación obtenida con el alérgeno rDer p 2 de tipo salvaje en RBL cargadas con 40 anticuerpos de ratón del fragmento 1 de anti-rDer p 2, fragmento 2 de anti-rDer p 2 y anti-rDer p 2 híbrido estaba entre el 0% y el 16,6% (media del 6,4%), entre el 0,2% y el 28,6% (media del 13,2%) y entre el 4,7% y el 37,1% (media del 18,3%), mientras que las RBL, cargadas con anticuerpos anti-rDer p 2 de tipo salvaje liberados entre el 35% y el 39% (media del 37%) después de la estimulación con rDer p 2 de tipo salvaje (Fig. 16).

Ejemplo 12

45 Anticuerpos de IgG inducidos por MP 12 que reconocen Phl p 12 de tipo salvaje, profilinas de otros pólenes y profilinas derivadas de alimentos vegetales

Con el fin de analizar si los anticuerpos inducidos después de la inmunización con MP 12 reconocen profilinas de 50 pólenes así como de alimentos derivados de plantas, se llevaron a cabo experimentos por ELISA.

Las profilinas del polen de festuca roja (Phl p 12), polen de abedul (Bet v 2), polen de artemisa (Art v 4) y de 55 diferentes alimentos vegetales (anacardo (Ana c), apio (Api g 4), plátano (Mus xp 1), avellana (Cor a 2), y zanahoria (Dau c 4)) se cubrieron sobre placas ELISA (5 mg/ml) y se incubaron con diluciones en serie de antisuero de conejo (1:2000-1:64000). Los anticuerpos de conejo unidos se detectaron con un antisuero de burro anti-conejo marcado con POX.

MP 12 indujo una respuesta de anticuerpo IgG que se podía comparar con la inducida con Phl p 12 de tipo salvaje (Fig. 17). Ambos, los anticuerpos IgG inducidos por MP12 y Phl p 12 reaccionaron de forma cruzada con profilinas de pólenes (césped, árboles, maleza) y profilinas de alimentos derivados de plantas (Fig. 17).

Ejemplo 13

60 Los anticuerpos anti-MP12 inhiben la unión de IgE de suero de pacientes alérgicos al polen del césped a Phl p 12 en su totalidad así como a profilinas de otros pólenes (árboles y maleza) y a profilinas de alimentos vegetales

La capacidad de IgG de conejo inducido por MP12 para inhibir la unión de IgE de pacientes alérgicos a Phl p 12, a 65 profilinas de pólenes distintos y a profilinas derivadas de alimentos vegetales se investigó por medio de experimentos de competición ELISA.

ES 2 319 218 T3

Se cubrieron placas ELISA (Nunc Maxisorp, Dinamarca) con profilinas de festuca roja (rPhl p 12), polen de abedul (rBet v 2), zanahoria (rDau c 4), avellana (rCor a 2), plátano (rMus xp 1) y anacardo (rAna c 1) y se preincubaron con una dilución 1:50 del antisuero anti-Phl p 12, el antisuero anti-MP12 y, a efectos de control, con los sueros preinmunes correspondientes. Después de lavar, las placas se incubaron con sueros diluidos 1:3 de ocho pacientes sensibilizados a las profilinas y los anticuerpos de IgE unidos se detectaron con un antisuero anti-IgE de cabra humano marcado con HRP (KPL, EE.UU.), diluido 1: 2500. El porcentaje de inhibición de la unión de IgE conseguida por medio de la preincubación con los antisueros anti-Phl p 12 y anti-MP12 se calculó como sigue: % de inhibición de la unión de IgE = 100-ODI/ODP x 100. ODI y ODP representan las extinciones después de la preincubación con los sueros inmunes de conejos y los sueros preinmunes correspondientes, respectivamente (Tabla 7).

10

TABLA 7

15	Paciente	Porcentaje de inhibición de la unión de IgE a											
		Phl p 12		Bet v 2		Cor a 2		Mus xp 1		Dau c 4		Ana c1	
		α -Phlp 12	α -MP 12	α -Phlp 12	α -MP 12	α -Phlp 12	α -MP 12	α -Phlp 12	α -MP 12	α -Phlp 12	α -MP 12	α -Phlp 12	α -MP 12
20	1	91	82,7	88,3	84,4	61,3	58,7	70,6	46,4	82,7	83,3	70	71,7
	2	82,5	72,8	74,9	77,6	73,3	60,3	74,4	50,8	75,5	83,2	62,3	45,1
	3	69,4	72,3	75,4	76,4	58,8	61,6	74,4	33,5	65,4	63,1	61,6	56
25	4	77,4	72	69	69,6	56,00	52	57,2	39,8	65	66,8	71,5	41,5
	5	86,3	65,2	35	66,4	66,6	52	75,5	27,2	97,5	93,8	59,5	56,2
	6	71,2	84,7	54,4	72	57	62,7	73,9	25,6	58,5	68,3	44,3	42,6
30	7	83,6	70,4	60,2	70,8	69,7	59,7	72,5	35,6	72,4	71,3	28,1	32,2
	8	89,1	57,4	61	79	57,8	57,8	73	29,6	70	67		
	media	83,8	72,3	64,8	74,5	62,3	58,1	71,4	36,1	73,3	74,6	56,8	53,6

35 La inhibición media de la unión de IgE a profilinas de polen de festuca roja conseguida con anticuerpos inducidos por Phl p 12 y anticuerpos inducidos por MP 12 se podía comparar con el 83,8% y el 72,3%, respectivamente (Tabla 7). La unión de IgE a la profilina de polen de abedul, Bet v 2, se inhibió aún más fuerte con anticuerpos específicos de MP 12 (inhibición media al 74,5%) que con anticuerpos inducidos por Phl p 12 (inhibición media al 64,8%). La unión de IgE a profilinas de alimentos vegetales se inhibió con ambos antisueros a un grado muy similar (Cor a 2: inhibición media al 62,3% con anti-Phl p 12-IgG, 58,1% con anti-MP 12-IgG; Dau c 4: inhibición media al 73,3% con anti-Phl p 12-IgG, 74,6% con anti-MP 12-IgG; Ana c 1: inhibición media al 56,8% con anti-Phl p 12-IgG, 53,6% con anti-MP 12-IgG). Solamente la unión de IgE a profilina de plátano, Mus xp 1, se inhibió menos con anti-Mp 12-IgG (36,1%) que con IgG inducido por anti-Phl p 12 (71,4%) (Tabla 7).

45 La profilina representa un alérgeno que está expresado en todas las células eucarióticas y representa así un pan-alérgeno que puede inducir alergias inhalativas (por ejemplo, rinoconjuntivitis, asma) así como síndromes de alergia oral después de la ingestión oral (purito e hinchazón de labios y la lengua) en pacientes sensibles.

