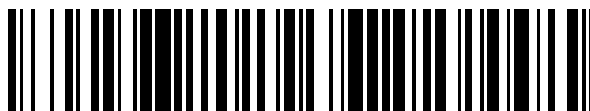


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 705**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2007** **E 07734344 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015** **EP 2007798**

54 Título: **Proteínas quiméricas hipoalergénicas pertenecientes a la familia de transferencia de lípidos de Parietaria judaica para usar en el tratamiento de alergias**

30 Prioridad:

12.04.2006 ES 200600955

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

11.11.2015

73 Titular/es:

BIAL INDUSTRIAL FARMACÉUTICA, S.A.
(100.0%)
Parque Científico y Tecnológico de Bizkaia,
Edificio 401
48170 Zamudio, Bizkaia, ES

72 Inventor/es:

ASTURIAS ORTEGA, JUAN ANDRÉS;
MARTÍNEZ GÁRATE, ALBERTO y
GONZÁLEZ RIOJA, ROBERTO

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 550 705 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas quiméricas hipoalergénicas pertenecientes a la familia de transferencia de lípidos de *Parietaria judaica* para usar en el tratamiento de alergias.

La presente invención se relaciona con el campo de la producción de proteínas quiméricas para la prevención y tratamiento de alergias, particularmente las alergias al polen y las más particularmente alergias causadas por los alergenitos de la familia de proteínas de transferencia de lípidos y más específicamente los que se encuentran en el polen de las especies de *Parietaria*.

Antecedentes de la invención

Las alergias tipo I son un problema de salud importante en los países industrializados. Este tipo de alergia es causada por la formación de anticuerpos IgE contra antígenos transportados por el aire. Estos anticuerpos IgE interactúan con las mastocitos y basófilos, liberando mediadores biológicos tales como histamina, y causando la rinitis alérgica, conjuntivitis y asma bronquial en aproximadamente 20 % de la población [(1)Miyamoto, T. (1992). Increased prevalence of pollen allergy in Japan. In *Advances in Allergology and Clinical Immunology*. P. Godard, J. Bousquet, y F.B. Michel, eds. (Cornforth, UK: The Parthenon Publishing Group), pp. 343-37].

La inmunoterapia específica (SIT) es un tratamiento eficaz para las reacciones alérgicas provocadas por alergenitos específicos y, básicamente, consiste en la modulación de la respuesta inmune en el paciente por la administración regular, aumentando la concentración, de las proteínas que producen la alergia (extractos alérgicos). Las altas dosis de los alergenitos inyectados inducen la alta síntesis de IL-12 por las células presentadoras de antígeno, por ejemplo las células dendríticas, que promueven preferentemente el desarrollo de las células T que son células vírgenes cooperativas (T_H) hacia T_H1 o T_H0 . Esto permite una desviación de la respuesta inmune del tipo de respuesta alérgica relacionada con las células T_H2 hacia una respuesta tipo T_H1/T_H0 que conduce a la producción de altos niveles de IFN- γ [(2) Akdis, C.A. y Blaser, K. (2000). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 55, 522-530]. La desviación inmune se refuerza por la inducción de la tolerancia (anergia para la supresión clonal) de células T_H2 de memoria bajo la influencia de la de las células T reguladoras (T_R1) que producen las citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF-beta [(3) Akdis, C.A., Joss, A., Akdis, M., y Blaser, K. (2001). Mechanism of IL-10 induced cell inactivation in allergic inflammation and normal response to allergens. *Int. Arch Allergy Immunol.* 124; 180-182]. La reducción en la activación y proliferación de las células T_H2 se acompaña por producción reducida de IL-4, y de IgEs por las células B. La reducción en la actividad y la infiltración de las células T_H2 en el moco nasal y bronquial resulta en la síntesis de IL-5 reducida, permitiendo una reducción en la infiltración de eosinófilos que conduce a una gran reducción en la liberación de mediadores inflamatorios, tales como las proteínas MBP y ECP. Los nuevos clones específicos de células T del alergenito fenotipo predominante $T_H>0$ producen una mezcla de citoquinas de los tipos T_H1 y T_H2 que promueven la producción de una gran cantidad de anticuerpos IgG específicos a alergenitos por las células B. Por otra parte, los altos niveles de IL-10 inducen la alta síntesis de anticuerpos IgG4 específicos a alergenitos. Estos dos tipos de anticuerpos específicos pueden actuar como anticuerpos bloqueadores que proporcionan la intersección de los anticuerpos IgE combinados con sus receptores en los mastocitos y por lo tanto inhiben la desgranulación y liberación de histamina [(4) Moverate, R. (2003). Immunological mechanisms of specific immunotherapy with pollen vaccines: implications for diagnostics and the development of improved vaccination strategies. *Expert Rev. Vacc.* 2, 85-97; (5) Wachholz, P.A., Soni, N.K., Till, S., y Durham, S.R., (2003). Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112; 915-922]. Además bloquean la recolección de antígeno mediado por IgE por las células que contienen antígeno, y esto suprime la reacción inmune a los alergenitos.

Los extractos de alergenitos, aislados de fuentes naturales son mezclas complejas de proteínas y otras moléculas. Su composición, y por lo tanto la alergenidad, depende del material usado, que varía de acuerdo con las condiciones ambientales, el estado de maduración en el caso de polen y las condiciones de crecimiento de los ácaros, etc., en el caso de los hongos, etc. Algunos extractos pueden contener incluso una concentración inadecuada de los principales alergenitos y pueden contaminarse con componentes indeseables a los que el paciente no es alérgico, o ambos. La inmunoterapia actual usa extractos de alergenito completo exclusivamente, y esto conduce a una serie de problemas tales como:

- reacciones adversas graves debido a la reactividad de la vacuna con IgE de las células efectoras.
- aparición de nueva sensibilización a otros alergenitos presentes en la vacuna después de la inmunoterapia.
- dificultades en la estandarización de los extractos de alergenitos.

Todo esto significa que la inmunoterapia no es un tratamiento que es tan seguro y eficaz como se desea. Un mejor conocimiento de la patogénesis de la alergia y de los mecanismos de la inmunoterapia específica ha permitido estar más cerca de la solución a los problemas antes mencionados. El conocimiento de la influencia del antígeno mediado por IgE en la respuesta de T_H2 específica a alergenito ha aumentado los esfuerzos para crear alergenitos que no se unen a IgE. El objeto principal de la inmunoterapia específica actual consiste en modificar el alergenito con el fin de inactivar los epítomos de IgE, reduciendo así e incluso eliminando la unión a la IgE y en consecuencia las reacciones adversas [(6) Valenta, R. y Linhart, B. (2005). Molecular design of allergy vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 1-10]. De esta manera, el alergenito modificado se dirigirá hacia las células T por un mecanismo de recolección de antígeno mediada por

pinocitosis/ fagocitosis, previniendo la intersección IgE y la presentación del antígeno dependiente de IgE. Esto induce un equilibrio en la producción de citoquinas T_H0 o T_H1 por las células T, menos producción de IgE y más producción de IgG por las células B; todo esto conducirá a la inducción de la tolerancia de la célula de tipo T_H2 sin riesgo de anafilaxis. Los avances en los métodos recombinantes para obtener los alérgenos y derivados de alérgenos ha permitido un gran aumento de la capacidad para desarrollar nuevas vacunas para el tratamiento de las alergias. Esto ha sido posible debido a la posibilidad de mutar o suprimir aminoácidos significativos de epítomos IgE, así como el fraccionamiento y oligomerización de estos para obtener vacunas hipoalérgicas. Estas moléculas que tienen una menor capacidad de unirse a IgE pero mantienen su reactividad hacia las células T se pueden administrar en dosis mayores, lo que permite una inmunoterapia más rápida y más segura con un número más pequeño de inyecciones. Adicionalmente, los alérgenos recombinantes se pueden producir a gran escala en tanques de fermentación, usando sistemas de expresión microbianos, y la purificación de estos es más eficiente y barata que la de sus equivalentes naturales. El uso de derivados hipoalérgicos en inmunoterapia se ha descrito previamente usando fragmentos de trímeros de Bet v 1 [(7) Niederberger, V., Horak, F., Vrtala, S., Spitzauer, S., Krauth, M.T., Valent, P., Reisinger, J., Pelzmann, M., Hayek, B., Kronqvist, M., Gafvelin, G., Grönlund, H., Purohit, A., Suck, R., Fiebig, H., Cromwell, O., Pauli, G., van Hage-Hamsten, M., y Valenta, R. (2004). Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 14677-14682], multi-allergenic hybrids of bee venom proteins (Api m 1, 2, 3) [(8) Schmid-Grendelmeier, P., Karamloo, F., Müller, U., Housley-Marcovic, Z., Soldatova, L., Zumkehr, J., Kemeny, D.M., Kündig, T., Reimers, A., von Beust, B.R., Salagianni, M., Akdis, M., Kussebi, F., Spangfort, M.D., Blaser, K., y Akdis, C.A. (2005). Prevention of allergy by a recombinant multi-allergen vaccine with reduced IgE binding and preserved T cell epitopes. Eur. J. Immunol. 35, 3268-3276] y fusiones mutadas de Par j 2 y Par j 1 para eliminar su estructura terciaria.

Algunos autores mencionan que las vacunas alérgicas no deben prepararse con hipoalérgenos ya que la unión a IgE podría facilitar la captura y presentación del alérgeno por las células presentadoras de antígeno profesionales, como las células dendríticas y las células de linfocitos B activadas, que expresan receptores de superficie para IgE tanto de alta afinidad como baja afinidad. Este enfoque tiene un significado especial cuando se usa la vía sublingual en la inmunoterapia. La intersección de receptores de alta afinidad puede conducir además a una reducción de la respuesta de las células T hacia los alérgenos [(9) Allam, J.P., Novak, N., Fuchs, C., Asen, S., Berge, S., Appel, T., y otros (2003) Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcεRI expression. J. Allergy Clin. Immunol. 112, 141-8. (10) von Bubnoff, D., Matz, H., Frahnert, C., Rao, M.L., Hanau, D., de la Salle, H., Bieber, T. (2003) FcεRI induces the triptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses. J. Immunol. 169, 1810-1816]. Muchos investigadores todavía están haciendo este tipo de vacuna sin introducir supresiones [(11) Batard, T., Didierlaurent, A., Chabre, H., Mothes, N., Bussières, L., Bohle, B., y otros (2005) Characterization of wild-type recombinant Bet v 1a as a candidate vaccine against birch pollen allergy. Int. Arch. Allergy Immunol. 136, 239-249. (12)utel, M., Jaeger, L., Suck, R., Meyer, H., Fiebig, H., Cromwell, O. (2005) Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. J. Allergy Clin. Immunol. 116, 608-13. (13) Niederberger, V., Horak, F., Vrtala, S., Spitzauer, S., Krauth, M.T., Valent, P., y otros (2004) Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 14677-82. (14) Cromwell, O., Fiebig, H., Suck, R., Kahlert, H., Nandy, A., Kettner, J., y otros (2006) Strategies for recombinant allergen vaccines and fruitful results from first clinical studies. Immunol. Allergy Clin. N. Am. 26, 261-81].

Parietaria es un género de hierba dicotiledónea de la familia *Urticaceae*, y del orden *Urticales*. Varias especies del género *Parietaria* se distribuyen amplia y abundantemente a lo largo de la costa mediterránea [(15) Colombo, P., Duro, G., Costa, M.A., Izzo, V., Mirisola, M., Licorotondo, G., Cocchiara, R., y Geraci, D. (1998). An update on allergens. *Parietaria* pollen allergens. Allergy 53, 917-921]. Las especies más comunes son *P. judaica* y *P. officinalis*, pero otras especies tales como *P. lusitanica*, *P. mauritanica*, y *P. cretica*, pueden tener cierta presencia en algunas regiones. Sin embargo, las regiones mediterráneas no son las únicas donde se puede encontrar el polen de *Parietaria*, ya que su presencia se ha descrito en el Sur de Inglaterra, Austria, las regiones templadas de Europa Central y Oriental Australia y California[(16) Colombo, P., Bonura, A., Costa, M., Izzo, V., Passantino, R., Licorotondo, G., Amoroso, S., y Gerasi, D. (2003). The allergens of *Parietaria*. Int. Arch. Allergy Immunol. 130, 173-179; (17) Carreira, J. y Polo, F. (1995). The allergens of *Olea europaea* and *Parietaria* spp. and their relevance in the Mediterranean Area. Allergy Clin. Immunol. News 7, 79-84]. Una característica significativa de *Parietaria* es el largo período de polinización que tiene una duración de una pluralidad de meses y resulta en la presencia de síntomas casi perennes en los pacientes que son alérgicos a *Parietaria*, que van desde rinoconjuntivitis leve al asma severo. Se debería señalar que la sensibilización mono-específica normal ligera de *Parietaria* implica la sensibilización a varias especies de este género, ya que la reactividad cruzada significativa se ha demostrado entre diferentes especies de *Parietaria*.

