



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 067**

51 Int. Cl.:

A61K 39/36 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01130292 .4**

86 Fecha de presentación : **20.12.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1219301**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.07.2002**

54 Título: **Vacunas que contienen polipéptidos híbridos que consisten en al menos dos proteínas alergénicas diferentes.**

30 Prioridad: **28.12.2000 EP 00128660**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73 Titular/es: **BIOMAY Produktions- und Handels-
Aktiengesellschaft
Lazarettgasse 19
1090 Wien, AT**

72 Inventor/es: **Linhart, Birgit;
Kraft, Dietrich y
Valenta, Rudolf**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Vacunas que contienen polipéptidos híbridos que consisten en al menos dos proteínas alergénicas diferentes.

La alergia de tipo I es una enfermedad de hipersensibilidad determinada genéticamente que afecta a casi 500 millones de individuos en todo el mundo. Los síntomas tempranos (rinoconjuntivitis alérgica, asma, choque anafiláctico) así como los síntomas tardíos (dermatitis atópica, algunas formas de asma bronquial alérgica) se basan en el reconocimiento de los alérgenos por los anticuerpos IgE. Los síntomas instantáneos son resultado del entrecruzamiento inducido por los alérgenos de la IgE unida a las células efectoras y la posterior liberación de mediadores biológicos (por ejemplo, histamina, leucotrienos), mientras que los síntomas tardíos pueden estar causados por la presentación mediada por la IgE de alérgenos para la activación de los linfocitos T y de los eosinófilos.

El único tratamiento curativo, la inmunoterapia específica con alérgenos, se basa en la administración sistemática de alérgenos a los pacientes para inducir una "ausencia de respuesta" específica a los alérgenos [Noon, *Lancet* 191 1, 1: 1572-1573; Bousquet *et al.* (1998) *J. Allergy. Clin. Immunol.* 102: 558-562; Durham y Till (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 157-164]. Utilizando tecnologías convencionales no ha sido posible producir alérgenos puros para la inmunoterapia específica y, por lo tanto, las vacunas se realizan con extractos de alérgenos. Estos extractos consisten en alérgenos y componentes no alergénicos que son difíciles de estandarizar. Por lo tanto, los pacientes no se pueden tratar según su perfil de sensibilización específica y, frecuentemente, se observan efectos secundarios anafilácticos debidos a la administración de material alergénico [Mellerup *et al.* (2000). *Clin. Exp. Allergy* 30, 1423-1429].

Un objetivo de la presente invención es dar a conocer una composición ventajosa para el tratamiento o la prevención de los trastornos alérgicos.

Sorprendentemente, los inventores encontraron que es posible generar alérgenos híbridos que reúnen los epítomos de alérgenos inmunitariamente diferentes para el diagnóstico y el tratamiento de la alergia de tipo I. Por lo tanto, la invención se refiere a un polipéptido híbrido que comprende, al menos, dos proteínas alergénicas diferentes, o fragmentos de las mismas, en el que cada fragmento consiste en, al menos, ocho aminoácidos consecutivos de la proteína alergénica correspondiente, caracterizado por que la proteína alergénica de la que se obtiene el polipéptido híbrido consiste en los alérgenos principales de polen del fleo de los prados sin relación inmunitaria entre ellos.

En una realización, el polipéptido híbrido comprende, al menos, una proteína alergénica completa. También puede comprender dos proteínas alergénicas completas diferentes. No sólo es posible combinar diferentes grupos de polen de gramíneas alergénicas sino también combinar proteínas alergénicas obtenidas de diferentes fuentes. En una realización específica, todas las secuencias del polipéptido híbrido obtenido de proteínas alergénicas representan las proteínas alergénicas completas.

En otra realización, el polipéptido híbrido comprende, al menos, un fragmento de una proteína alergénica, en el que el fragmento consiste en, al menos, ocho aminoácidos consecutivos de la proteína alergénica correspondiente. Preferiblemente, el fragmento consiste en al menos 12, más preferiblemente al menos 20, y lo más preferiblemente al menos 30, aminoácidos consecutivos de las proteínas alergénicas correspondientes. En otra realización, todas las secuencias de aminoácidos obtenidas de proteínas alergénicas son fragmentos de, al menos, 8 aminoácidos consecutivos de las proteínas alergénicas correspondientes de las que derivan. La longitud preferida de estos fragmentos es al menos 12, más preferiblemente al menos 20 y, lo más preferiblemente, al menos 30 aminoácidos consecutivos de la proteína alergénica correspondiente.

Cuando se emplean fragmentos de proteínas alergénicas, es posible preparar un polipéptido híbrido que comprende sólo fragmentos que tienen una actividad alergénica que es inferior en comparación con las proteínas alergénicas correspondientes de la que derivan. Este efecto se puede deber a la destrucción de epítomos debido a la modificación de la estructura secundaria o terciaria del fragmento en comparación con la proteína completa. En la realización más preferida, el polipéptido híbrido tiene una actividad alérgica que es menor que la actividad alergénica de cada una de las proteínas alergénicas de las que se obtiene el polipéptido híbrido. Normalmente, la actividad alergénica del polipéptido híbrido es de menos del 50% de la de cada una de las proteínas alergénicas de las que se obtiene el polipéptido híbrido. En una realización particular, el polipéptido híbrido no tiene actividad alergénica en esencia.