50 El derivado Phl p 12 intercambiado, MP12, induce anticuerpos de IgG después de la inmunización que reconocen profilinas a partir tanto de pólenes como de alimentos derivados de plantas. Los anticuerpos inducidos por MP 12 inhiben IgE del suero de pacientes que se une a profilinas a partir de pólenes y también a profilinas derivadas de alimentos vegetales. Así pues, el MP 12 es adecuado para el tratamiento de sensibilización cruzada de polen-alimento atribuible a la alergia a profilinas.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir derivados de alérgenos de proteínas de tipo salvaje con actividad alergénica reducida, **caracterizado** por las siguientes etapas:

- proporcionar un alérgeno de proteína de tipo salvaje con una actividad alergénica,
- dividir dicho alérgeno de proteína de tipo salvaje en dos partes, teniendo dichas dos partes una actividad alergénica reducida o careciendo de actividad alergénica y
- volver a unir dichos dos fragmentos en orientación inversa.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que dicho derivado está producido en huésped en forma de una proteína recombinante, en especial con un huésped con capacidad de expresión elevada.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** por que dicho alérgeno de tipo salvaje se selecciona del grupo de profilinas, en especial Phl p 12, alérgenos de abedul, en especial Bet v 4, alérgenos de ácaros del polvo, en especial Der p 2, alérgenos de ácaros de almacenamiento, en especial Lep d 2, alérgenos de festuca roja, en especial Phl p 7.

4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por que la reducción en la actividad alergénica se mide por medio de una reducción de la inhibición de la capacidad de unión de IgE de al menos el 10%, preferiblemente al menos el 20%, especialmente al menos el 30%, en comparación con el alérgeno de tipo salvaje.

5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** por que la reducción en la actividad alergénica se mide por medio de la ausencia de la unión de anticuerpos de IgE de sueros de pacientes sensibles a los alérgenos a una transferencia por puntos de dicho derivado.

6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** por que dichos derivados se combinan con un excipiente farmacéuticamente aceptable y se terminan en una preparación farmacéutica.

7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** por que dichos derivados se combinan con un adyuvante de vacuna adecuado y se terminan en una preparación de vacuna farmacéuticamente aceptable.

8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** por que dichos derivados se combinan con alérgenos adicionales para proporcionar una vacuna de combinación.

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado** por que dicho alérgeno es un alérgeno de tipo salvaje, en especial una mezcla de alérgenos de tipo salvaje, alérgenos de tipo salvaje recombinantes, derivados de alérgenos de proteínas de tipo salvaje o mezclas de los mismos.

10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizado** por que dicha preparación contiene adicionalmente un extracto de alérgeno.

11. Derivado de alérgeno de un alérgeno de proteína de tipo salvaje, teniendo dicho alérgeno de proteína de tipo salvaje una secuencia de aminoácidos de 1 a Z, **caracterizado** por que dicho derivado adyacentemente contiene -en orientación N-terminal o C-terminal- los dos fragmentos de alérgeno de tipo salvaje X a Z y 1 a X, teniendo dichos dos alérgenos de tipo salvaje una actividad alergénica reducida o ausencia de actividad alergénica.

12. Derivado de alérgeno de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado** por que X a Z y 1 a X son al menos residuos de 30 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 50 residuos de aminoácidos, en especial al menos 60 residuos de aminoácidos.

13. Derivado de alérgeno de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, **caracterizado** por que X a Z y 1 a X difieren en longitud en el 50% o menos, preferiblemente en el 30% o menos, en especial en el 20% o menos.

14. Derivado de alérgeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, **caracterizado** por que dicho alérgeno de tipo salvaje se selecciona de un alérgeno de tipo I, preferiblemente de un alérgeno de la tabla A, más preferido un alérgeno del polen de la festuca roja (*Phelum pratense*), en especial Phl p 12, polen del abedul (*Betula verrucosa*), en especial Bet v 4, veneno contra la chaqueta amarilla (*Vespula vulgaris*), veneno contra la avispa de papel (*Polistes annularis*), polen de la Parietaria judaica, polen del césped de centeno, alérgenos de los ácaros del polvo, en especial Der p 2, o mezclas de los mismos.

ES 2 319 218 T3

15. Composición de alérgeno que comprende un derivado de alérgeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 y alérgenos adicionales, preferiblemente alérgenos de tipo salvaje, en especial una mezcla de alérgenos de tipo salvaje, alérgenos de tipo salvaje recombinantes, derivados de alérgenos de proteínas de tipo salvaje o mezclas de los mismos.

5 16. Composición de alérgeno de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizada** por que dicha composición contiene adicionalmente un extracto de alérgeno.

10 17. Composición de alérgeno de acuerdo con las reivindicaciones 15 a 16, **caracterizada** por que contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable.

18. Uso de un derivado de alérgeno o una composición de alérgeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 para la preparación de un medicamento de inmunoterapia específico de alérgeno.

15 19. Uso de un derivado de alérgeno o una composición de alérgeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 para la preparación de un medicamento para la inmunización pasiva.

20 20. Uso de un derivado de alérgeno o una composición de alérgeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 para la preparación de un medicamento para la inmunización profiláctica.

20 21. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, **caracterizado** por que dicho medicamento contiene adicionalmente adyuvantes, diluyentes, conservantes o mezclas de los mismos.

25 22. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, **caracterizado** por que comprende de 10 ng a 1 g, preferiblemente de 100 ng a 10 mg, en especial de 0,5 µg a 200 µg de dicho derivado de alérgeno recombinante.

23. Procedimiento para producir un derivado de alérgeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, **caracterizado** por las siguientes etapas:

- 30 - proporcionar una molécula de ADN que codifica un derivado de alérgeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17,
- transformar una célula hospedadora con dicha molécula de ADN y
- 35 - expresar dicho derivado en dicha célula hospedadora y aislar dicho derivado.

24. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, **caracterizado** por que dicho huésped es un huésped con capacidad de expresión elevada.

40 25. Procedimiento para producir un derivado de alérgeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, **caracterizado** por que está producido por síntesis química.

45 26. Uso de un derivado de profilina que se puede obtener a partir de una primera molécula de profilina de tipo salvaje por medio de un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 ó 23 a 25 o un derivado de alérgeno de una primera molécula de profilina de tipo salvaje de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 14 para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades alérgicas causadas por una segunda molécula de profilina de tipo salvaje.

50 27. Uso de acuerdo con la reivindicación 26, **caracterizado** por que dicha primera y dicha segunda molécula de profilina se seleccionan del grupo que está constituido por Phl p 12, Bet v 2, Art v 4, Ana c, Api g 4, Mus xp 1, Cor a 2, y Dau c 4.

55 28. Uso de acuerdo con la reivindicación 26, **caracterizado** por que dicha primera molécula de profilina es Phl p 12 y dicha segunda molécula de profilina se selecciona del grupo que está constituido por Bet v 2, Art v 4, Ana c, Api g 4, Mus xp 1, Cor a 2, y Dau c 4.

60 29. Uso de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de sensibilización cruzada de polen-alimento atribuible a la alergia a profilinas.