Se han presentado varios trabajos sobre la purificación y caracterización de las fracciones alérgicas de las dos especies más comunes que son *P. judaica* y *P. officinalis*. Estas fracciones tienen pesos moleculares en el intervalo de 10-14 kDa y son responsables de prácticamente toda la potencia alérgica de sus extractos [(16) Colombo, P., Bonura, A., Costa, M., Izzo, V., Passantino, R., Licorotondo, G., Amoroso, S., y Gerasi, D. (2003). The allergens of *Parietaria*. Int. Arch. Allergy Immunol. 130, 173-179; (18) Ayuso, R., Carreira, J., Lombardero, M., Duffort, O., Peris, A., Basomba, A., y Polo, F. (1993). Isolation by mAb based affinity chromatography of two Par j isoallergens. Comparison of their physicochemical, immunochemical and allergenic properties. Mol. Immunol. 30, 1347-1354; (19) Polo, F., Ayuso, R., y Carreira, J. (1990). HPLC purification of the main allergen of *Parietaria judaica* pollen. Mol. Immunol. 27, 151-157; (20) Polo, F., Ayuso, R., y Carreira, J. (1991). Studies on the relationship between structure and IgE-binding ability of

- Parietaria judaica allergen I. Mol. Immunol. 28, 169-175]. El desarrollo de la ingeniería genética ha permitido la caracterización molecular, de los alergenios del polen de *Parietaria* que se completan: los dos principales alergenios de polen de *P. judaica* conocidos como Par j 1 y Par j 2 se han clonado y secuenciado [(21) Duro, G., Colombo, P., Costa, M.A., Izzo, V., Porcasi, R., DiFiore, R., Locorotondo, G., Mirisola, M.G., Cocchiara, R., y Geraci, D. (1996). cDNA cloning, sequence analysis and allergological characterization of Par j 2,0101, a new major allergen of the *Parietaria judaica* pollen. FEBS Lett. 399, 295-298; (22) Costa, M.A., Colombo, P., Izzo, V., Kennedy, H., Venturella, S., Cocchiara, R., Mistrello, G., Falagiani, P., y Geraci, D. (1994). cDNA cloning expression and primary structure of Par j. I, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. FEBS Lett. 341, 182-186; (23) Amoresano, A., Pucci, P., Duro, G., Colombo, P., Costa, M.A., Izzo, V., Lambda, D., y Geraci, D. (2003). Assignment of disulphide bridges in Par j 2,0101, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. Biol. Chem. 384, 1165-1172]. Ambos alergenios pertenecen a la familia de las proteínas de transferencia de lípidos no específicas (ns-LTP) y poseen un péptido señal en su región terminal que, después del procesamiento, da lugar a proteínas que tienen un peso molecular de 14.726 y 11, 344 Da, respectivamente, y que tienen aproximadamente 45% de residuos idénticos. Los posibles epítomos lineales de unión a IgE en ambos alergenios, que podrían estar situados en las zonas estructuralmente relacionadas, se han descrito [(24) Asturias, J.A., Gómez-Bayón, N., Eseverri, J.L., y Martínez, A. (2003). Par j 1 and Par j 2, the major allergens from *Parietaria judaica* pollen, have similar immunoglobulin E epitopes. clinical and Experimental Allergy 33, 518-524]. Estas regiones son los objetivos sobre los que se actuará para poder obtener las moléculas hipoalergénicas óptimas para el tratamiento de la alergia al polen de *P. judaica*.
- Los ns-LTP son bien conocidos por su capacidad para completar *in vitro* el intercambio intermembrana y/o la transferencia de lípidos polares [(25) van Ree, R. (2002). Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. Biochem. Soc. Trans 30, 910-913]. Dos familias principales se han caracterizado en plantas, LTP1 con una masa molecular de aproximadamente 9 kDa y LTP2 con una masa molecular de aproximadamente 7 kDa. Los alergenios pertenecientes a la familia LTP se han identificado en plantas distintas de las alimenticias, donde se han estudiado ampliamente. Por lo tanto, Hev b 12 a partir del látex de *Hevea brasiliensis* una proteína básica de 9,3 kDa que demuestra aproximadamente 65 % de identidad de secuencia con LTPs alérgicos de frutas de la familia Rosaceae [(26) Beezhold, D.H., Hickey, V.L., Kostyal, D.A., y otros (2003). Lipid transfer protein from *Hevea brasiliensis* (Hev b 12), a cross-reactive latex protein. Ann Allergy Asthma Immunol 439-445]. Adicionalmente, algunos alergenios de polen se han descritos como LTPs, tales como Art v 3 de *Artemisia vulgaris* [(27) Díaz-Perales, A., Lombardero, M., Sanchez-Monge, R., y otros. (2000). Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities. Clin Exp Allergy 1403-1410] y Ole e 7 de *Olea europaea* [(28) Tejera, M.L., Villalba, M., Batanero, E., y Rodríguez, R. (1999). Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. J. Allergy Clin. Immunol. 797-802; (29) Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., y otros (2002). Allergenic diversity of the olive pollen. Allergy 6-16] que son de 9-10 kDa y tienen 30-55 % de identidad de secuencia con Alérgicos LTPs de los alimentos. Los alergenios principales de *P. judaica*, Par j 1 y Par j 2, que tienen aproximadamente 45% de identidad de secuencia entre sí, por otro lado, tienen pesos moleculares más altos de lo normal en la familia LTP; 14,7 y 11,3 kDa, respectivamente [(16) Colombo, P., Bonura, A., Costa, M., Izzo, V., Passantino, R., Licorotondo, G., Amoroso, S., y Geraci, D. (2003). The allergens of *Parietaria*. Int. Arch. Allergy Immunol. 130, 173-179]. Sin embargo, aunque ambos alergenios tienen una estructura similar a la de los LTPs, tienen niveles moderados de identidad con los LTPs de alimentos en la región de secuencia común (28 % entre Par j 1 y LTP de melocotón).
- WO2005/085278 describe la construcción de una proteína de fusión que comprende los dos alergenios principales de *Parietaria judaica*, en donde la estructura tridimensional de la proteína de fusión se ha interrumpido por la sustitución de ciertos residuos de cisteína en la secuencia primaria de cada alérgico (más específicamente los residuos de cisteína implicados en la formación de puentes disulfuro), de manera que las secuencias de alergenios mantienen esencialmente la misma longitud. De acuerdo con experimentos posteriores, esto debe conducir a una proteína que es 1000 veces menos alérgica que los alergenios naturales.
- Los inventores de la presente invención han descubierto que una reducción sorprendentemente grande en la alergenidad se puede obtener no sólo mediante la interrupción de la estructura tridimensional del alérgico, sino además por la supresión de algunos sitios de unión a IgE (conocidos como epítomos B) y que, lo más sorprendentemente, esto no conduce a una reducción en la inmunogenicidad.
- La presente invención describe por primera vez diferentes proteínas químicas obtenidas por fragmentos de unión de los dos alergenios de *Parietaria judaica* Par j 1 y Par j 2) que contienen un menor número de epítomos de unión a IgE, así como método y productos intermedios diferentes para obtenerlos. No sólo se interrumpe la estructura tridimensional de las proteínas químicas de la presente invención, sino además se han suprimido ciertos epítomos B. Las proteínas químicas de acuerdo con la presente invención pueden ser denominadas hipoalérgicas con una alergenidad reducida por 99,99 %, ya que tienen una menor capacidad para unirse a anticuerpos IgE basado en: i) ELISA *in vitro*, ELISA de inhibición y pruebas de inmunodetección usando mezclas de sueros de pacientes alérgicos a *P. judaica*; ii) pruebas *in vivo* de reactividad cutánea en pacientes alérgicos a *P. judaica*; y iii) prueba de inhibición *in vitro* EAST con sueros individualizados de pacientes alérgicos a *P. judaica*. Las proteínas químicas de acuerdo con la presente invención, por el contrario, mantienen su capacidad inmunogénica, como se demostró mediante ensayos de linfoproliferación en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 13 pacientes alérgicos a *P. judaica*.

- Los extractos alérgicos son mezclas complejas de proteínas y moléculas no proteicas. El creciente uso de técnicas para detectar los niveles de IgE específica contra los componentes de un extracto ha hecho posible demostrar que los pacientes alérgicos por lo general tienen reactividad hacia varios componentes. Los casos de pacientes alérgicos que reaccionan solo a un solo alérgeno son raros. Desde que los extractos alérgicos tienen problemas obvios en la inmunoterapia, una solución es agrupar la mayor cantidad de propiedades terapéuticas como sea posible en una sola molécula.
- Resumen de la invención
- Los presentes inventores han tenido éxito al combinar dos alérgenos en una molécula, teniendo esto no sólo los beneficios desde el punto de vista de la producción industrial y terapia, sino además mostrando la alergenidad significativamente reducida sin ningún cambio en la inmunogenicidad.
- Por estas razones, la presente invención se refiere a proteínas quiméricas (de aquí en adelante denominadas Q2) compuestas de fragmentos de los alérgenos Par j 1 y Par j 2, de las cuales la reactividad alérgica se reduce sin una pérdida de la capacidad inmunogénica, ya que han perdido parte de sus epítopos B de unión a IgE. De este modo, el polipéptido quimérico resultante tiene un peso molecular inferior que la suma de las dos proteínas individuales.
- En un primer aspecto, la invención proporciona una proteína quimérica que comprende secuencias de aminoácidos derivadas de las secuencias que corresponden a los principales alérgenos del polen de *Parietaria judacia* conocidos como Par j 1 y Par j 2, la secuencia de aminoácido de la proteína quimérica que carece de uno o más epítopos para unirse a anticuerpos IgE correspondientes a las secuencias de la cual se deriva, y en donde la proteína no tiene una reducción en la inmunogenicidad, caracterizado porque la proteína comprende la secuencia de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 4.
- En un segundo aspecto, la invención proporciona una proteína quimérica consistente de la secuencia de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 4.
- En un tercer aspecto, la invención proporciona una proteína quimérica como se define por ya sea el primer o segundo aspecto para el uso como un medicamento.
- En un cuarto aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína de acuerdo con ya sea el primer o segundo aspecto.
- En un quinto aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de sec. con núm. de ident.: 3.
- En un sexto aspecto, la invención proporciona un vehículo de expresión microbiana en un organismo huésped transformado, que es auto-replicante y se usa para expresar el polinucleótido del cuarto o quinto aspecto.
- En un séptimo aspecto la invención proporciona un organismo huésped, distinto de un ser humano, transformado con un vehículo de expresión microbiana de acuerdo con el sexto aspecto.
- En un octavo aspecto, la invención proporciona un método para producir un polipéptido que contiene una proteína quimérica de acuerdo con ya sea el primer o segundo aspecto, caracterizado porque comprende el cultivo de un organismo huésped que contiene un vehículo de expresión microbiana que se auto-replica en el organismo antes mencionado y se usa para expresar la proteína quimérica de acuerdo con el primer o segundo aspecto.
- En un noveno aspecto, la invención proporciona un método para purificar la proteína quimérica de acuerdo con cualquier reivindicación del primero o segundo aspecto, que comprende el aislamiento de esta a partir del cultivo, las células o ambos.
- En un décimo aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una proteína de acuerdo con ya sea el primer o segundo aspecto y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Así, la presente invención además se relaciona con la secuencia de nucleótidos que incluye el ADN que codifica el polipéptido quimérico mencionado anteriormente, el sistema de expresión que comprende dicha secuencia acompañado por las secuencias requeridas, para la expresión y control, y la célula receptora transformada por dicho sistema de expresión.
- Esta invención se relaciona además con el uso clínico de este polipéptido quimérico, a la inmunoterapia específica para el tratamiento de alergias, así como a las posibles composiciones en las que se produce este polipéptido quimérico y los diferentes métodos de administración de estos.

Las propiedades hipoalergénicas de las proteínas quiméricas de la presente invención que permiten el uso de estas en la inmunoterapia han sido ampliamente demostradas. Las pruebas inmunológicas llevadas a cabo por los inventores muestran que la quimera Q2 no tiene ningún reconocimiento de la IgE en el suero de pacientes alérgicos a *Parietaria judaica*, como se ilustra en las Figuras 10 y 11. Q2 tiene una capacidad de unión a IgE que es 10.000 veces menor que la de la mezcla de las dos proteínas naturales, como se ilustra en la Figura 12.

Esta data de baja alergenidad se restringió por experimentos in vivo en 30 pacientes mediante una prueba de punzada cutánea. La alergenidad del quimera del comparador Q1 fue 3,5 veces menor que la obtenida con las dos proteínas naturales aisladas (Figura 13). Por otro lado, la alergenidad de Q2, formada por los fragmentos de Par j 1 y Par j 2, que no contienen ninguno de los epítomos B descritos, fue 112 veces menor que la obtenida con las dos proteínas naturales aisladas.

La baja alergenidad (capacidad de unión a IgE) de la quimera Q2 se corroboró mediante la medición de la reactividad de esta molécula con sueros de 30 pacientes alérgicos a *Parietaria judaica* (Figura 14). Esta reducción en la alergenidad se acompañó sorprendentemente por el mantenimiento de la capacidad inmunogénica de la quimera Q2, que no difiere de la de la suma de las proteínas naturales individuales (Figura 16).

El mantenimiento de la inmunogenicidad permitirá a esta quimera que se use como un sustituto para el extracto completo, pero mucho más seguro (menos alergenidad).

Depósito de cepas

La cepa del microorganismo correspondiente a la presente invención se depositó en la colección española de cultivos tipo (CECT) en la Universidad de Valencia (Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100 BURJASOT, Valencia), de acuerdo con el tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los propósitos de procedimientos de patentes, con la siguiente referencia:

- *Escherichia coli* CECT 7141

Depositada el 7 de marzo de 2006.

Descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama de la construcción del quimera del comparador Q1.

La Figura 2 muestra una secuencia de aminoácidos y nucleótidos de Q1. Los residuos correspondientes a la cola de afinidad del vector pQE-32 están subrayados. Los residuos introducidos por la sección de EcoRI (EF) están sombreados. Los residuos de cisteína tienen doble subrayado.

La Figura 3 muestra una comparación de los epítomos de IgE de Par j 1 y Par j 2 (cajas) y el epítomo T (subrayado), indicando los epítomos Q2 suprimidos en cajas de rayado grueso. Los residuos idénticos (:) y residuos similares (.) han sido marcados.

La Figura 4 es un diagrama constructivo de Q2.

La Figura 5 muestra una secuencia de aminoácidos y nucleótidos de Q2. Los residuos correspondientes a la cola de afinidad del vector pQE-32 están subrayados. Los residuos introducidos por la sección EcoRI (EF) PstI (LQ), y EcorRV (DI) están sombreados. Los residuos de cisteína tienen doble subrayado.

La Figura 6 muestra una comparación de los epítomos de IgE de Par j 1 y Par j 2 (cajas) y el epítomo T (subrayado), indicando los epítomos suprimidos de Q3 en cajas de doble rayado. Los residuos idénticos (:) y residuos similares (.) han sido marcados.

La Figura 7 es un diagrama de construcción del quimera del comparador Q3.

La Figura 8 muestra una secuencia de aminoácidos y nucleótidos de Q3. Los residuos correspondientes a la cola de afinidad del vector pQE-32 están subrayados. Los residuos introducidos por la sección EcoRI (EF) PstI (LQ), y EcorRV (DI), BglII (RS), y KpnI (GT) están sombreados. Los residuos de cisteína tienen doble subrayado.

La Figura 9 muestra la tinción por azul de Coomassie de un gel de poliacrilamida después de la electroforesis: Q1 (carril 1), Q2 (carril 2), Q3 (carril 3).

La Figura 10 muestra los resultados de un análisis de diroísmo circular de las proteínas purificadas nPar j 1-nPar j 2, Q1, Q2, y Q3.

La Figura 11 muestra la inmunodetección con anticuerpos IgE de una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *P. judaica* que comprende: nPar j 1-nPar j 2 (carril 1), rPar j 1 (carril 2), rPar j 2 (carril 3), Q1 (carril 4), Q2 (carril 5), Q3 (carril 6).

5 La Figura 12 muestra una unión de anticuerpos IgE a Q1, Q2 y Q3 usando 15 sueros de pacientes alérgicos a *P. judaica* (dilución 1/10). Los valores de tres experimentos se muestran con sus desviaciones.