ES 2 319 218 T3

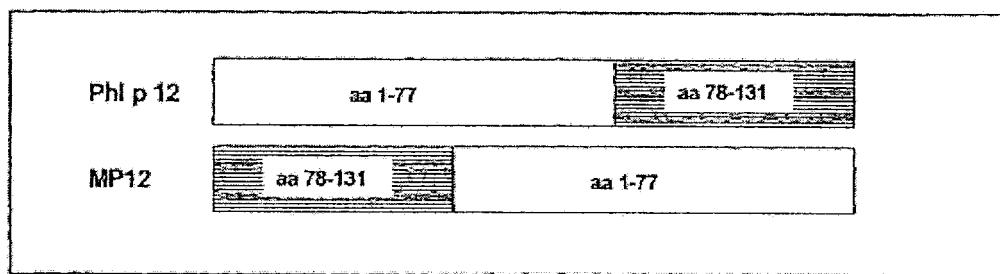


Fig. 1

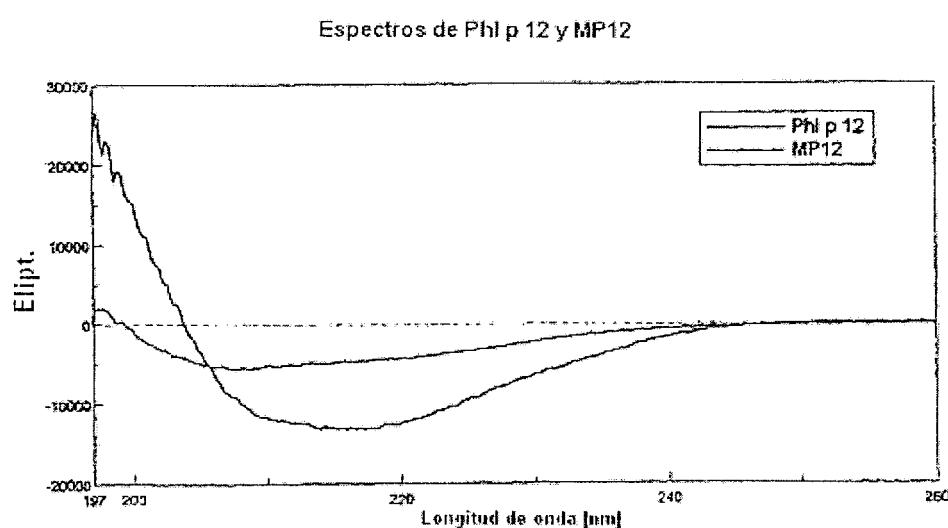


Fig. 2

ES 2 319 218 T3

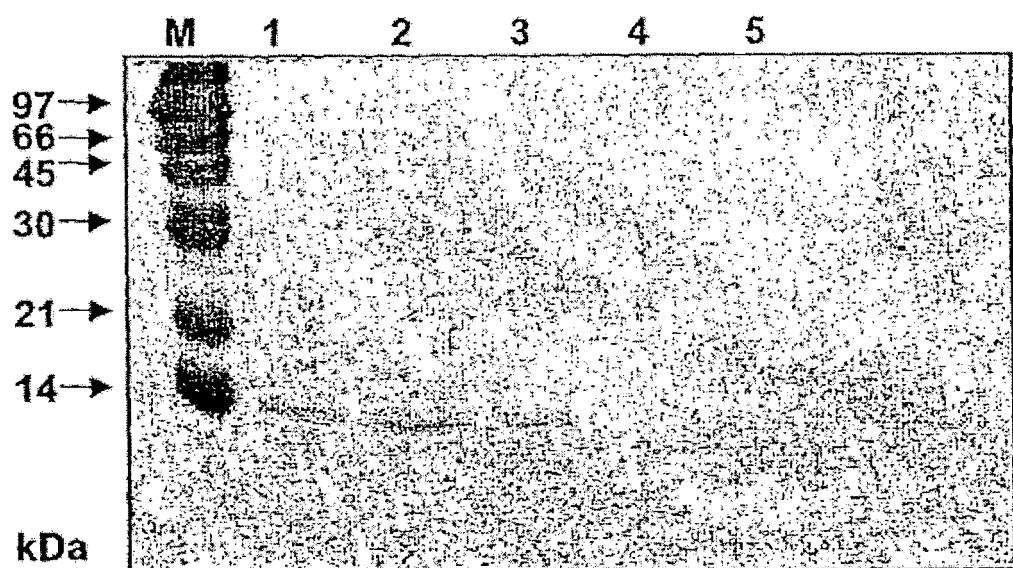


Fig. 3

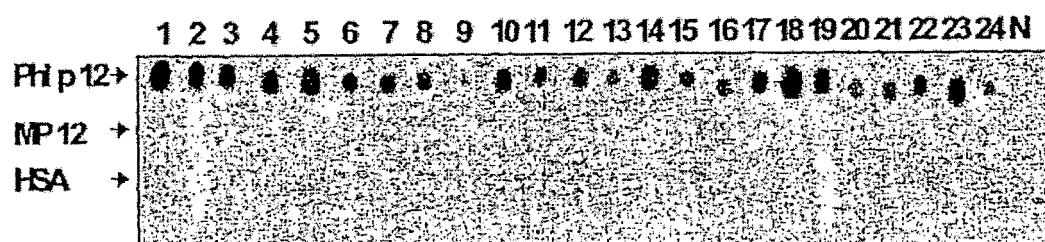


Fig. 4

ES 2 319 218 T3

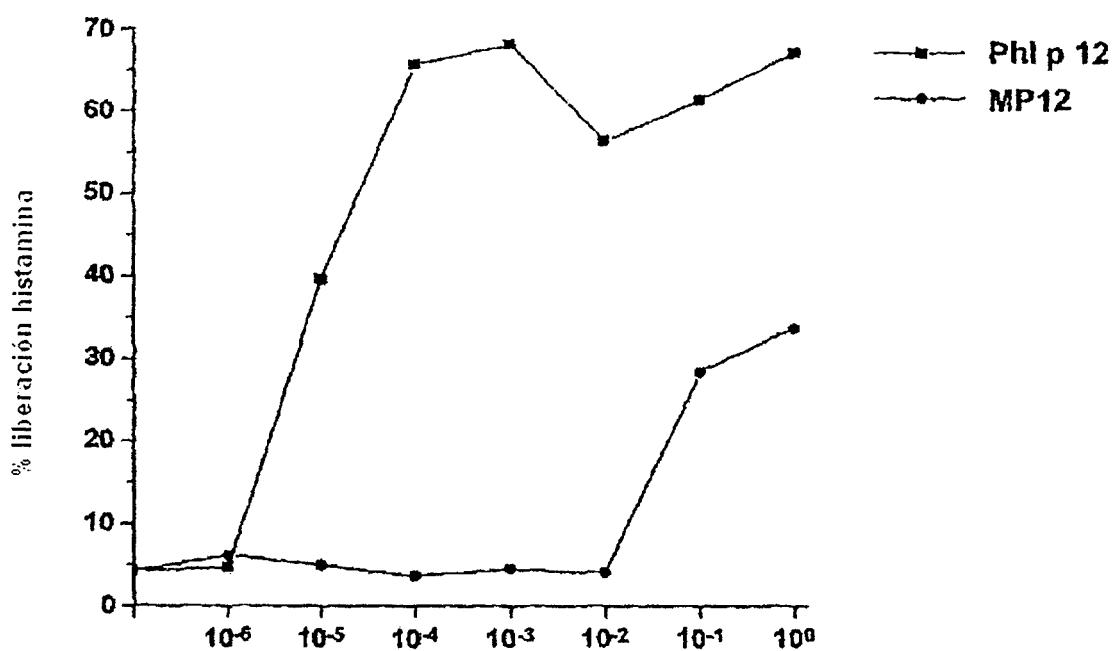
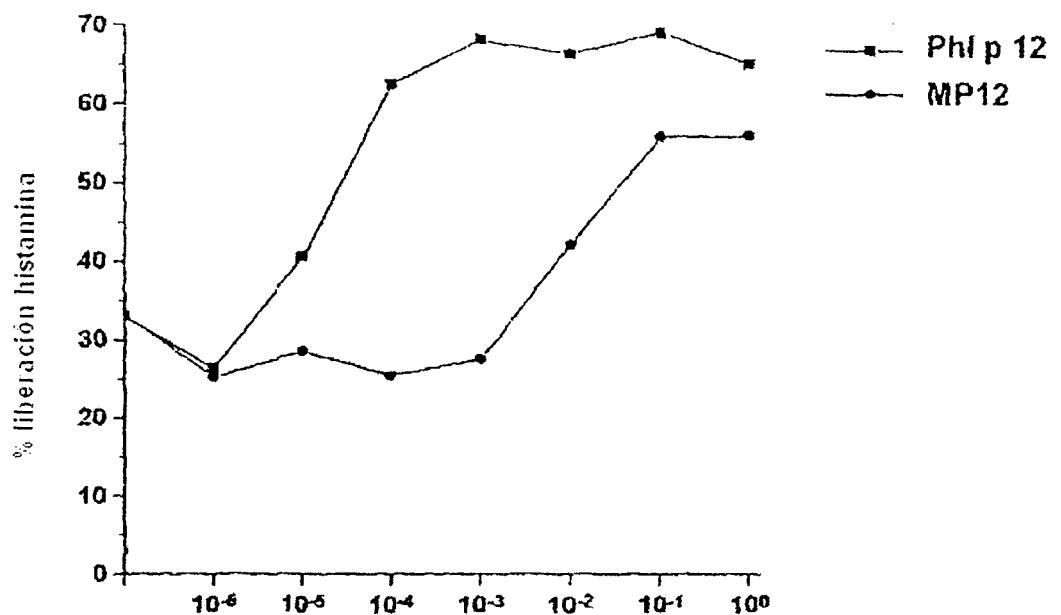


Fig. 5

ES 2 319 218 T3

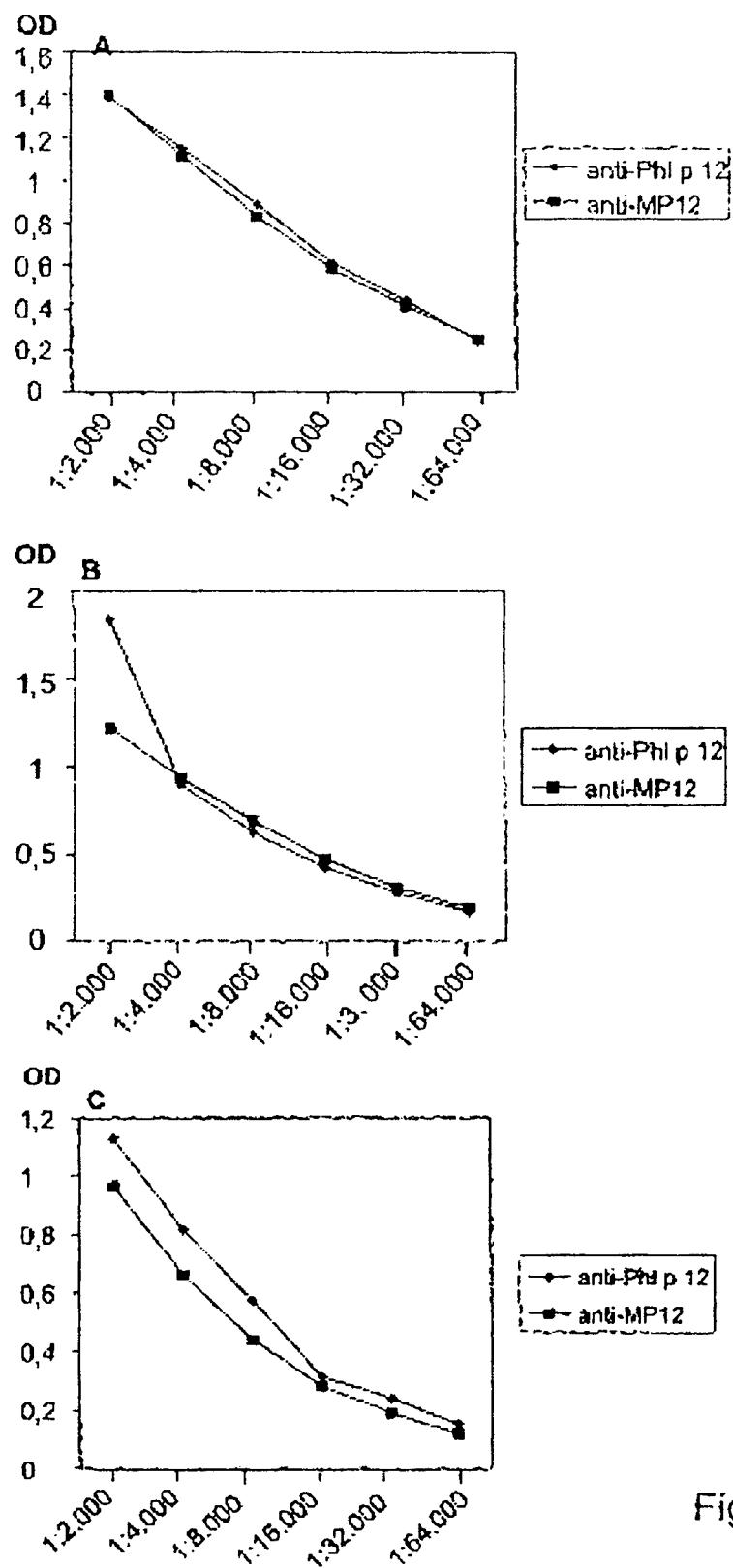


Fig. 6

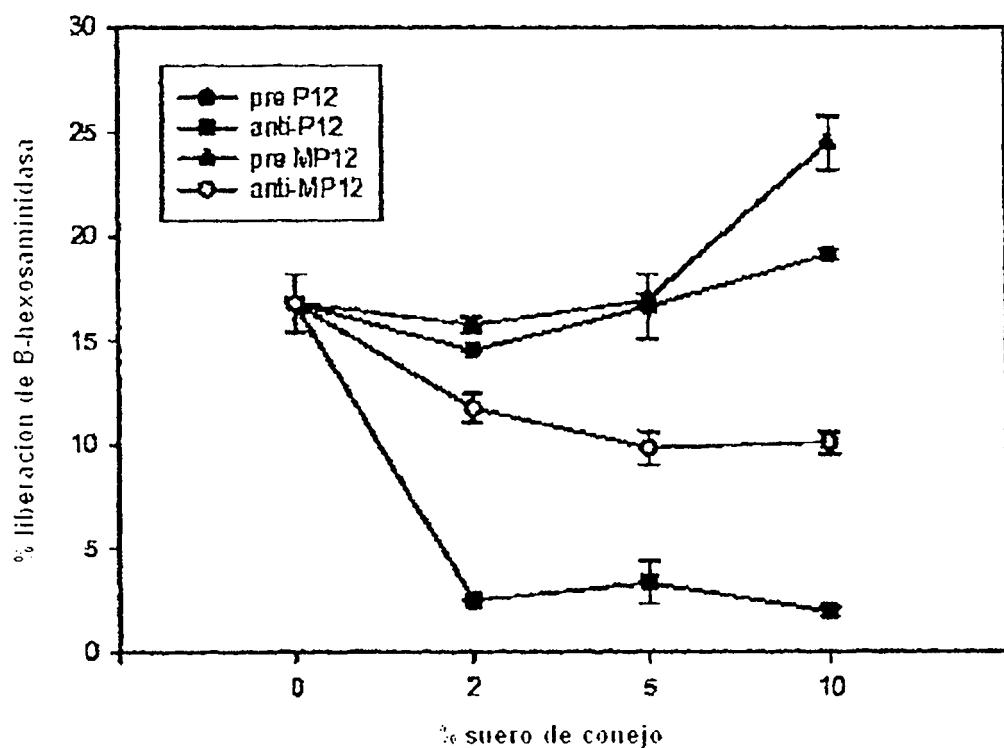


Fig. 7

ES 2 319 218 T3