10 La Figura 13 muestra un resultado de la prueba ELISA de inhibición usando extracto de *P. judaica* en la fase sólida y nPar j 1-Par j 2, Q1, Q2, y Q3 como inhibidores usando una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *P. judaica*. Cada valor corresponde a la media de tres experimentos con una desviación estándar de menos de 10 %.

La Figura 14 muestra el resultado de las pruebas cutáneas llevadas a cabo con extracto de *P. judaica*, nPar j 1-Par j 2 y Q1 (50 µg/ml), y Q3 (250 µg/ml). El valor que se muestra es el área del parche en mm².

15 La Figura 15 muestra la determinación de IgE específica llevada a cabo con extracto de *P. judaica*, nPar j 1-Par j 2, y Q1 (50 µg/ml), y Q2 y Q3 (250 µg/ml).

20 La Figura 16 muestra una determinación de la concentración óptima para estudiar la proliferación de linfocitos T en pacientes alérgicos a *P. judaica*. Índice de Estimulación (IE).

La Figura 17 muestra la proliferación de linfocitos T obtenidos con extracto de *P. judaica* y 0,5µg/ml de las tres proteínas químicas y las formas natural y recombinante de Par j 1 y Par j 2. El valor que se muestra es el del índice de estimulación (%). Sin diferencia significativa (ns).

25 Descripción detallada

Se proporciona en la presente descripción una proteína química o péptido de baja alergenidad obtenido por la supresión de cualquier epítipo B o epítipo de unión a IgE o síntesis sin cualquier epítipo B o de unión a IgE. La supresión se aplicará preferentemente a los epítipos B en las posiciones 28 a 53 de Par j 1 y Par j 2.

30 El término "baja alergenidad", y variantes similares como se usa en la presente descripción es un término relativo y se relaciona con la capacidad in vivo e in vitro reducida de las proteínas de la invención a estimular una respuesta alérgica cuando se compara con la misma capacidad de los inmunógenos silvestres.

35 La proteína química comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 4 con la máxima preferencia la proteína química consiste de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 4.

40 En la presente se describen además proteínas químicas que comprenden adicionalmente una secuencia homóloga a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 2, 4 o 6. Preferentemente, la secuencia homóloga tiene una homología de al menos 70 %, con mayor preferencia al menos 80 %, aun con mayor preferencia al menos 90 %, con la máxima preferencia 100 %, a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 2, 4 o 6, con la máxima preferencia a la secuencia de aminoácidos se muestra en la sec. con núm. de ident.:4.

45 En la presente se describen además proteínas químicas o péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos con al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, con la máxima preferencia 100 %, de homología a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 2, 4 o 6.

50 La proteína química puede comprender además una secuencia de péptido que facilita su purificación. Tales péptidos son conocidos comúnmente en la técnica, por ejemplo una cola de polihistidina.

55 Los fragmentos que constituyen las proteínas químicas se pueden sintetizar por una persona entrenada cualificada siguiendo un esquema conocido para la amplificación en la cadena de la polimerasa (PCR). Dichos fragmentos, después que se digieren por las enzimas de restricción apropiadas, se pueden integrar mediante ligación a un vector de expresión. Este vector de expresión (como el vector pQE32 comercial) puede tener la capacidad para fusionar la proteína química con las secuencias que ayudan a la purificación tales como una serie de histidinas posicionadas en el extremo amino terminal. Durante la construcción de las proteínas químicas, los diferentes fragmentos de ADN se unen por enlazadores formados por secuencias reconocidas por diferentes enzimas de restricción, y los residuos que no existían en la secuencia original del alérgeno natural, por lo tanto, aparecen en la molécula química final. Estos nuevos residuos, lo que no interfieren en la lectura correcta de la proteína, se han marcado en las secuencias en la
60 Figura 2, 5, y 8, y se describen adecuadamente en los ejemplos pertinentes. Del mismo modo, las quimeras tienen 14 residuos en la zona amino-terminal que no están presentes en la secuencia original y corresponderían a la región rica en histidina que permite la purificación rápida por la interacción con metales divalentes unidos a soportes sólidos.

Preferentemente un polinucleótido de la invención comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.:3.

5 El polinucleótido puede comprender alternativa o adicionalmente una secuencia homóloga a la secuencia de nucleótidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.:3. Preferentemente, la secuencia homóloga tiene una homología de al menos 70 %, con mayor preferencia al menos 80 %, aun con mayor preferencia al menos 90 %, con la máxima preferencia 95 %, a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident. 3.

10 Otra modalidad preferida incluye un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos con al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, con la máxima preferencia 100 %, de homología con la secuencia de nucleótidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.:3.

15 El polinucleótido puede comprender además una secuencia que codifica un péptido señal. El péptido señal es una secuencia de aminoácidos que inicia el transporte de una proteína a través de la membrana del retículo endoplásmico. Los péptidos señales adecuados serán conocidos por un experto en el campo de la invención.

20 De acuerdo con otros aspectos de la presente invención, se proporciona un sistema de expresión que comprende una secuencia de polinucleótidos de la invención, y una célula huésped transformada por dicho sistema de expresión capaz de expresar una proteína o péptido de la invención.

La invención comprende además animales transgénicos capaces de producir una proteína de la invención, por ejemplo en su leche o en la clara de sus huevos.

25 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una proteína de la invención para el uso en el tratamiento de un trastorno inmunológico, particularmente un trastorno de hipersensibilidad tales como alergia.

30 En la presente se describe además el uso de una proteína de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inmunológico, particularmente un trastorno de hipersensibilidad tal como alergia. Preferentemente, el medicamento es una vacuna.

Preferentemente, el trastorno de hipersensibilidad es una alergia al polen de *Parietaria*, con mayor preferencia polen de *Parietaria judaica*.

35 Como se usa en la presente, el término tratamiento y las variaciones tales como "trata" o "tratar" se refieren a cualquier régimen que puede beneficiar a un ser humano o animal no humano. El tratamiento puede ser con respecto a una afección existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). El tratamiento puede incluir efectos curativos, alivio o profilácticos. Preferentemente, el tratamiento es el tratamiento profiláctico.

40 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una proteína de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la composición farmacéutica es una composición de vacuna.

45 Además, en la presente se describe un método para tratar un trastorno inmunológico, particularmente un trastorno de hipersensibilidad tal como alergia, dicho método que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una proteína o péptido de la invención a un sujeto que lo necesita.

50 La selección de la administración y formas de dosificación adecuadas para un paciente individual resultarán evidentes para aquellos con experiencia en la técnica.

La presente invención cubre el uso de las quimeras de acuerdo con la presente invención, preferentemente la quimera Q2 para los tratamientos de desensibilización en mamíferos. Los métodos de desensibilización implican la administración repetida por vía parenteral (subcutánea, intravenosa o intramuscular) u oral, nasal o rectal del alérgeno en cuestión. Estos (poli) péptidos se pueden administrar solos o en conjunto con otros diluyentes, de acuerdo con la legislación vigente y los procedimientos galénicos de uso.

55 Las proteínas quiméricas Q2 (de acuerdo con la invención) y Q3 (un comparador) descritas son hipoalergénicas, ya que, como se muestra en las Figuras 10, 11, 12 y 14, tienen menor reactividad con el suero de pacientes alérgicos a *P. judaica* que el extracto completo o las proteínas naturales combinadas, y, por otra parte, esta hipoalergenidad se encuentra además en pruebas cutáneas *in vivo* (Figura. 13).

60 Las moléculas quiméricas Q1 (un comparador) y Q2 (de acuerdo con la invención) tienen además una capacidad inmunogénica similar a la de las proteínas naturales combinadas (Figura 16). Ambas características (hipoalergenidad e inmunogenicidad) hacen la quimera Q2 un candidato excelente para el tratamiento preventivo y curativo de la alergia

al polen de *P. judaica* que se puede manifestar como rinitis, conjuntivitis, asma, urticaria, angioedema, eccema, dermatitis, o incluso choque anafiláctico.

Las características inmunológicas de la proteína quimérica de acuerdo con la presente invención se describirán de aquí en adelante. La Figura 10 muestra una prueba de inmunodetección que indica que las quimeras Q2, de acuerdo con la invención, y Q3, un comparador, (carriles 5 y 6) tienen una capacidad de unión a IgE reducida en gran medida en pacientes alérgicos cuando se compara con la reactividad de las dos proteínas naturales (carril 1), las proteínas recombinantes aisladas (carriles 2 y 3) o la quimera (carril 4), que muestra la fusión recombinante de las dos proteínas que están completas, pero contienen todos sus epítopos B. Esto debe indicar que la ausencia de los epítopos B incluidos entre los residuos 29 y 52 (quimera Q2) contribuye a la reducción de la alergenicidad. Se obtuvo resultado similar cuando se investigó la reactividad de 15 sueros diferentes hacia las proteínas quiméricas (Figura 11). Las proteínas quiméricas Q2, de acuerdo con la invención, y Q3, un comparador, tienen mucho menor reactividad que la observada para Q1, un comparador, que es la unión de los dos alérgenos completos (Par j 1-Par j 2). Esta reducción de la alergenicidad se cuantificó por ELISA de inhibición con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *P. judaica* (Figura 12). Se requirió 10.000 veces más proteína Q2 para alcanzar el 60 % de inhibición del extracto de la mezcla de las dos proteínas naturales. Por tanto, se podría inferir que fue 10.000 veces menos alergénico que las proteínas naturales y aproximadamente 20 veces menos alergénico que la proteína quimérica Q1, un comparador.

Una medición más directa de la hipoalergenicidad de la quimera Q2 se obtuvo por medición directa de la reactividad cutánea en 30 pacientes alérgicos al polen de *P. judaica*. Los datos dados en la Figura 13 muestran que la quimera Q2 tuvo una marcada reducción en la reactividad cutánea. Una comparación de los descriptivos de cada distribución muestra que la quimera Q2 tiene un tamaño medio de parches 112 veces menor que el observado para las dos proteínas naturales, y esto indica una reducción en la actividad alergénica por más de 99 %.

La baja capacidad de unión de IgE con la proteína quimérica Q2 se demostró además con el suero a partir de otros 30 pacientes alérgicos a *P. judaica* medido por EAST (Figura 14). En todos los pacientes, la unión a IgE se redujo considerablemente en el quimera Q2 en comparación con la mezcla de proteínas naturales.

Esta gran reducción en la capacidad de unión a IgE y por lo tanto en la capacidad de desencadenar reacciones adversas debido a la supresión de epítopos B se acompañó por el mantenimiento de la capacidad inmunogénica. El proteína Q2 demostró un índice de linfoproliferación que fue similar al inducido por el extracto natural y la mezcla de las dos proteínas naturales puras combinadas, como se muestra en la Figura 16. Todo esto muestra que la proteína quimérica Q2 construida con fragmentos de Par j 1 y Par j 2 contuvo un menor número de epítopos de IgE pero mantuvo suficientes epítopos T para inducir una respuesta inmune protectora.

La invención se comprenderá mejor por medio de los siguientes ejemplos que se refieren a las etapas experimentales en la preparación de la invención y la demostración de sus cualidades. Estos ejemplos son ejemplos meramente ilustrativos y no limitan la invención.

EJEMPLO 1: Construcción de las fusiones del polipéptido del comparador Q1, proteína quimérica de la invención Q2, y polipéptido del comparador Q3.

Las proteínas quiméricas se construyeron mediante amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) usando, como una matriz, los plásmidos que contienen las secuencias que codifican Par j 1,0103 y Par j 2,0101 descritas en González-Rioja y otras, "Expression and purification of the recombinant allergens Par j 1 and Par j 2" XXIII Congreso EAACI, Abstracts Book (2004), 181-182 y los desencadenantes específicos en cada caso. Los desencadenantes se componen de la zona de hibridación, de varios sitios de sección para diferentes endonucleasas restrictivas (subrayado), y de algunos nucleótidos de anclaje. La reacción de amplificación inducida por PCR tuvo los siguientes componentes en un volumen de reacción de 50 µl: tampón de amplificación x10, 5µl; 200 µM de dNTPs; 100 pmoles de cada oligonucleótido desencadenante; 2,5 unidades de polimerasa Taq (ADN polimerasa Pfx, Invitrogen); 1 ng de ADN matriz y agua destilada estéril hasta 50 µl. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador RoboCycler (Stratagene) bajo condiciones específicas que se describirán en cada caso. El producto de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa (2%) y la banda de interés se aisló a partir del gel usando Geneclean (Bio101), usando el método descrito por el fabricante. Los fragmentos aislados se digirieron por las enzimas restrictivas adecuadas y ligaron con el vector pBluescript digerido por las mismas enzimas. La mezcla de ligación se usó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α (obtenible a partir de Invitrogen, Paisley, GB). Las colonias resultantes se cultivaron para aislar su ADN de plásmido, que se digirió por las enzimas adecuadas para liberar el fragmento de interés. Se seleccionaron los clones positivos para la secuenciación de estos. La secuenciación del ADN insertado en el pBluescript se llevó a cabo por el método de Sanger [(30) Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-5880] modificado para el uso con didesoxinucleótidos fluorescentes y amplificación en un termociclador usando el Estuche de Secuenciación con Ciclo de Terminación Didesoxi de Reacción Lista PRISM (Perkin Elmer), siguiendo las instrucciones del fabricante.

A) Proteína del comparador quimérica Q1

En este caso, las secuencias completas de ambas proteínas (Par j 1 y Par j 2) deben estar fusionadas para obtener una proteína que tiene la estructura terciaria desestabilizada pero con todos sus epítomos de IgE secuenciales completos. Para obtener la construcción conocida como Q1, se usaron como matrices los ADNc de Par j 1 y Par j 2 clonados en el vector pKS-Bluescript. Para fusionar las dos secuencias, fue necesario disponer de un enlazador, en este caso el objetivo EcoRI, tanto en el extremo C-terminal de la secuencia de Par j 1 como en el extremo N-terminal de Par j 2, para permitir la posterior ligación de los fragmentos. Dicho objetivo se añadió al correspondiente, oligonucleótido sintético (F1R1 y F1F2), y se incorporó en el fragmento amplificado en el proceso de PCR. Oligonucleótidos sintéticos usados

- 10 • Fragmento 1: F1F1, CG GGATCC TGCAAGAAACCTGCGG (*Bam*HI) y F1R1, CG GAATTC GGCTTTTCCGGTGCGG (*Eco*RI). Condiciones: 94°C, 4 min (1 ciclo); 94°C, 30 s - 53°C, 30 s - 72°C, 90 s (5 ciclos); 94°C, 30 s - 60°C, 30 s - 72°C, 90 s (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo).
- 15 • Fragmento 2: F1F2, CG GAATTC GAGGAGGCTTGCGGGA (*Eco*RI) y F1R2, CG AAGCTT CTAATAGTAACCTCTGA (*Hind*III). Condiciones: 94°C, 4 min (1 ciclo); 94°C, 30 s - 51°C 30 s - 72°C, 90 s (5 ciclos); 94°C, 30 s - 59°C, 30 s - 72°C, 90 s (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo).