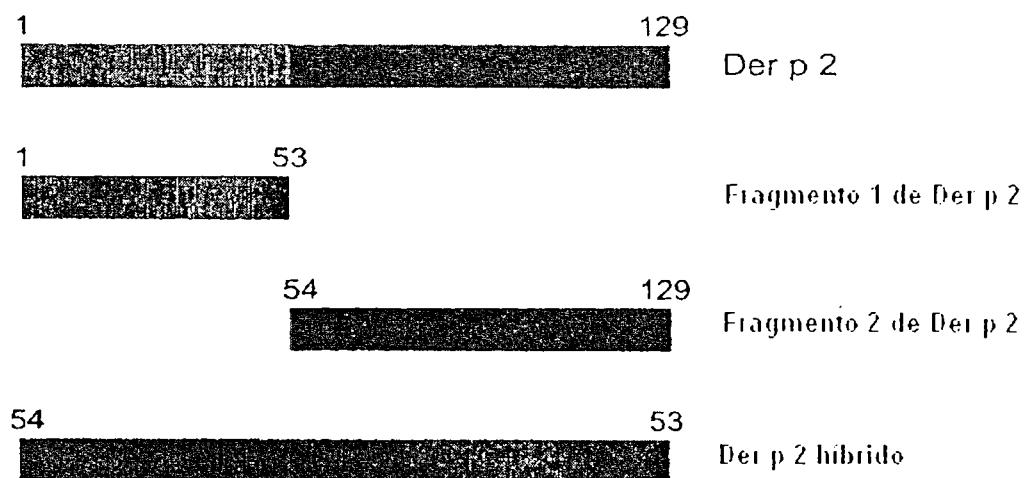


Fig. 8

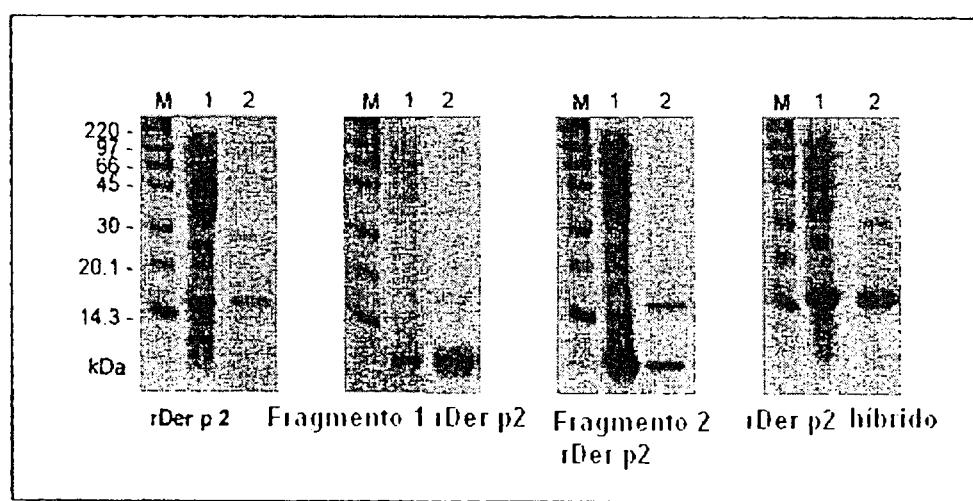


Fig. 9

ES 2 319 218 T3

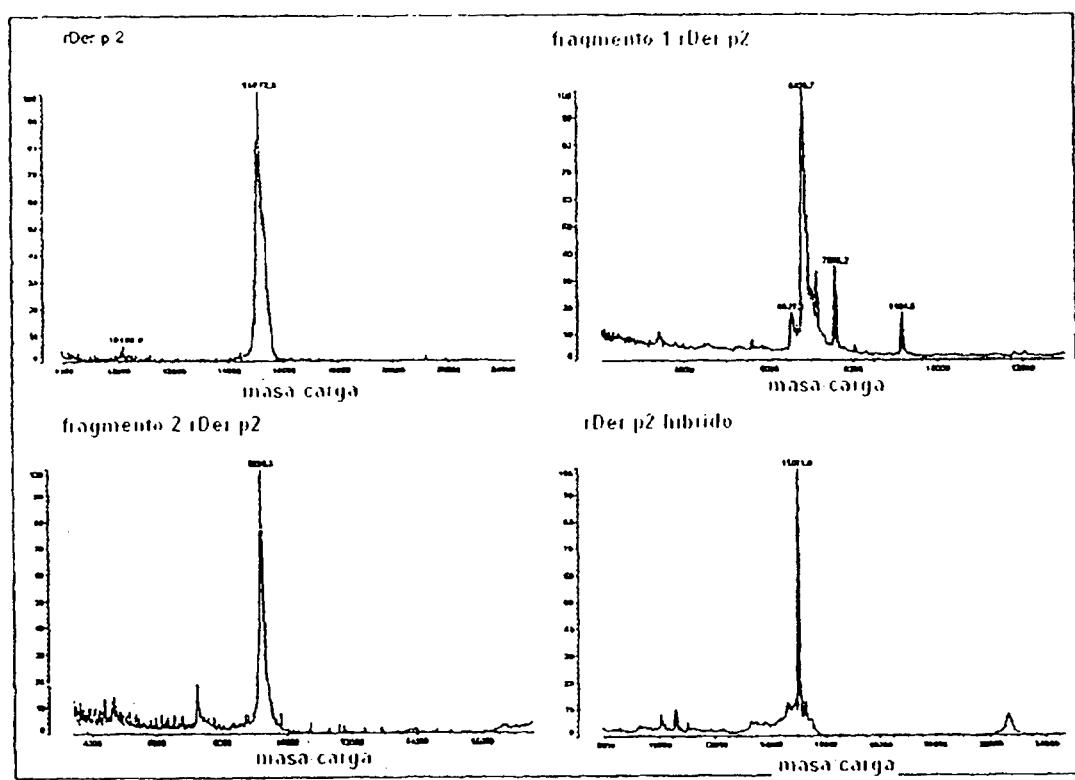


Fig. 10

ES 2 319 218 T3