20 Dos productos de PCR correspondientes a Par j 1 y Par j 2, respectivamente, se crearon. Para el primero de ellos (Par j 1), los oligonucleótidos sintéticos F1F1 y F1R1 se usaron para los extremos N y C terminal, respectivamente, siendo obtenido un tamaño de aproximadamente 420 pares de bases (pb). El fragmento amplificado se clonó en el vector pKS-Bluescript y se confirmó su secuencia. Para el segundo fragmento correspondiente a Par j 2, se empleó el mismo procedimiento usando los oligonucleótidos F1F2 y F1R2 para los extremos N y C terminal respectivamente. En esta ocasión, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 300 pb, que se clonó en el vector pKS-Bluescript y de los cuales se confirmó la secuencia. Este segundo fragmento se unió a la primera por la ligación a través del objetivo EcoRI, Par j 25 1 remanente en el extremo N-terminal y Par j 2 en el extremo C-terminal, y el fragmento resultante se subclonó posteriormente en el vector de expresión comercial pQE-32 (Qiagen), que contiene una secuencia extra de 13 aminoácidos en el extremo N-terminal, correspondiente a la cola de afinidad (Figura. 2). Dicha secuencia codificó para un polipéptido que tiene 256 aminoácidos y un peso molecular aparente de 28070 Da.

30 B) Proteína quimérica Q2 de la invención

Al obtener esta quimera, el fragmento de ambas proteínas debía estar unido pero sin incluir ninguno de los epítomos de IgE secuenciales descritos [(18) Asturias, J.A, Gómez-Bayón, N., Eserverri, J.L., y Martinez, A. (2003). Par j 1 and Par j 2, the major allergens from *Parietaria judaica* polen, have similar immunoglobulin E epitopes. *Clinical and Experimental Allergy* 33, 518-524]. Algunos oligonucleótidos sintéticos que comprenden los siguientes fragmentos se diseñaron: Par j 35 1 (fragmentos de los residuos 1 a 28 y 53 a 139) y Par j 2 (fragmentos de los residuos 1 a 28 y 53 a 103) (Figura 3 y 4). Parte de la secuencia que contiene los epítomos de IgE se eliminó de esta manera.

40 Cuatro fragmentos (dos de cada alérgeno) se amplificaron para esta construcción y el ADNc de Par j 1 y Par j 2 clonado en el vector pKS Bluescript se usó como la matriz. El mecanismo de construcción de la nueva proteína es el uso de enzimas restrictivas (*Pst*I, *Eco*Ri y *Eco*RV en este caso) para la unión secuencial de los fragmentos amplificados diferentes.

Oligonucleótidos sintéticos usados

- 45 • Fragmento 1: F1F1, CG GGATCC TGCAAGAAACCTGCGG (*Bam*HI) y F2R1, CG CTGCAG CCCCTTTGACGGCTCTT (*Pst*I). Condiciones min (1 ciclo); 94°C, 30 s - 54°C, 30 s - 72°C, 90 s (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo).
- Fragmento 2: F2F2, CG CTGCAG ATCCAGACCGCCATGAA (*Pst*I) y F2R2, CG GAATTC GGCTTTTCCGGTGCGGG (*Eco*RI).
- 50 • Fragmento 3: F2F3, CG GAATTC GAGGAGGCTTGCGGGAA (*Eco*RI) y F2R3, CG GATATC CTCCTTCGACGGCTCCTT (*Eco*RV).
- Fragmento 4: F2F4, CG GATATC ATAGTGC GCGCCACGAA (*Eco*RV) y F1R2, CG AAGCTT CTAATAGTAACCTCTGA (*Hind*III). Las condiciones de los tres fragmentos fueron: 94°C, 4 min (1 ciclo); 94°C, 30 s - 54°C, 30 s - 72°C, 90 s (5 ciclos); 94°C, 30 s - 62°C, 30 s - 72°C, 90 s (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo).

55 Para el primero de estos, correspondiente a Par j 1 (fragmento 1), los oligonucleótidos sintéticos F1F1 y F2R1 se usaron para los extremos N y C terminal respectivamente, siendo obtenido un tamaño de aproximadamente 90 pares de bases y clonado en el vector pKS-Bluescript. Para el segundo fragmento correspondiente a Par j 1, el mismo procedimiento se llevó a cabo usando los oligonucleótidos F2F2 y F2R2 para los extremos N y C terminal respectivamente. En esta ocasión, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 260 pb y se clonó en el vector pKS-Bluescript. Este último 60 fragmento se unió al primero por ligación a través del enlazador del objetivo llevado por *Pst*I y se confirmó su secuencia.

Con respecto a los dos fragmentos amplificados a partir de la secuencia de Par j 2 (fragmentos 3 y 4, se siguió el procedimiento descrito para los fragmentos 1 y 2. Los oligonucleótidos F2F3/F2R3 y F2F4/F1R4 para los extremos N y C terminal respectivamente se usaron para la amplificación de esta, siendo el tamaño de los productos de PCR

aproximadamente 90 y 150 pb para los fragmentos 3 y 4. El fragmento 4 se unió al fragmento 3 por ligación a través del enlazador del objetivo llevado por EcoRV y se confirmó la secuencia.

En una última etapa, los dos nuevos fragmentos creados (uno de cada alérgeno) se unieron por ligación a través del enlazador del objetivo llevado por EcoRI, Par j 1 remanente en el extremo N-terminal y Par j 2 en el extremo C-terminal. Dicho fragmento se subclonó posteriormente en el vector de expresión comercial pQE-32, que contiene una secuencia extra de 13 aminoácidos en el extremo N-terminal correspondiente a la cola de afinidad (Figura 5). Dicha secuencia codificó para un polipéptido que tiene 212 aminoácidos y un peso molecular aparente de 23336 Da.

C) Proteína del comparador química Q3

Esta última construcción fue prácticamente idéntica a Q2, excepto que en esta ocasión y en un intento para eliminar cualquier posible existencia de epítopos IgE, se eliminó otra secuencia adicional de 8 aminoácidos presentes en las secuencias de Par j 1 (residuo 71 a 80) y Par j 2 (residuo 72 a 81) (Figura 6 y 7).

Se usaron los oligonucleótidos sintéticos:

X Fragmento 1: F1F1, CG GGATCC TGCAAGAAACCTGCGG (*Bam*HI) y F3R1, CG AGATCT GACCTCGCTGACGAG (*Bgl*II).

X Fragmento 2: F3F2, CG AGATCT AGCAAGCTCCCGCCC (*Bgl*II) y F3R2, CG GGTACC GGGGACCTCGGCGAC (*Kpn*I). Las condiciones de los 2 fragmentos fueron: 94°C, 4 min (1 ciclo); 94°C, 30 s - 54°C, 30 s - 72°C, 90 s (5 ciclos); 94°C, 30 s - 63°C, 30 s - 72°C, 90 s (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo).

X Fragmento 3: F3F3, CG GGTACC CTCCCGCCCATCACC (*Kpn*I) y F3R3, TTAAAAAGGCCGTAATATCC. Condiciones: 94°C, 4 min (1 ciclo); 94°C, 30 s - 56°C, 30 s - 72°C, 90 s (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo).

En este caso, la construcción Q2-pQE-32 se usó como la matriz y aproximadamente 150, 370 y 290 pb de tamaño se obtuvieron para los fragmentos 1, 2 y 3 respectivamente. Los oligonucleótidos usados fueron F3F1 y F3R1 para el fragmento 1, F3F2 y F3R2 para el fragmento 2 y F3F3 y F3R3 para el fragmento 3. Los procesos de ligación secuencial de los fragmentos descritos en los casos anteriores se repitió de nuevo. Las nuevas enzimas restrictivas usadas fueron *Bgl*II y *Kpn*I. En el tercer y último fragmento y debido a la pequeñez de su tamaño, 66 pb, se decidió amplificar parte de la secuencia del vector pQE-32-Q2 para obtener un fragmento de mayor tamaño que sea capaz de trabajar con mayor comodidad en el proceso de purificación posterior. En cada etapa, el fragmento obtenido por PCR se clonó en el vector pKS-Bluescript y se confirmó su secuencia. Una mutación espontánea se produjo en el primer fragmento correspondiente al primer aminoácido glutamina (Q) por prolina (P).

Por último, el fragmento resultante se subclonó en el vector de expresión pQE-32, que contiene una secuencia extra de 13 aminoácidos en el extremo N-terminal correspondiente a la cola de afinidad (figura 8). Dicha secuencia codificó para un polipéptido que tiene 200 aminoácidos y un peso molecular aparente de 21938 Da.

EJEMPLO 2: Expresión y purificación de las proteínas químicas Q1, Q2, y Q3

A partir de una colonia aislada de una lámina de LB (suplementado con 100 y 25 µg/ml de ampicilina y kanamicina, respectivamente), un pre-inóculo de 50 ml del mismo medio se produjo y se incubaron durante toda la noche a 37 °C con agitación (260 rpm). Un litro del mismo medio se inoculó con dicho pre-inóculo, a partir de una densidad óptica (600 nm) de 0,2. La mezcla se incubó a 37 °C con agitación durante 1 hora y 30 minutos, después de lo cual la inducción con IPTG (1 mM de concentración final) se llevó a cabo durante 3 h bajo las mismas condiciones de incubación.

En el caso de la proteína química Q2 de la invención, las células se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 50 ml de tampón de lisis (20 mM fosfato, pH 7,4; 50 mM imidazol; 0,5M NaCl). La materia resuspendida se trató con lisozima (concentración final de 0,1 mg/ml) durante 30 minutos a 37 °C con agitación. La sonicación (5 pulsos de 20 s) se llevó a cabo después y la mezcla se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró por 0,45 micras (Millex HV, Millipore) y se aplicó (2,5 ml/min) a una columna de 5 ml HP quelante Hi-Trap (GE-Healthcare) adaptada al sistema ÄKTA Prime (GE-Healthcare). Esta columna se queló con níquel y había sido previamente equilibrada con 10 volúmenes de tampón de lisis. Una vez que la columna había sido lavada con 15 volúmenes de tampón de lisis, la elución de la proteína unida a la columna se llevó a cabo usando tampón de elución (pH 20 mM fosfato 7,4; 0,5 M imidazol) hasta 100 %. El eluato se pasó a través de una columna de 5 ml de desalación Hi-Trap (GE-Healthcare) para eliminar las sales y cambiar el tampón de la muestra 20 mM fosfato pH 7. La proteína se mantuvo a -40 °C.

Una etapa de purificación adicional se requirió en los casos de las proteínas del comparador Q1 y Q3. Después de la inducción de estas, las células se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 50 ml de tampón de lisis suplementado con 8 M de urea, siendo adoptado el procedimiento descrito en el párrafo anterior. En una segunda etapa de purificación, se aplicó el eluato obtenido (1 ml/min) a una columna Superdex-200 Hi-Load 16/60 (GE-Healthcare) equilibrada previamente con PBS; la elución de la proteína se llevó a cabo en el tampón descrito en el párrafo anterior. La proteína se mantuvo a -40 °C.

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). El método descrito por Laemmli básicamente se siguió [(31) Laemmli, GB. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 277, 680-685], usando un aparato de electroforesis MINI-PROTEAN (Bio-Rad). Los geles, que miden 10 x 10 cm y que tienen una concentración de poliacrilamida del 12,5% se sometieron a una corriente de 200 voltios durante 45 minutos en tampón tris-glicina. Las proteínas usadas como referencia fueron las del estuche Bio-Rad de pesos moleculares bajos. El cálculo de los pesos moleculares y el análisis densitométrico de los geles se llevaron a cabo usando un analizador de imágenes (Diversidad, BioRad).

La proteína del comparador híbrida Q1 se expresó como proteína de fusión de 32 kDa etiquetada con His (Figura 9) con un rendimiento final de 2 mg/L de cultivo bacteriano. La proteína de la invención Q2 y la proteína del comparador Q3 se expresaron como proteínas de fusión de 28 kDa etiquetada con His con un rendimiento final de 5 y 7 mg/L de cultivo, respectivamente (Figura. 9).

15 EJEMPLO 3: Análisis de dicróismo circular de las moléculas híbridas purificadas

Los espectros de CD Far-UV (190-250 nm) a pH 7,0 y 20 °C se registraron con un espectropolarímetro Jasco J-810 equipado con un controlador de temperatura Jasco PTC-423S en cubetas termostatadas a 20 °C. La concentración de proteína fue 0,035 mg/ml en tampón de 20 mM fosfato de sodio en una cubeta de 0,2 cm y se acumularon cuarenta exploraciones. Todos los espectros se restaron por el fondo adecuado y convirtieron a la elipticidad media del residuo.

Los elementos de estructura secundaria se analizaron mediante espectroscopia CD aplicando la mezcla de alérgenos naturales de *Parietaria* (Par j 1 y Par j 2) y las proteínas híbridas (Figura 10). Los espectros de las proteínas híbridas fueron casi idénticos entre ellos, pero totalmente diferentes del espectro CD de alérgenos naturales. El espectro NPA presentó un mínimo en 208 nm, un hombro bien definido a 222 nm y un máximo a 190 nm, mientras que los espectros de las proteínas híbridas se desplazan hacia la conformación de espiral al azar alcanzando un estado casi completamente desplegado.

30 EJEMPLO 4: Pruebas inmunológicas para demostrar la baja reactividad de fijación a IgE de las proteínas quiméricas hacia una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *P. judaica*

A) Inmunodetección

Una primera evaluación de la actividad de unión a IgE de las fusiones 1, 2 y 3 se llevó a cabo por el método de inmunotransferencia empleando una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *P. judaica*. Una vez que los extractos de proteínas y las proteínas purificadas se habían aplicado a geles de poliacrilamida, la electrotransferencia se llevó a cabo por el método de Towbin y otros [(32) Towbin, H., Staehelin, I., y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354]. Para este propósito, las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron eléctricamente a membranas de PVDF Hybond-P (GE-Healthcare). Una vez que las membranas se habían bloqueado durante 1 h a temperatura ambiente, se incubaron durante toda la noche a 4 °C con un anticuerpo primario y, después de varios lavados con el mismo tampón de lavado, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Las bandas se detectaron mediante el método ECL quimioluminiscente (GE-Healthcare) como se describe por el fabricante mediante la exposición de la membrana a una película (Hyperfilm.ECL, GE-Healthcare).

Los ensayos de inmunodetección demostraron una capacidad diferente de unión a IgE entre las tres fusiones; en consecuencia el reconocimiento de anticuerpos IgE sólo existió en el caso de la proteína del comparador Q1 (Figura. 11). En el caso de la proteína quimérica de la invención Q2, el reconocimiento se redujo muy rápidamente, mientras que en el caso de la proteína del comparador Q3, el reconocimiento demostrado fue cero.

B) ELISA directo

La reactividad de IgE a las tres fusiones se analizó por el método de ELISA usando sueros individuales de pacientes alérgicos a *P. judaica*. Las placas de poliestireno (Greiner) se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente con 1 µg de extracto de proteína de *P. judaica* 0,1 µg de proteína pura por cada pocillo en tampón PBS (fosfato 10 mM pH 7,2; 137 mM NaCl 2,7 mM KCl). Se bloquearon con 200 µl/pocillo de PBS suplementado con 1 % BSA-0,05 % Tween 20 y se mantuvieron a 37 °C durante 1 h. Se añadieron 100 µl/pocillo de suero (dilución 1/10) de pacientes alérgicos y se incubaron a 37 °C durante 90 min. Después de 3 lavados con 200 µl/pocillo de PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20), se añadieron después 100 µl/pocillo de un antisuero hacia inmunoglobulinas IgE humana (DAKO) conjugado con peroxidasa (dilución 1: 1000) y se incubaron durante 90 minutos a 37 °C. Después de tres nuevos lavados con PBS-T, 200 µl/pocillo de una solución de o-fenilendiamina (Sigma-Fast Tablet Sets, Sigma) preparados de acuerdo con las instrucciones del fabricante se mantuvieron las placas en la oscuridad durante 30 minutos. La reacción se detuvo con 50 µl/pocillo de 3 M H₂SO₄ y la absorbancia se midió a 492 nm en un lector de placas de ELISA Easy Reader EAR-400 AT (SLT-Lab Instruments).

La reactividad a IgE se demostró sólo en el caso de la proteína del comparador Q1, mientras que tanto la proteína de la invención Q2 como la proteína del comparador Q3 no demostraron prácticamente ningún reconocimiento de los anticuerpos IgE (Figura. 12).

C) ELISA de Inhibición

Para las pruebas ELISA de inhibición la mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *P. judaica* se preincubó durante toda la noche a 4 °C con una concentración dada de proteína inhibidora (de 1 a 1000 ng/ml). El resto del procedimiento seguido es el mismo que el descrito para el ensayo de ELISA directo.

En las pruebas de inhibición de ELISA con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *P. judaica*, Q1 demostró un grado de inhibición de aproximadamente el 50 % de la actividad de unión a IgE de polen de *P. judaica*, algunos menor que la de nPar j 1-Par j 2 (92%), siendo necesario añadir 500 veces más proteína (Figura. 13). Las quimeras Q2 (una proteína de la invención) y Q3 (un comparador) alcanzaron un grado máximo de inhibición de aproximadamente 60 %, pero esto requiere una concentración de proteína 10.000 veces mayor que la requerida para nPar j 1-Par j 2 para alcanzar el mismo grado de inhibición, lo que implica que estas quimeras habían reducido su alergenidad por aproximadamente 99,99 %.

EJEMPLO 5: Experimentos *in vivo* para demostrar la baja reactividad cutánea de las proteínas quiméricas Q1 (un comparador), Q2 (una proteína de la invención) y Q3 (un comparador)

Pruebas in vivo de reacción en la piel (punción) se llevaron a cabo para evaluar la naturaleza hipoalergénica de las quimeras 1, 2 y 3 con el objetivo de determinar la molécula hipoalergénica candidato para ser capaz de desarrollar inmunoterapia satisfactoria contra la alergia de polen de *P. judaica*.

Las pruebas cutáneas se realizaron usando extracto de *P. judaica*, nPar j 1-Par j 2, rPar j 1 y rPar j 2 expresado en *E. coli*, y las quimeras 1, 2 y 3. Las proteínas purificadas se diluyeron en una solución salina fisiológica 0,5 % fenolada y 50 % glicerada. Las concentraciones usadas fueron 0,5, 5, y 50 µg/ml en el caso de Par j, Par j 2, Q1; naturales; las concentraciones fueron 5, 50 y 250 µg/ml en el caso de Q2 o Q3. 0,9 % NaCl y clorhidrato de histamina (10 mg/ml) se usaron como controles negativos y positivos respectivamente.

En el experimento una gotita de cada alérgeno que se prueba se depositó en la zona volar del antebrazo, y después la punción se realizó a través de la gotita con una lanceta. Cada prueba se llevó a cabo por duplicado y en cadenas opuestas de concentración creciente y decreciente. Después de un período de 15 minutos, los parches se delinearon con un rotulador de punta fina negro. Las tiras de esparadrapo hipoalergénico se colocaron en los parches y se presionaron suavemente para pasar la tinta marcada a la tira; este se transfirió a las hojas de registro del parche. Las áreas de parche se midieron mediante el escaneo de los registros usando una tableta digitalizadora Summasketch y un programa de diseño asistido por computadora (Autocad v.11).

Los resultados obtenidos se interpretaron llevando a cabo un estudio estadístico ilustrando los resultados en diagramas de bloques y usando la prueba de Wilcoxon para las variables relacionadas (Figura 14). Estos ejemplos muestran que las distribuciones de los valores correspondientes a las reacciones cutáneas (medidas en mm² del área del parche) difieren significativamente en el caso de las tres quimeras ($P < 0,001$) con respecto al extracto (media 65,25 mm² - intervalo de confianza 95 %: 54,98-75,53) y nPar j 1-Par j 2 (media 106,80 mm² - intervalo de confianza 95 %: 91,90-121,70). Los valores de las quimeras 2 y 3 son prácticamente cero: Q2 una proteína de la invención (media 0,95 mm² - intervalo de confianza 95 %: 0-2,89) y Q3 un comparador (media 0,15 mm² - intervalo de confianza 95 %: 0-0,47).

EJEMPLO 6: Experimentos para demostrar la baja capacidad de unión al anticuerpo IgE de las proteínas quiméricas Q1 un comparador, una proteína de la invención Q2, y un comparador Q3

De nuevo, como un suplemento a las pruebas *in vivo*, pruebas *in vitro* se llevaron a cabo mediante la determinación de IgE específica, usando el método de ESTE-directo.

La IgE específica se determinó de acuerdo con Ceska y otros [(33) Ceska, M. y Lundkvist, U. 1972). A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochemistry* 9, 1021-1030], mediante el acoplamiento de las proteínas naturales y recombinantes (50 µg/ml), así como el extracto de *P. judaica* (2 mg/ml) a los discos activados con bromuro de cianógeno. 50 µl de suero de los pacientes se añadió posteriormente y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar los discos se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con 50 µl de anticuerpos humanos anti IgE unidos a fosfatasa alcalina, y la cuantificación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones proporcionadas con el estuche específico EIA Hytec IgE por el fabricante (Hycor Biomedical Inc.).

Los resultados obtenidos simplemente reafirman los obtenidos *in vivo*; de las tres quimeras, la proteína del comparador Q1 mantuvo su capacidad inmunogénica en relación con nPar j 1-Par j 2 mientras que la proteína de la invención Q2 y la proteína del comparador Q3 tuvieron toda una reducción pronunciada en dicha capacidad ($P < 0,001$) (Figura. 15).

Ejemplo 7: Experimentos de linfoproliferación inducida para demostrar la capacidad inmunogénica de las proteínas quiméricas proteína del comparador Q1, proteína de la invención Q2 y proteína del comparador Q3

5 Un requisito esencial para el uso de una molécula hipoalérgica en la inmunoterapia es el mantenimiento de su antigenicidad (epítomos T). Por lo tanto, para comprobar si, adicionalmente a no unirse a anticuerpos IgE, nuestras proteínas permanecen antigénicas, se llevó a cabo una prueba de linfoproliferación en células de sangre periférica mononucleares (CMSP) estimuladas por varias proteínas usadas en los experimentos. Las pruebas se llevaron a cabo mediante un método colorimétrico basado en la digestión de la sal de tetrazol WST-1 por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables para dar lugar al compuesto de formazano que se mide por colorimetría.

10 Las CMSPs de 13 pacientes alérgicos a *P. judaica* se aislaron por centrifugación en un gradiente de densidad usando una solución para la separación de linfocitos (Lymphoprep, Nycomed). Las CMSPs se resuspendieron después a 1×10^6 células viables/ml en medio de cultivo (medio AIM V libre de suero, Gibco) y su viabilidad se probó con 0,25 % de azul tripan en PBS (Sigma Chemical Co.). Las CMSPs preparadas con la viabilidad mayor que 90 % se usaron inmediatamente para las pruebas de proliferación *in vitro* como se describe por el fabricante (agente de proliferación celular WST-1, Roche Diagnostics). Se depositaron en microplacas de fondo plano (Nunc, NUNC), 2×10^5 CMSP en un volumen final de medio de 200 μ l y las mediciones se tomaron por triplicado a 37 °C y 5 % de CO₂ de atmósfera humificada con el extracto de *P. judaica* y varias proteínas purificadas a una concentración final de 0,0005-0,005-0,05-0,5-5 μ g/ml. Se incluyeron en todos los casos controles por triplicado de cultivos no estimulados. Después de 3 días, 20 μ l del agente de proliferación celular WST-1 se añadió a todos los pocillos, y se incubó durante 4 h. El formazán producido por las células metabólicamente activas se cuantificó por absorbancia a 450 nm. Las proteínas recombinantes usadas en la prueba fueron las tres quimeras y rPar j 1 y rPar j 2 expresados en *E. coli*.

25 En una primera etapa, la proteína inmunogénica se escaneó para determinar la concentración óptima para el desarrollo posterior de la prueba. En todos los casos se encontró que la concentración de proteínas fue de 0,5 μ g/ml demostrando máxima proliferación (IE %) (Figura. 16).

30 Los resultados de la proliferación con los 13 pacientes alérgicos a *P. judaica* se determinaron mediante análisis estadístico de diagrama de bloques y pruebas no paramétricas para dos muestras pareadas. El análisis estadístico mostró que el extracto de *P. judaica* usado como un control tuvo una capacidad de estimulación antigénica que no difiere mucho de la de nPar j 1-Par j 2 ($P = 0,142$), y que la proteína del comparador Q1 y proteína de la invención Q2 demostraron una distribución de los valores que no fueron significativamente diferentes de los del extracto ($P=0,152$ y $P=0,294$ respectivamente) y nPar j 1-Par j 2 ($P=0,484$ y $P=0,182$, respectivamente) (Figura 17). La proteína del comparador Q3 por otro lado apenas tuvo una capacidad de estimulación con respecto al extracto ($P=0,002$) y nPar j 1-Par j 2 ($P=0,004$). Por otra parte, procede recordar el mayor poder antigénico de rPar j 2 hacia rPar j 1 contra el extracto ($P= 0,142$ y $P=0,003$, respectivamente) y nPar j 1-Par j 2 ($P=0,041$ y $P=0,002$, respectivamente) .

40 Los resultados obtenidos muestran que la proteína de la invención Q2 aún mantuvo dicha propiedad, mientras que la proteína del comparador Q3 completamente la perdió. Se puede concluir a partir de todo lo que se ha dicho acerca del proceso para obtener diferentes moléculas hipoalérgicas para tratar la alergia a la *P. judaica*, que el Q2 podría ser la molécula candidato hipoalérgica para desarrollar la inmunoterapia satisfactoria contra la alergia a *P. judaica*.

45 Métodos de Administración

La presente invención se refiere a las quimeras hipoalérgicas descritas para usar en tratamientos de hiposensibilización en mamíferos. El método de la hiposensibilización implica la administración repetida por vía parenteral (subcutánea, intravenosa o intramuscular), oral, sublingual, nasal o rectal del alérgeno en cuestión. Estos (poli) péptidos se pueden administrar solos y en conjunto con otros diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la legislación vigente y el procedimiento galénico para el uso.

Referencias

1. Miyamoto, T. (1992). Increased prevalence of pollen allergy in Japan. In *Advances in Allergology and Clinical Immunology*. P. Godard, J. Bousquet, y F.B. Michel, eds. (Cornforth, UK: The Parthenon Publishing Group), pp. 343-347.
2. Akdis, C.A. Blaser, K. (2000). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 55, 518-524.
3. Akdis, C.A., Joss, A., Akdis, M., y Blaser, K. (2001). Mechanism of IL-10 induced cell inactivation in allergic inflammation and normal response to allergens. *Int. Arch Allergy Immunol.* 124, 180-182.
4. Moverate, R. (2003). Immunological mechanisms of specific immunotherapy with pollen vaccines: implications for diagnostics and the development of improved vaccination strategies. *Expert Rev. Vacc.* 2, 85-97.
5. Wachholz, P.A., Soni, N.K., Till, S. y Durham, S.R. (2003). Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112; 915-922.
6. Valenta, R. y Linhart, B. (2005). Molecular design of allergy vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 1-10.
7. Niederberger, V., Horak, F., Vrtala, S., Spitzauer, S., Krauth, M.T., Valent, P., Reisinger, J., Pelzmann, M., Hayek, B., Kronqvist, M., Gafvelin, G., Grönlund, H., Purohit, A., Suck, R., Fiebig, H., Cromwell, O., Pauli, G., van Hage-Hamsten,