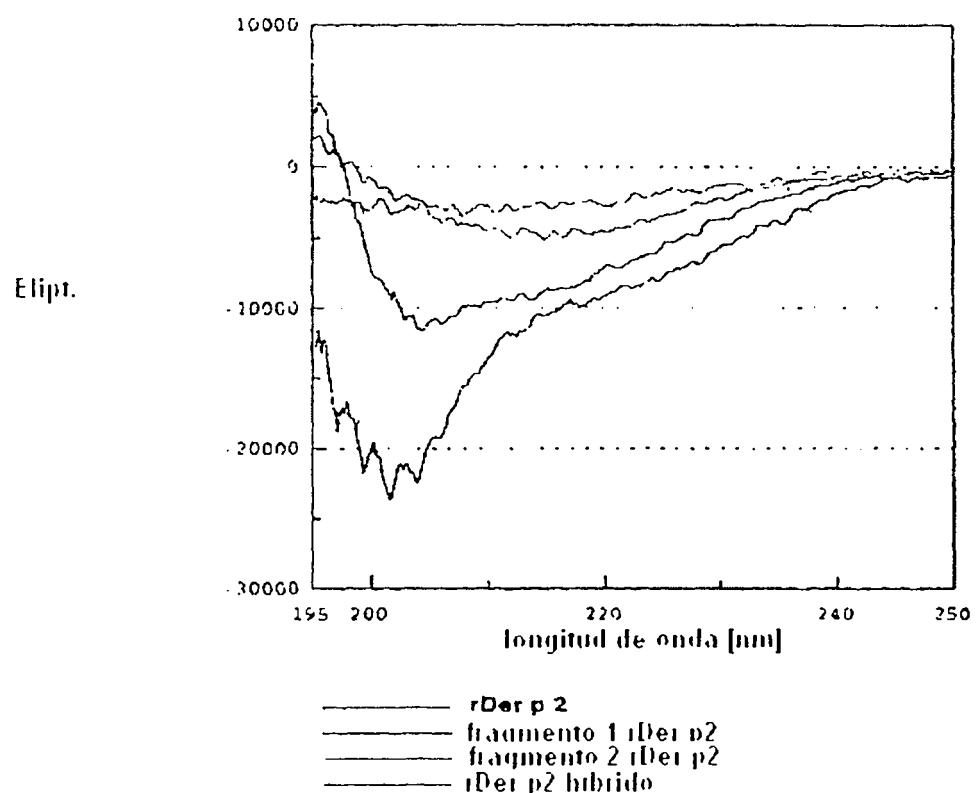


Fig. 11

ES 2 319 218 T3

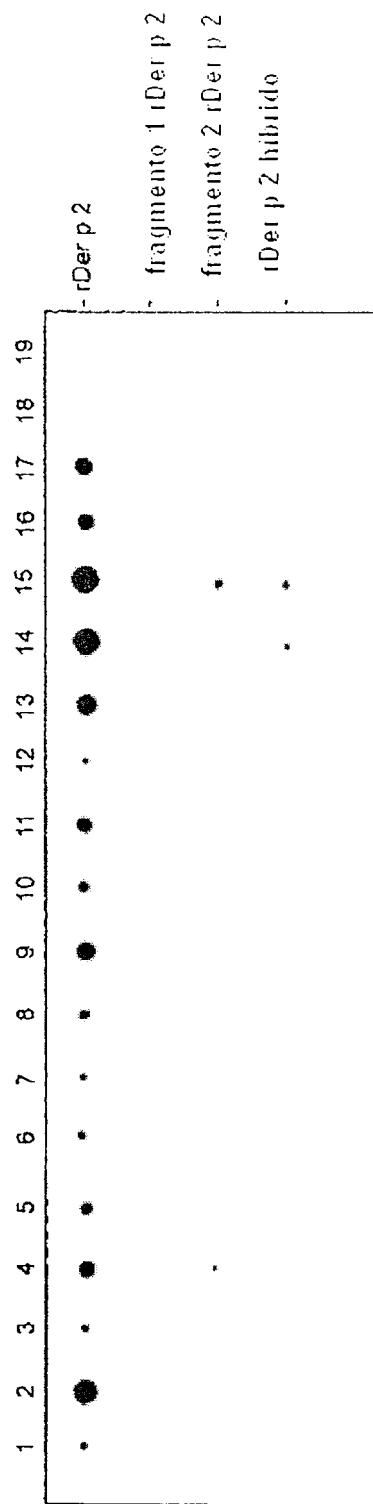


Figura 3

Fig. 12

ES 2 319 218 T3