- M., y Valenta, R. (2004). Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 14677-14682.
8. Schmid-Grendelmeier, P., Karamloo, F., Müller, U., Housley-Marcovic, Z., Soldatova, L., Zumkehr, J., Kemeny, D.M., Kündig, T., Reimers, A., von Beust, B.R., Salagianni, M., Akdis, M., Kussebi, F., Spangfort, M.D., Blaser, K., y Akdis, C.A. (2005). Prevention of allergy by a recombinant multi-allergen vaccine with reduced IgE binding and preserved T cell epitopes. *Eur. J. Immunol.* *35*, 3268-3276.
- 5 9. Allam, J.P., Novak, N., Fuchs, C., Asen, S., Berge, S., Appel, T., y otros (2003) Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcεRI expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* *112*, 141-8.
- 10 10. von Bubnoff, D., Matz, H., Frahnert, C., Rao, M.L., Hanau, D., de la Salve, H., Bieber, T. (2003) FcεRI induces the triptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses. *J. Immunol.* *169*, 1810-1816.
11. Batard, T., Didierlaurent, A., Chabre, H., Mothes, N., Bussieres, L., Bohle, B., y otros (2005) Characterization of wild-type recombinant Bet v 1a as a candidate vaccine against birch pollen allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *136*, 239-249.
12. Jutel, M., Jaeger, L., Suck, R., Meyer, H., Fiebig, H., Cromwell, O. (2005) Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* *116*, 608-13.
- 15 13. Niederberger, V., Horak, F., Vrtala, S., Spitzauer, S., Krauth, M.T., Valent, P., y otros (2004) Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 14677-82.
14. Cromwell, O., Fiebig, H., Suck, R., Kahlert, H., Nandy, A., Kettner, J., y otros (2006) Strategies for recombinant allergen vaccines and fruitful results from first clinical studies. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* *26*, 261-81.
- 20 15. Colombo, P., Duro, G., Costa, M.A., Izzo, V., Mirisola, M., Locorotondo, G., Cocchiara, R., y Geraci, D. (1998). An update on allergens. *Parietaria polen allergens.* *Allergy* *53*, 917-921.
16. Colombo, P., Bonura, A., Costa, M., Izzo, V., Passantino, R., Licorotondo, G., Amoroso, S., y Gerasi, D. (2003). The allergens of *Parietaria*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *130*, 173-179.
17. Carreira, J. y Polo, F. (1995). The allergens of *Olea europaea* and *Parietaria* spp. and their relevance in the
- 25 Mediterranean Area. *Allergy Clin. Immunol. News* *7*, 79-84.
18. Ayuso, R., Carreira, J., Lombardero, M., Duffort, O., Peris, A., Basomba, A., y Polo, F. (1993). Isolation by mAb based affinity chromatography of two *Par j* isoallergens. Comparison of their physicochemical, immunochemical and allergenic properties. *Mol. Immunol.* *30*, 1347-1354.
19. Polo, F., Ayuso, R., y Carreira, J. (1990). HPLC purification of the main allergen of *Parietaria judaica* polen. *Mol. Immunol.* *27*, 151-157.
- 30 20. Polo, F., Ayuso, R., y Carreira, J. (1991). Studies on the relationship between structure and IgE-binding ability of *Parietaria judaica* allergen I. *Mol. Immunol.* *28*, 169-175.
21. Duro, G., Colombo, P., Costa, M.A., Izzo, V., Porcasi, R., DiFiore, R., Locorotondo, G., Mirisola, M.G., Cocchiara, R., y Geraci, D. (1996). cDNA cloning, sequence analysis and allergological characterization of *Par j* 2,0101, a new major allergen of the *Parietaria judaica* polen. *FEBS Lett.* *399*, 295-298.
- 35 22. Costa, M.A., Colombo, P., Izzo, V., Kennedy, H., Venturella, S., Cocchiara, R., Mistrello, G., Falagiani, P., y Geraci, D. (1994). cDNA cloning expression and primary structure of *Par j* I, a major allergen of *Parietaria judaica* polen. *FEBS Lett.* *341*, 182-186.
23. Amoresano, A., Pucci, P., Duro, G., Colombo, P., Costa, M.A., Izzo, V., Lambda, D., y Geraci, D. (2003). Assignment of disulphide bridges in *Par j* 2,0101, a major allergen of *Parietaria judaica* polen. *Biol. Chem.* *384*, 1165-1172.
- 40 24. Asturias, J.A., Gómez-Bayón, N., Eseverri, J.L., y Martínez, A. (2003). *Par j* 1 and *Par j* 2, the major allergens from *Parietaria judaica* polen, have similar immunoglobulin E epitopes. *Clinical and Experimental Allergy* *33*, 518-524.
25. van Ree, R. (2002). Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem. Soc Trans* *30*, 910-913.
- 45 26. Beezhold, D.H., Hickey, V.L., Kostyal, D.A., y otros (2003). Lipid transfer protein from *Hevea brasiliensis* (Hev b 12), a cross-reactive latex protein. *Ann Allergy Asthma Immunol* *439*-445.
27. Diaz-Perales, A., Lombardero, M., Sanchez-Monge, R., y otros (2000). Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* polen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* *1403*-1410.
- 50 28. Tejera, M.L., Villalba, M., Batanero, E., y Rodriguez, R. (1999). Identification, isolation, and characterization of *Ole e* 7, a new allergen of olive tree polen. *J. Allergy Clin. Immunol.* *797*-802.
29. Rodriguez, R., Villalba, M., Batanero, E., y otros (2002). Allergenic diversity of the olive polen. *Allergy* *6*-16.
30. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557-580.
31. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- 55 32. Towbin, H., Staehelin, I., y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *76*, 4350-4354.
33. Ceska, M. y Lundkvist, U. (1972). A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochemistry* *9*, 1021-1030.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Bial industria Farmaceutica, S.A.

5 <120>PROTEÍNAS QUIMÉRICAS HIPOALERGÉNICAS PERTENECIENTES A LA FAMILIA DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS DE *PARIETARIA JUDAICA* PARA USAR EN EL TRATAMIENTO DE ALERGIAS.

<130> Proteínas quiméricas.

<160> 6

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 768

<212> ADN.

15 <213> Artificial

<220>

<223> Q1

20 <400> 1

```

atgagaggat ctcaccatca ccatcaccat gggatcctgc aagaaacctg cgggactatg    60
gtgagagcgc tgatgccgtg cctgccgttc gtgcagggga aagagaaaga gccgtcaaag    120
gggtgctgca gcggcgccaa aagattggac ggggagacga agacggggcc gcagaggggtg    180
cacgcttggtg agtgcattcca gaccgccatg aagacttatt ccgacatcga cgggaaactc    240
gtcagcgagg tccccaaagca ctgcggcatc gttgacagca agctcccgcc cattgacgtc    300
aacatggact gcaagacact tggagtgggt cctcggcaac cccaacttcc agtctctctc    360
cgtcatggtc ccgtcacggg cccaagtgat cccgccaca aagcacgggt ggagagaccc    420
cagattagag ttccgcccc cgcaccgga aaagccgaat tcgaggaggc ttgcgggaaa    480
gtggtgcagg atataatgcc gtgcctgcat ttctgtaagg gggaggagaa ggagccgtcg    540
aaggagtgtc gcagcggcac gaagaagctg agcaggagg tgaagacgac ggagcagaag    600
agggaggcct gcaagtgcatt agtgcgcgcc acgaaggcca tctccggtat caaaaatgaa    660
cttgtcgccg aggtcccaa gaagtgcgat attaagacca ctctcccgcc catcaccgcc    720
gacttcgact gctccaagat ccaaagtact attttcagag gttactat    768

```

<210> 2

<211> 256

<212> PRT

45 <213> Artificial

<220>

<223> Proteína Q1

50 <400> 2

```

Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Ile Leu Gln Glu Thr
 1          5          10          15
Cys Gly Thr Met Val Arg Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro Phe Val Gln
          20          25          30
Gly Lys Glu Lys Glu Pro Ser Lys Gly Cys Cys Ser Gly Ala Lys Arg
          35          40          45

```

Leu Asp Gly Glu Thr Lys Thr Gly Pro Gln Arg Val His Ala Cys Glu
 50 55 60
 Cys Ile Gln Thr Ala Met Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp Gly Lys Leu
 65 70 75 80
 Val Ser Glu Val Pro Lys His Cys Gly Ile Val Asp Ser Lys Leu Pro
 85 90 95
 Pro Ile Asp Val Asn Met Asp Cys Lys Thr Leu Gly Val Val Pro Arg
 100 105 110
 Gln Pro Gln Leu Pro Val Ser Leu Arg His Gly Pro Val Thr Gly Pro
 115 120 125
 Ser Asp Pro Ala His Lys Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln Ile Arg Val
 130 135 140
 Pro Pro Pro Ala Pro Glu Lys Ala Glu Phe Glu Glu Ala Cys Gly Lys
 145 150 155 160
 Val Val Gln Asp Ile Met Pro Cys Leu His Phe Val Lys Gly Glu Glu
 165 170 175
 Lys Glu Pro Ser Lys Glu Cys Cys Ser Gly Thr Lys Lys Leu Ser Glu
 180 185 190
 Glu Val Lys Thr Thr Glu Gln Lys Arg Glu Ala Cys Lys Cys Ile Val
 195 200 205
 Arg Ala Thr Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys Asn Glu Leu Val Ala Glu
 210 215 220
 Val Pro Lys Lys Cys Asp Ile Lys Thr Thr Leu Pro Pro Ile Thr Ala
 225 230 235 240
 Asp Phe Asp Cys Ser Lys Ile Gln Ser Thr Ile Phe Arg Gly Tyr Tyr
 245 250 255

40 <210> 3
 <211> 636
 <212> ADN.
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Q2

<400> 3

50 atgagaggat ctcacccatca ccattcaccat gggatcctgc aagaaacctg cgggactatg 60
 gtgagagcgc tgatgccgtg cctgccgttc gtgcagggga aagagaaaga gccgtcaaag 120
 / gggctgcaga tccagaccgc catgaagact tattccgaca tcgacgggaa actcgtcagc 180
 55 gaggtcccca agcactgcgg catcgttgac agcaagctcc cgtccattga cgtcaacatg 240
 gactgcaaga cacttggagt ggttcctcgg caaccccaac ttccagcttc tctcgtcat 300
 ggtcccgtrc cgggcccaag tgatcccgcc cacaagcac ggttggagag accccagatt 360

60

65

agagttccgc ccccccacc ggaaaaagcc gaattcgagg aggccttcgag gaaagtggg 420
caggatataa tgccgtgcct gcatttcgtg aagggggagg agaaggagcc gtcgaaggag 480
gatatcatag tgcgcgccac gaagggcatc tccggtatca aaaatgaact tgcgccgag 540
gtccccaaga agtgcgatat taagaccact ctccgcacca tcaccgccga cttcgactgc 600
tccaagatcc aaagtactat tttcagaggt tactat 636

<210> 4
<211> 212
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Proteína Q2
<400> 4

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ile Leu Gln Glu Thr 1 5 10 15
Cys Gly Thr Met Val Arg Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro Phe Val Gln 20 25 30
Gly Lys Glu Lys Glu Pro Ser Lys Gly Leu Gln Ile Gln Thr Ala Met 35 40 45
Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp Gly Lys Leu Val Ser Glu Val Pro Lys 50 55 60
His Cys Gly Ile Val Asp Ser Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn Met 65 70 75 80
Asp Cys Lys Thr Leu Gly Val Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro Val 85 90 95
Ser Leu Arg His Gly Pro Val Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His Lys 100 105 110
Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln Ile Arg Val Pro Pro Pro Ala Pro Glu 115 120 125
Lys Ala Glu Phe Glu Glu Ala Cys Gly Lys Val Val Gln Asp Ile Met 130 135 140
Pro Cys Leu His Phe Val Lys Gly Glu Glu Lys Glu Pro Ser Lys Glu 145 150 155 160
Asp Ile Ile Val Arg Ala Thr Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys Asn Glu 165 170 175
Leu Val Ala Glu Val Pro Lys Lys Cys Asp Ile Lys Thr Thr Leu Pro 180 185 190
Pro Ile Thr Ala Asp Phe Asp Cys Ser Lys Ile Gln Ser Thr Ile Phe 195 200 205
Arg Gly Tyr Tyr 210

<210> 5
<211> 600
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Q3

<400> 5

5 atgagaggat ctcacccatca ccaccacccat gggatcctgc cagaaacctg cgggactatg 60
gtgagagcgc tgatgccgtg cctgccgttc gtgcagggga aagagaaaga gccgtcaaag 120
gggctgcaga tccagaccgc catgaagact tattccgaca tcgacgggaa actcgtcagc 180
10 gaggtcagat ctacgaagct cccgccatt gatgtcaaca tggactgcaa gacacttggg 240
gtggttcttc ggcaacccca acttcagtc tctctcgtc atggtcccg caccggccca 300
agtgtcccg ccacaaaagc acggttggag agacccaga ttagagttcc gcccccgca 360
ccgaaaaag ccgaattcga ggaggcttc gggaaagtgg tgcaggatat aatgccgtgc 420
15 ctgcatttcg tgaaggggga ggagaaggag ccgtcgaagg aggatacat agtgcgcgcc 480
acgaagggca tctccggtat caaaaatgaa ctgtcgcgcg aggtcccgccg taccttcccg 540
cccatcaccg ccgacttcga ctgtccaag atccaaagta ctatttcag aggttactat 600

20

<210> 6

<211> 200

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Proteína Q3

30 <400> 6

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

60

65

Ala Cys Gly Lys Val Val Gln Asp Ile Met Pro Cys Leu His Phe Val
130 135 140

5 Lys Gly Glu Glu Lys Glu Pro Ser Lys Glu Asp Ile Ile Val Arg Ala
145 150 155

Thr Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys Asn Glu Leu Val Ala Glu Val Pro
165 170 175

10 Gly Thr Leu Pro Pro Ile Thr Ala Asp Phe Asp Cys Ser Lys Ile Gln
180 185 190

15 Ser Thr Ile Phe Arg Gly Tyr Tyr
195 200

Reivindicaciones

- 5 1. Una proteína quimérica que comprende secuencias de aminoácidos derivadas de las secuencias que corresponden a los principales alérgenos del polen de *Parietaria judaica* conocidos como Par j 1 y Par j 2, la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica carece de uno o más epítopos para la unión a anticuerpos IgE correspondientes a las secuencias de la cual se deriva, y en donde la proteína no tiene una reducción en la inmunogenicidad, caracterizada porque la proteína comprende la secuencia de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 4.
- 10 2. Una proteína quimérica que consiste en la secuencia de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 4.
3. Una proteína quimérica como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para usar como un medicamento.
- 15 4. La proteína quimérica de acuerdo con la reivindicación 3 para usar en el tratamiento de un trastorno inmunológico.
5. La proteína quimérica de acuerdo con la reivindicación 4 para usar en el tratamiento de la alergia.
- 20 6. La proteína quimérica de acuerdo con la reivindicación 5 en donde la alergia es una alergia al polen de *Parietaria judaica*.
7. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 25 8. Un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de sec. con núm. de ident.: 3.
9. Un vehículo de expresión microbiano en un organismo huésped transformado, que se auto-replica y se usa para expresar el polinucleótido de las reivindicaciones 7 u 8.
- 30 10. Un organismo huésped, distinto de un ser humano, que se transforma con un vehículo de expresión microbiana de acuerdo con la reivindicación 9.
11. El organismo de acuerdo con la reivindicación 10, donde el organismo es procariota.
- 35 12. El organismo de acuerdo con la reivindicación 11, el organismo procariota pertenece al género *E. coli*.
13. El organismo de acuerdo con la reivindicación 10, donde el organismo es eucariota.
- 40 14. Un método para producir un polipéptido que contiene una proteína quimérica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 caracterizado porque comprende el cultivo de un organismo huésped que contiene un vehículo de expresión microbiana que se auto-replica en el organismo antes mencionado y se usa para expresar la proteína quimérica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 45 15. Un método para purificar la proteína quimérica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende el aislamiento de este del cultivo, las células o ambos.
16. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 50 17. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la composición es una composición de vacuna.