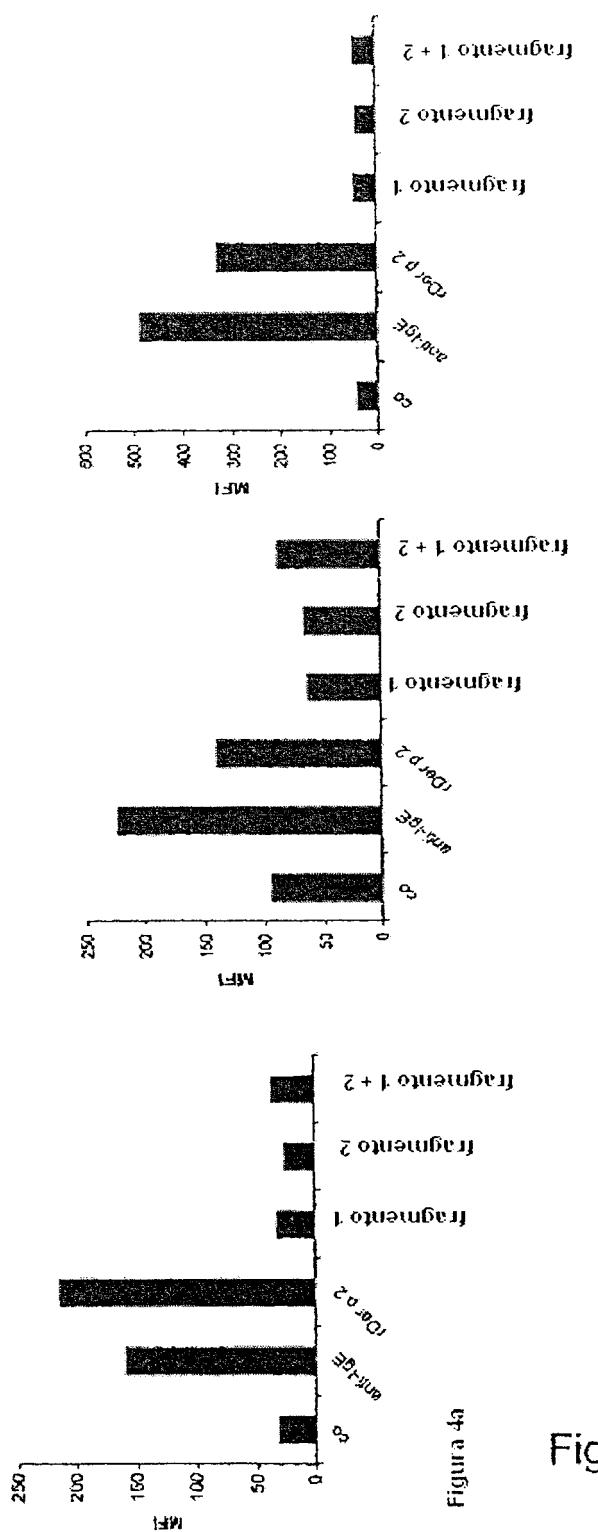


Fig. 13

Figura 4a

ES 2 319 218 T3

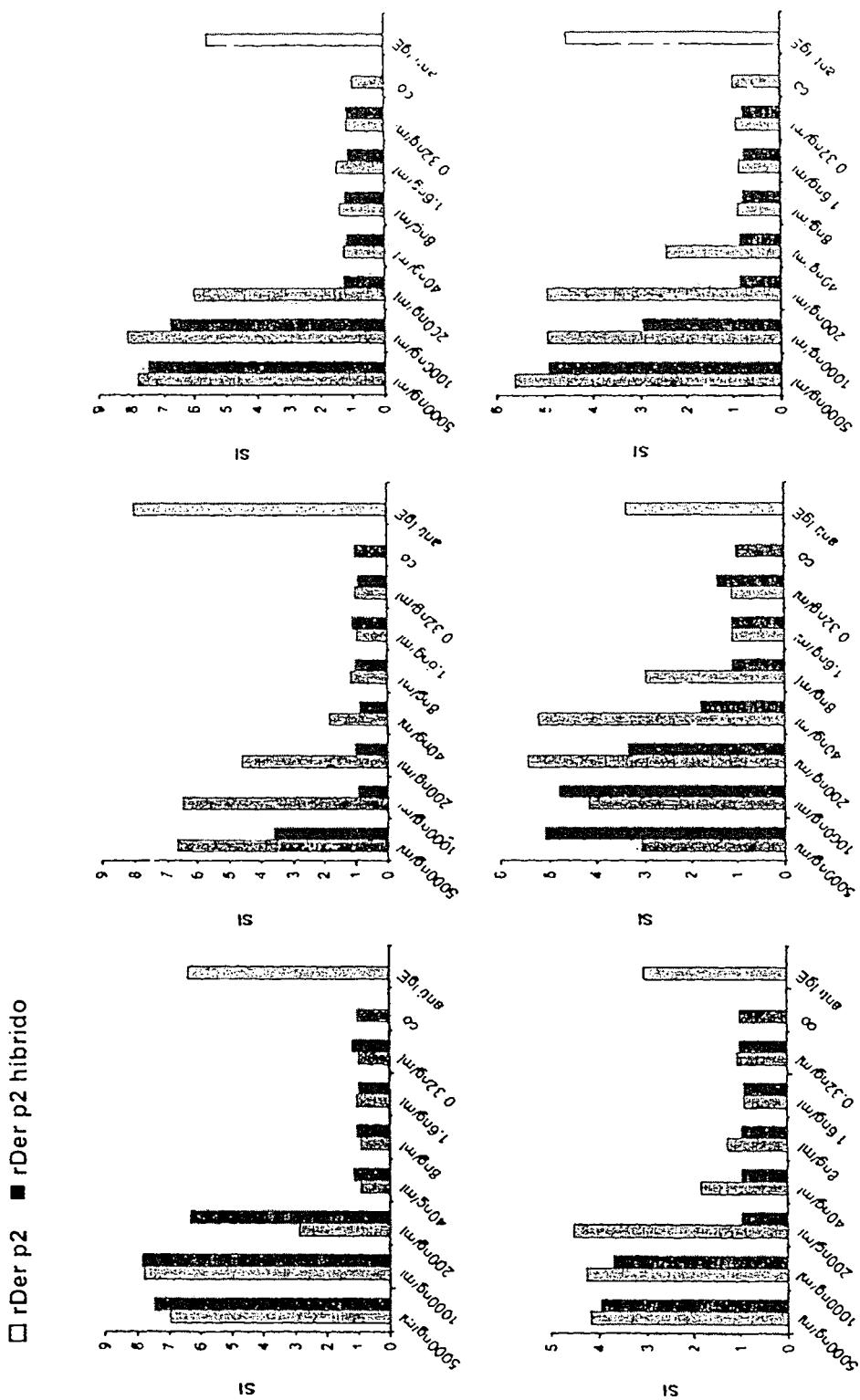


Fig. 4b

Fig. 14

ES 2 319 218 T3

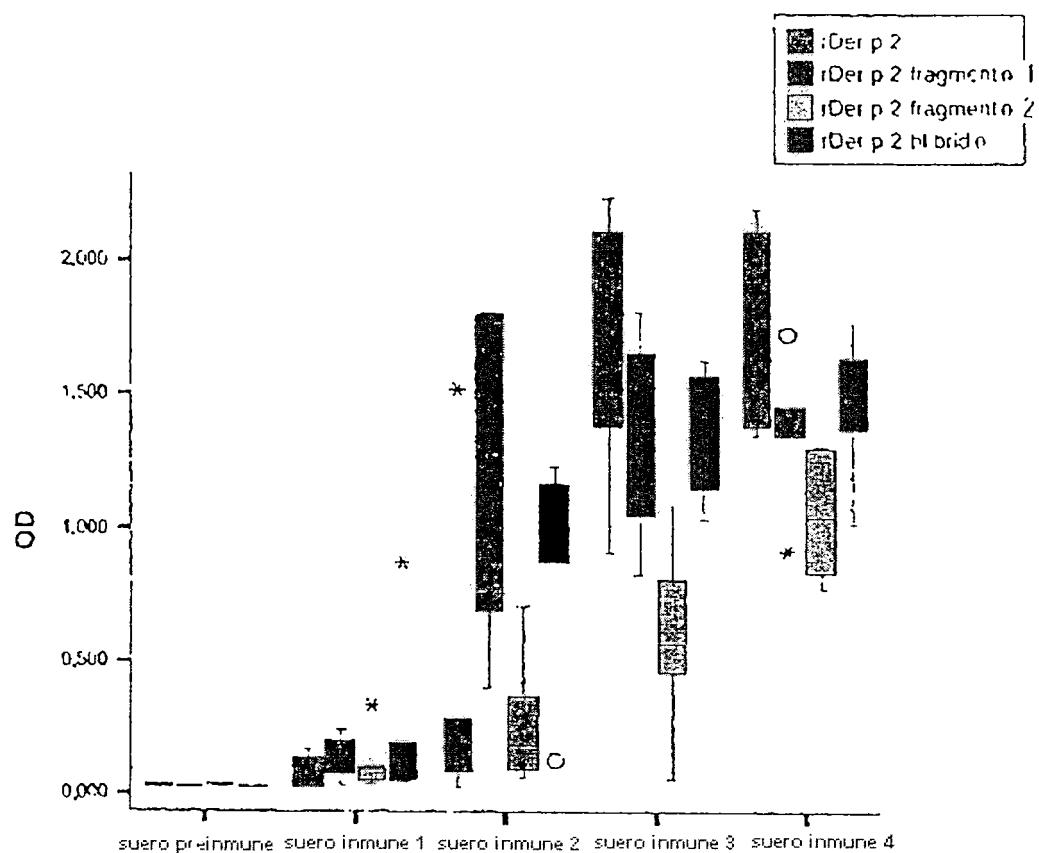


Fig. 15

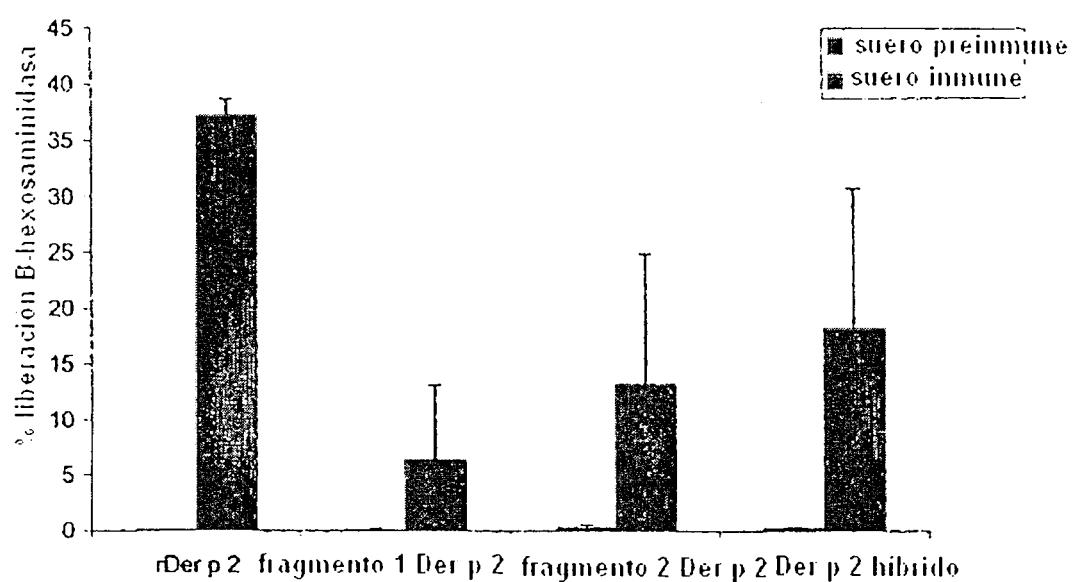


Fig. 16

ES 2 319 218 T3

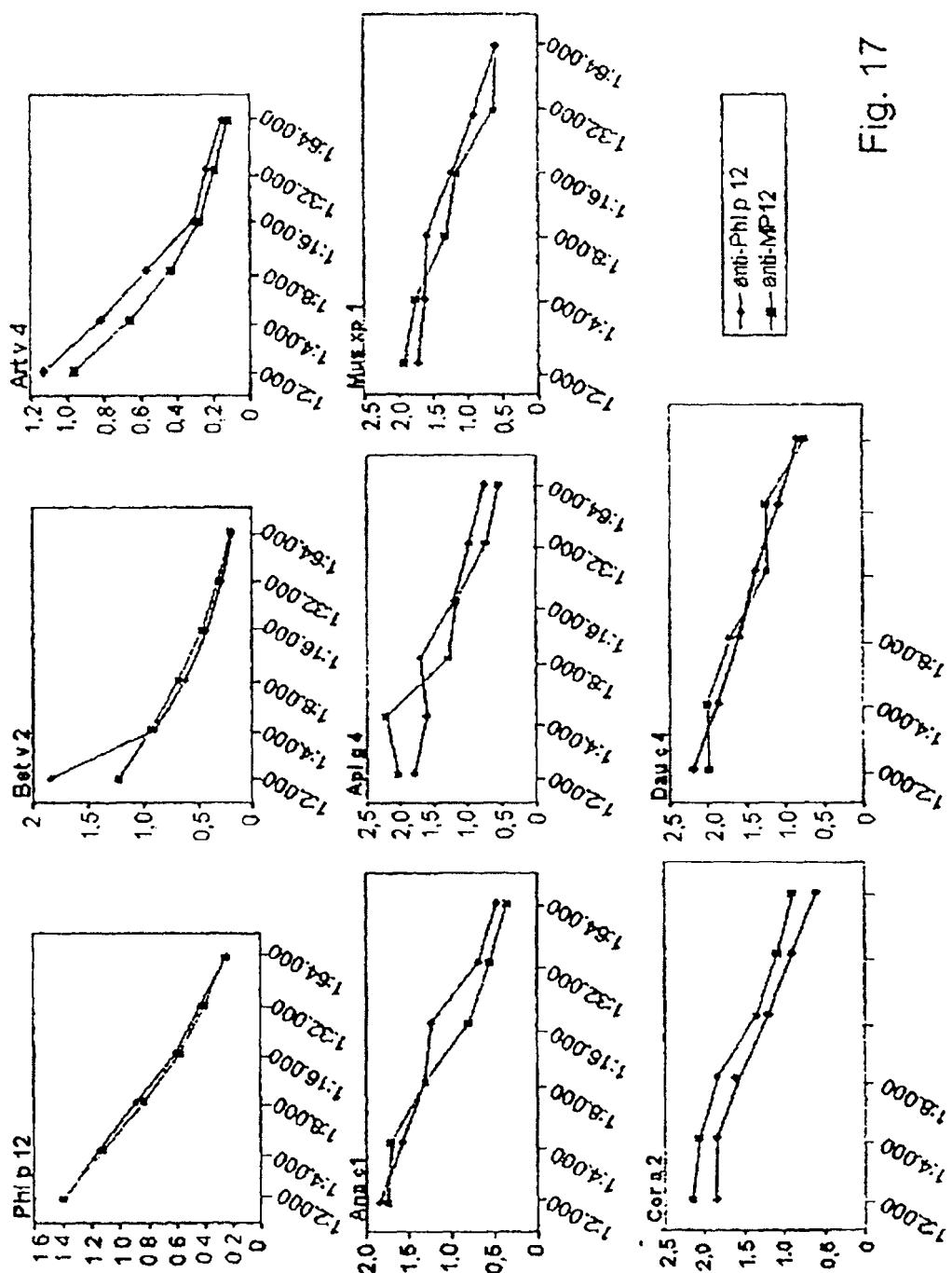


Fig. 17