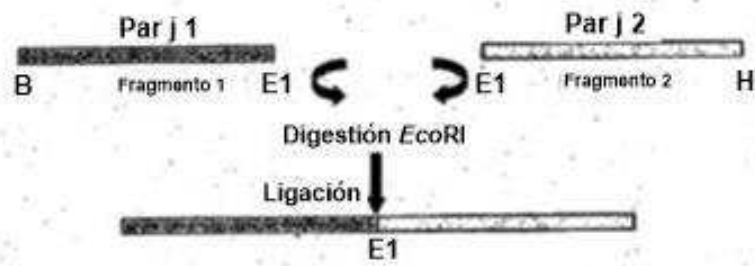


Figura 1

ATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATGGGATCCTGCAAGAAACCTGC
 M R G S H H H H H H G I L Q E T C
 GGGACTATGGTGAGAGCGCTGATGCCGTGCCGTGCCGTTCGTGCAGGGGAAA
 G T M V R A L M P C L P F V Q G K
 GAGAAAGAGCCGTCAAAGGGGTCTGTCAGCGGGGCCAAAAGATTGGACGGG
 E K E P S K G C C S G A K R L D G
 GAGACGAAGACGGGGCGCAGAGGGTGCAOGCTTGTGAGTGCATCCAGACC
 E T K T G P Q R V H A C E C I Q T
 GCCATGAAGACTTATTCCGACATCGACGGGAAACTCGTCAGCGAGGTCCCC
 A M X T Y S D I D G K L V S E V P
 AAGCACTGCCGCATCGTTGACAGCAAGCTCCCGGCCATTGACGTCAACATG
 K H C G I V D S K L P P I D V N M
 GACTGCAAGACACTTGGAGTGGTTCTCGGCAACCCCAACTTCCAGTCTCT
 D C K T L G V V P R Q P Q L F V S
 CTCGTCATGGTCCCGTCACGGGGCCCAAGTGATCCCGCCACAAAGCAOGG
 L R H G P V T G P S D P A H K A R
 TTGGAGAGACCCAGATTAGAGTTCCGCCCCCGCACCGGAAAAAGCOGAA
 L E R P Q I R V P P P A P E K A E
 TTCGAGGAGGCTTGCGGGAAAGTGGTGACGATATAATGCCGTGCCGTGCAT
 E E A C G K V V Q D I M P C L H
 TTCGTGAAGGGGGAGGAGAAGGAGCCGTGAAGGAGTGCTGCAGCGGCACG
 F V K G E E K E P S K E C C S G T
 AAGAAGCTGAGCGAGGAGGTGAAGACGACGGAGCAGAAGAGGGAGGCCTGC
 K K L S E E V X T T E Q K R E A C
 AAGTGATAGTGGCGGCCACGAAGGGCATCTCGGTATCAAAAATGAACTT
 K C I V R A T X G I S G I K N E L
 GTCGCCGAGGTCCCCAAGAGTGCGATATTAAGACCACTCTCCCGCCCATC
 V A E V P K K C D I K T T L P P I
 ACCGCCGACTTCGACTGCTCCAAGATCCAAGTACTATTTTCAGAGGTTAC
 T A D F D C S K I Q S T I P R G Y
 TAT
 Y

Figura 2

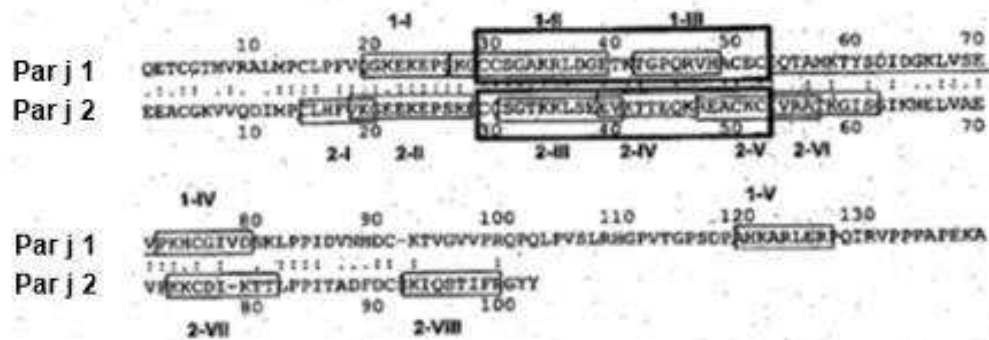


Figura 3

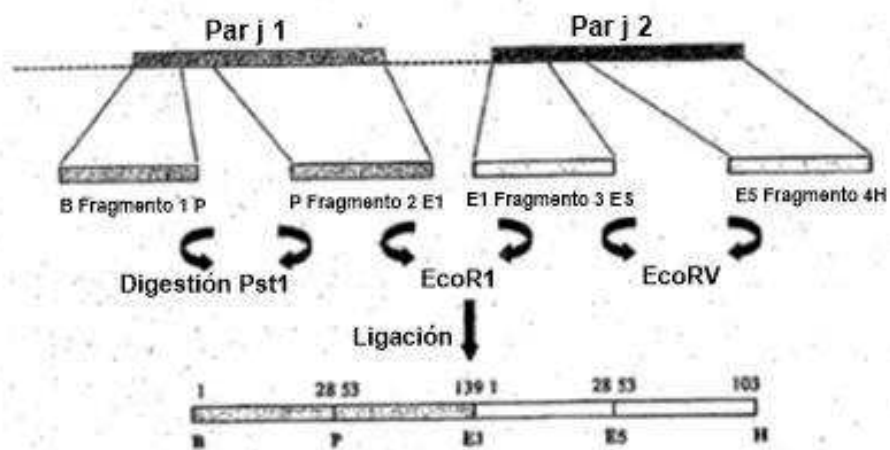


Figura 4

ATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATGGGATCCTGCAAGAAACCTGC
 M R G S H H H H H H G I L Q E T C
 GGGACTATGGTGAGAGCGCTGATGCCGTGCCCTGCCGTTTCGTGCAGGGGAAA
 G T M V R A L M P C L P F V Q G K
 GAGAAAGAGCCCGTCAAAGGGGCTGCAGATCCAGACCGCCATGAAGACTTAT
 E K E P S K G L Q I Q T A M K T Y
 TCCGACATCGACGGGAAACTCGTCAGCGAGGTCCCAAGCACTGCGGCATC
 S D I D G K L V S E V P K H C G I
 GTTGACAGCAAGCTCCCGCCCATTTGACGTCAACATGGACTGCAAGACACTT
 V D S K L P P I D V N M D C K T L
 GGAGTGGTTCTCTCGGCAACCCCAACTTCCAGTCTCTCTCCGTTCATGGTCCC
 G V V P R Q P Q L P V S L R H G P
 GTCACGGGCCCCAAGTGATCCCGCCCAAAAGCACGGTTGGAGAGACCCCG
 V T G P S D P A H K A R L E R P Q
 ATTAGAGTTCCGCCCCCGCACCGGAAAAAGCCGAATTGAGGAGGCTTGC
 I R V P P P A P E K A E F E E A C
 GGGAAAGTGGTGAGGATATAATGCCGTGCCCTGCATTTCGTGAAGGGGGAG
 G K V V Q D I M P C L H F V K G E
 GAGAAGGAGCCCGTGAAGGAGGATATCATAGTGCGCGCCACGAAGGGCATC
 E K E P S K E D I I V R A T K G I
 TCCGGTATCAAAAATGAACCTTGTCGCCGAGGTCCCAAGAAGTGCGATATT
 S G I K N E L V A E V P K K C D I
 AAGACCACTCTCCCGCCCATCACCGCCGACTTCGACTGCTCCAAGATOCAA
 K T T L P P I T A D F D C S K I Q
 AGTACTATTTTCAGAGGTTACTAT
 S T I F R G Y Y

Figura 5

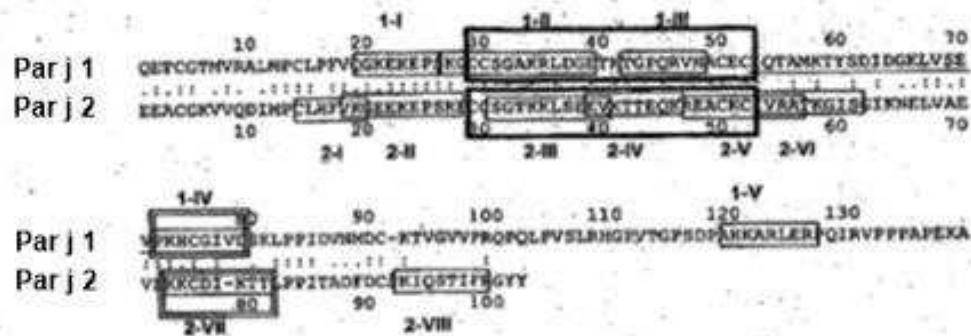


Figura 6

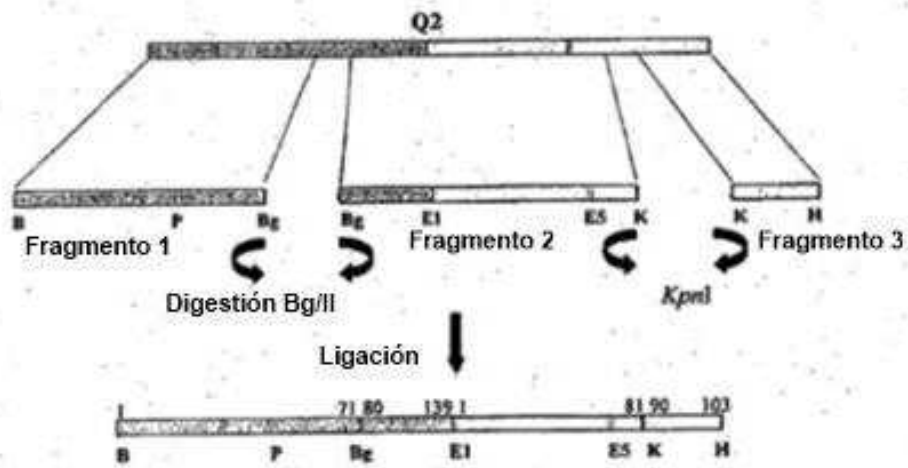


Figura 7

ATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATGGGATCCTGCCAGAAACCTGC
 M R G S H H H H H G I L P E T C
 GGGACTATGGTGAGAGCGCTGATGCCGTGCGTTCGTGCAGGGGAAA
 G T M V R A L M P C L P F V Q G K
 GAGAAAGAGCCGTCAAAGGGGCTGCAGATCCAGACCGCCATGAAGACTTAT
 E K E P S K G L Q I Q T A M K T Y
 TCCGACATCGACGGGAAACTCGTCAGCGAGGTCAGATCTAGCAAGCTCCCG
 S D I D G K L V S E V R S S K L P
 CCCATTGACGTCAACATGGACTGCAAGACACTTGGAGTGGTTCTCGGCAA
 P I D V N M D C K T L G V V P R Q
 CCCCACCTTCCAGTCTCTCTCGGTGATGGTCCCGTCACGGGCCCCAAGTGAT
 P Q L P V S L R H G P V T G P S D
 CCCGCCCCACAAAGCACGGTTGGAGAGACCCAGATTAGAGTTCGCCCCCCC
 P A H K A R L E R P Q I R V P P P
 GCACCGGAAAAAGCCGAATTCGAGGAGGCTTGCGGGAAAGTGGTGCAAGAT
 A P E K A E F E E A C G K V V Q D
 ATAATGCCGTGCCTGCATTTTCGTGAAGGGGGAGGAGAAGGAGCCGTCGAAG
 I M P C L H F V K G E E K E P S K
 GAGGATATCATAGTGCGCGCCACGAAGGGCATCTCCGGTATCAAAAATGAA
 E D I I V R A T K G I S G I K N E
 CTTGTGCGCCGAGGTCCCCGGTACCTCCCGCCCATCACGGCGGACTTCGAC
 L V A E V P E T L P P I T A D F D
 TGCTCCAAGATCCAAAGTACTATTTTCAGAGGTTACTAT
 C S K I Q S T I F R G Y Y

Figura 8

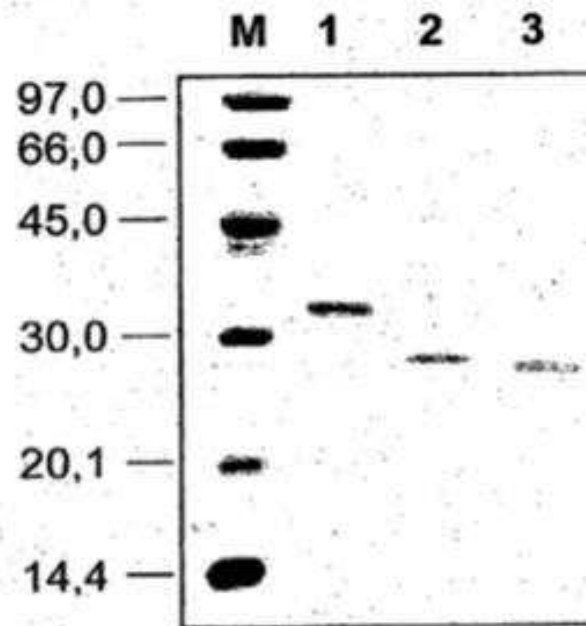


Figura 9

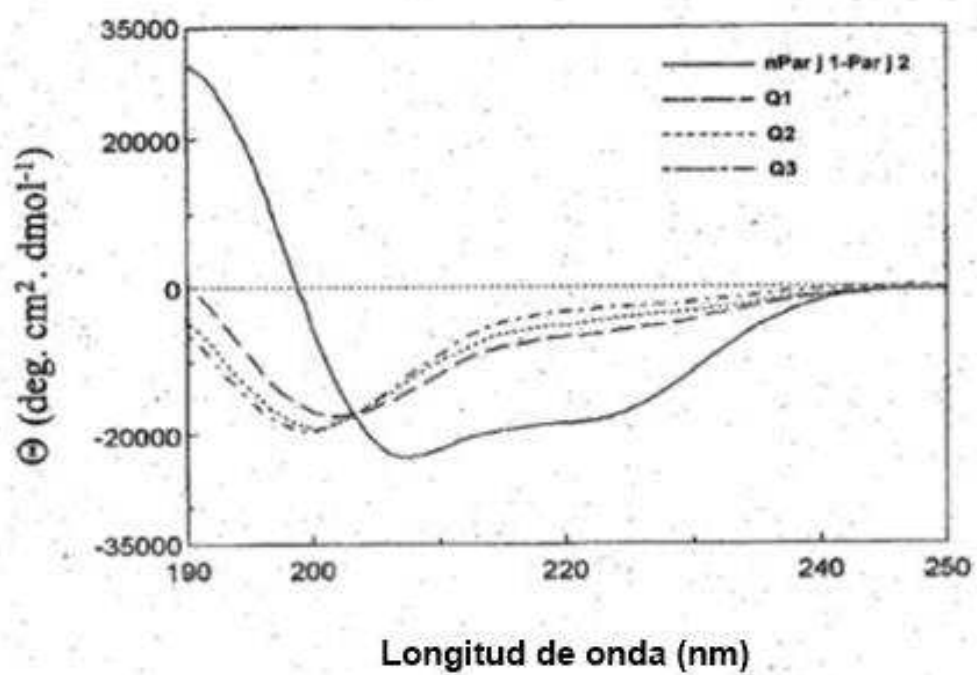


Figura 10

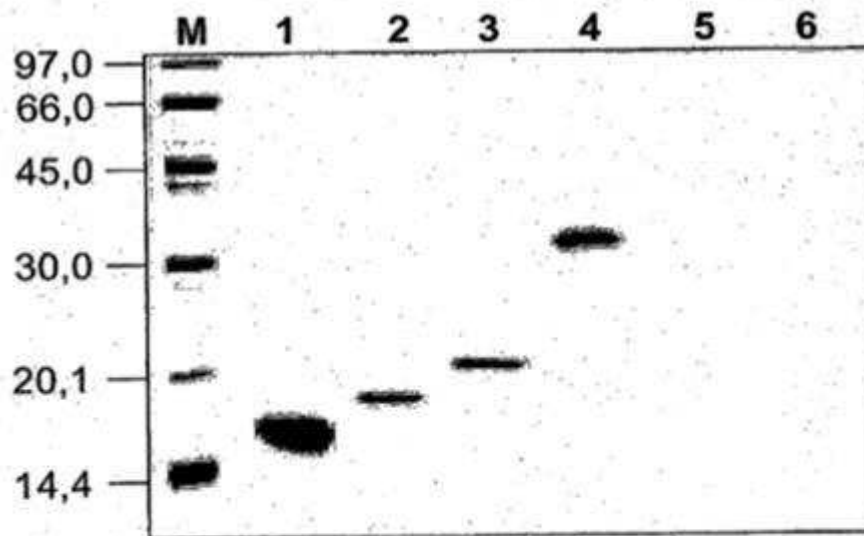


Figura 11

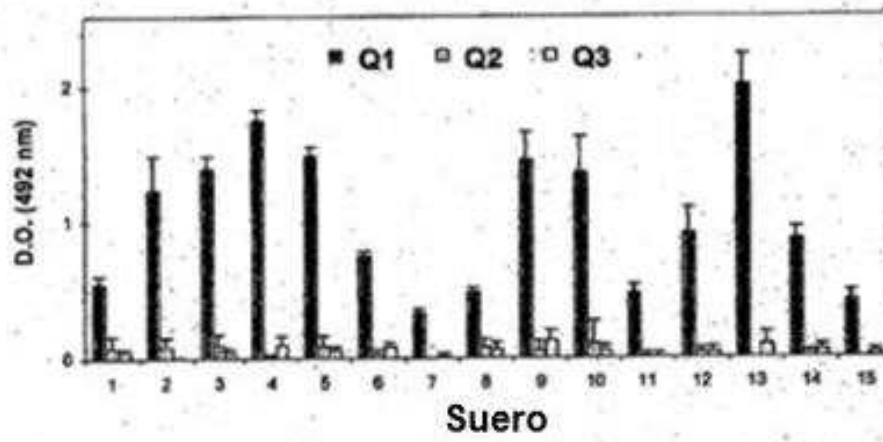


Figura 12

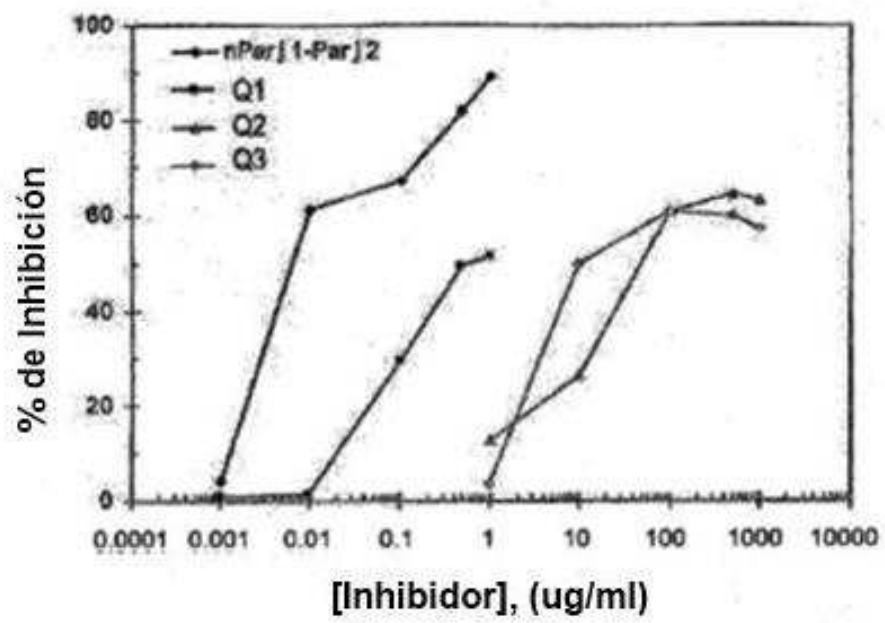


Figura 13

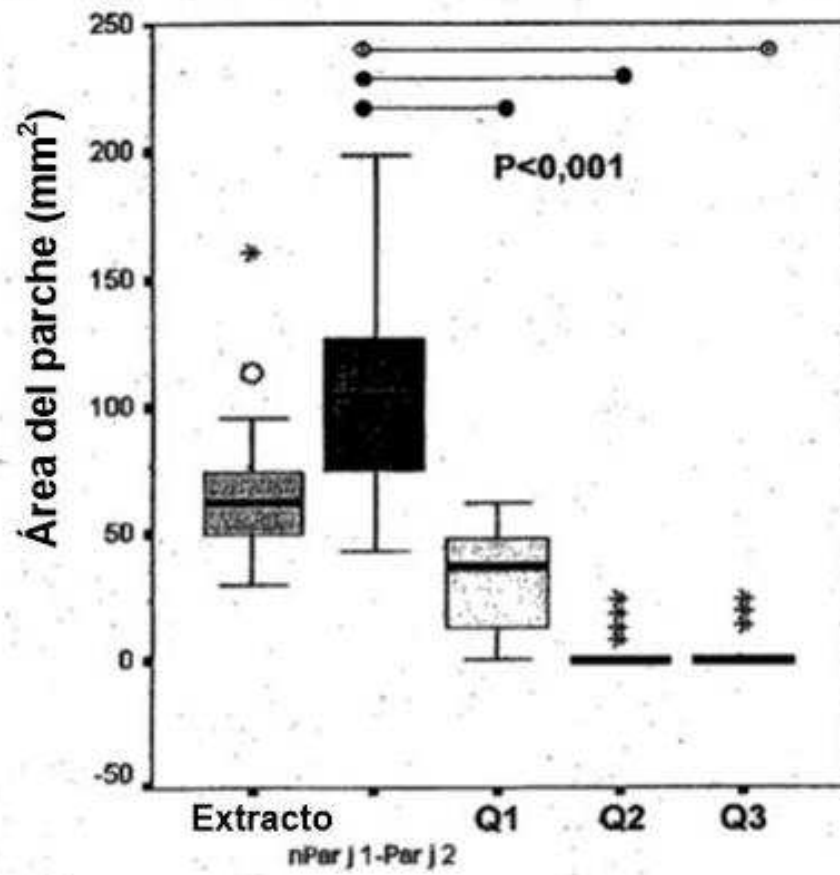


Figura 14

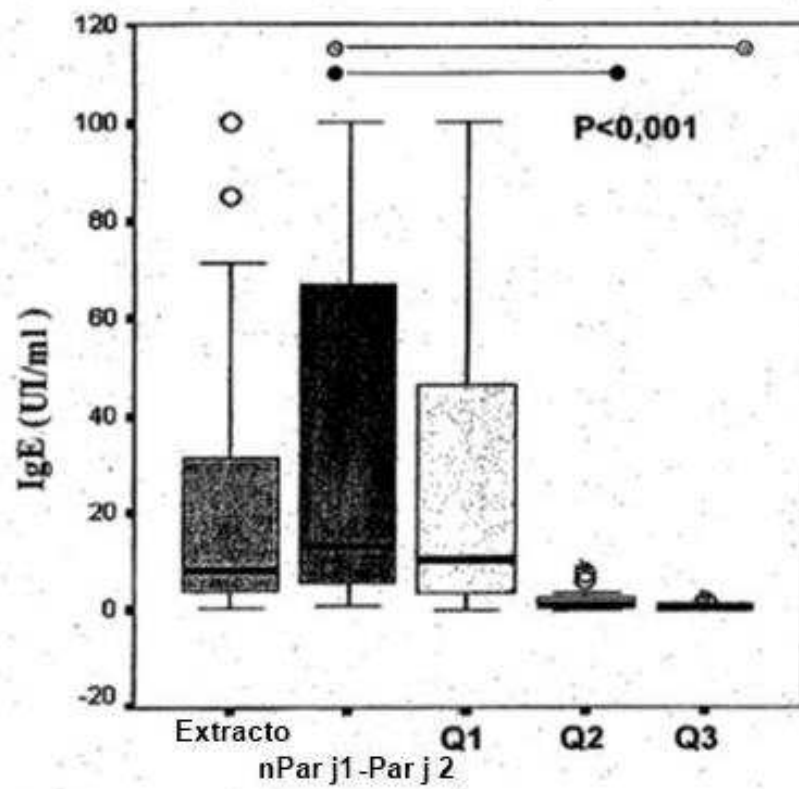


Figura 15

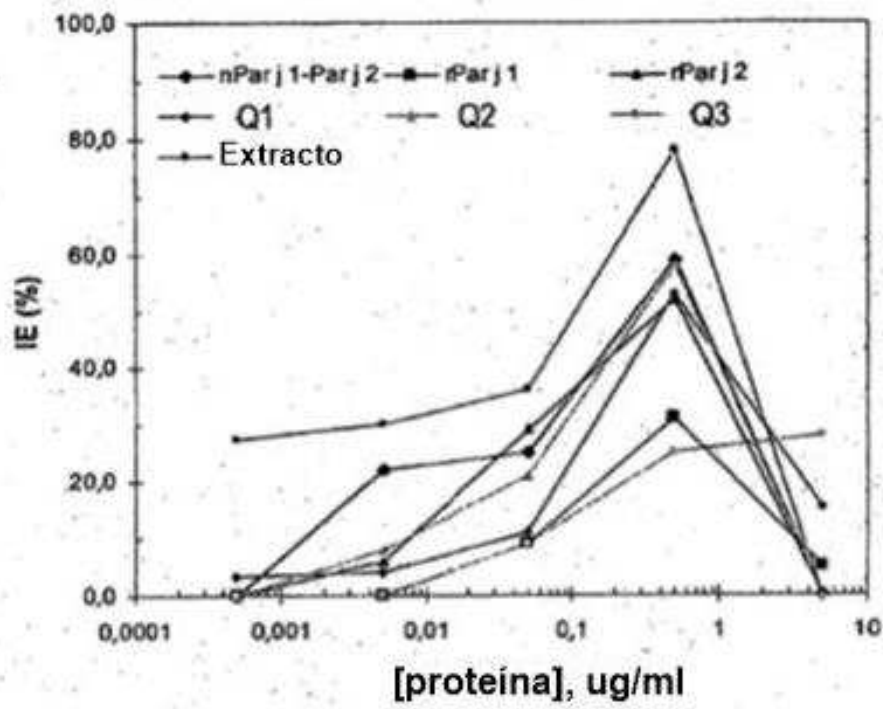


Figura 16

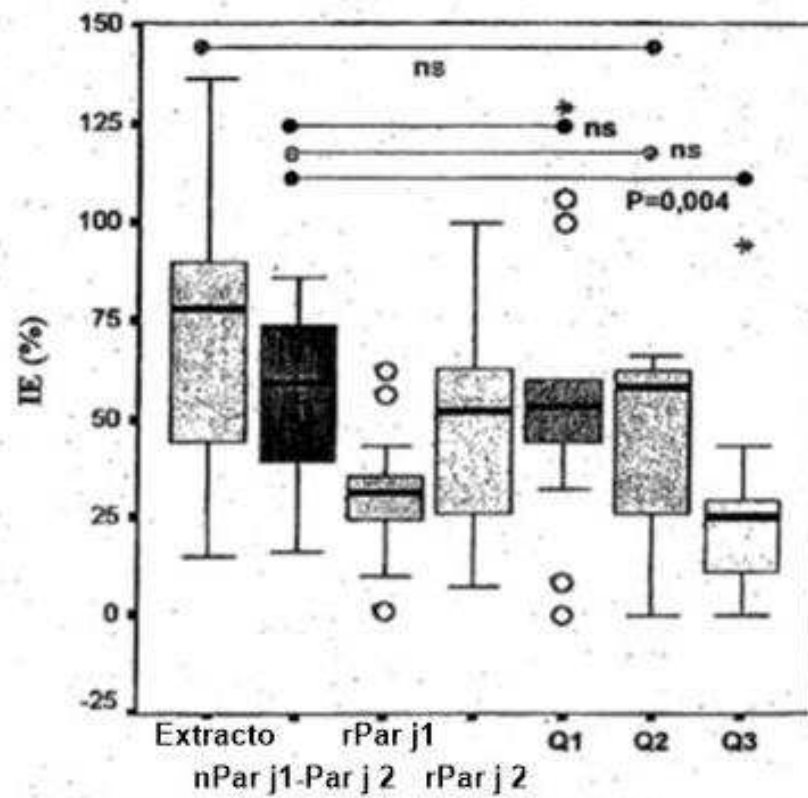


Figura 17