De acuerdo con la invención, la actividad alergénica de una muestra se determina determinando los anticuerpos IgE que se inducen en un animal de prueba al aplicarle la muestra. La actividad alergénica se define preferiblemente en las pruebas *in vitro* e *in vivo* adecuadas. Una prueba *in vitro* preferida es el análisis de liberación de histamina de los basófilos como se describe en Vrtala *et al.* *J. Clin. Invest.* 1997, 99, pp. 1673-1681. Alternativamente, la actividad alergénica se determina en una prueba cutánea como se describe en van Hage-Hamsten *et al.* *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999, 104, pp. 969-977 o en Pauli *et al.* *Clin. Exp. Allergy* 2000, 30, pp. 1076-1084.

En una realización, el polipéptido híbrido comprende dos porciones que se obtienen de dos proteínas alergénicas diferentes. Sin embargo, el polipéptido híbrido de la invención puede comprender tres, cuatro, cinco o incluso más trozos, cada uno de los cuales se obtiene de una proteína alergénica diferente.

El polipéptido híbrido de la invención no consiste necesariamente sólo en secuencias de aminoácidos obtenidas de proteínas alergénicas. Es posible que se hayan introducido secuencias artificiales (por ejemplo, secuencias es-

paciadoras) entre las unidades que representan secuencias de proteínas alergénicas diferentes. También es posible modificar las secuencias de aminoácidos de las proteínas alergénicas que se producen en la naturaleza, por ejemplo mediante ingeniería genética, para introducir mutaciones que reducen la actividad alergénica del fragmento. También se prefiere que el polipéptido híbrido comprenda una secuencia “etiquetadora” (*tag*) que facilite la purificación del polipéptido híbrido cuando se expresa en una célula hospedadora. Un ejemplo de una “etiqueta” es la etiqueta de hexahistidina que permite la purificación mediante la cromatografía de quelatos de Ni^{2+} . En la técnica se conocen otras etiquetas.

El polipéptido híbrido de la invención se puede preparar mediante varios métodos. En una realización, el polipéptido se prepara expresando un polinucleótido en una célula hospedadora. La célula hospedadora puede ser una célula procariótica o eucariótica. Si se utilizan células procarióticas, el hospedador es preferiblemente *E. coli*. Ejemplos de células eucarióticas son la levadura, las células de insectos o las estirpes celulares como las células CHO. Después de introducir un polipéptido adecuado que codifica el polipéptido de la invención en una célula hospedadora, se cultiva la célula hospedadora en las condiciones que hacen que el polipéptido se exprese en la célula. El polipéptido puede ser secretado por la célula o acumularse dentro de la célula. Se pueden utilizar métodos de purificación conocidos para recuperar el polipéptido híbrido a partir de la célula o del medio de cultivo.

La invención también abarca la preparación del polipéptido híbrido mediante síntesis química, tal como la síntesis en fase sólida.

Además, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido híbrido de acuerdo con la invención. Debido a la degeneración del código genético, muchas moléculas polinucleotídicas diferentes pueden codificar un único polipéptido. El polinucleótido de la invención es preferiblemente una construcción de expresión para obtener el polipéptido después de que se exprese en las células hospedadoras. La construcción de expresión puede comprender además compuestos que generalmente se conocen en la técnica como secuencias promotoras, genes que codifican factores de resistencia a los antibióticos, un origen de replicación, etc.

La invención además se refiere a una célula transfectada o transformada con un polinucleótido de la invención. La célula puede ser una célula procariótica o eucariótica. Las células eucarióticas se pueden transfectar mediante un método conocido propiamente dicho tal como transfección mediada por el fosfato de calcio, electroporación, lipofección, etc.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que contiene un polipéptido, polinucleótido o célula de acuerdo con la invención. La composición farmacéutica puede contener además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable tal como un tampón o una disolución salina. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la invención es una composición de vacuna. En una realización particular, la composición farmacéutica contiene además un adyuvante tal como $\text{Al}(\text{OH})_3$.

La invención también se refiere a un método para la preparación de un polipéptido híbrido de la invención. El método comprende proporcionar un polinucleótido que codifica un polipéptido híbrido, introducir dicho polinucleótido en una célula hospedadora, cultivar la célula hospedadora así obtenida en las condiciones que hacen que se exprese el polipéptido híbrido, y recuperar el producto de expresión de la célula. El polinucleótido se puede preparar mediante los métodos conocidos en la técnica, y se prefiere utilizar la tecnología de la PCR para preparar el polinucleótido que codifica el polipéptido híbrido.

La invención se refiere además al uso de un polipéptido híbrido, de un polinucleótido o de una célula de la invención para la preparación de un fármaco para el tratamiento de un trastorno alérgico.

Tal fármaco puede estar compuesto del polinucleótido que codifica una vacuna híbrida que se puede utilizar directamente para la vacunación a base de ADN contra la alergia de tipo I. El polipéptido híbrido recombinante o sintético se puede utilizar para preparar formas farmacéuticas para el tratamiento por vía oral, sublingual o parenteral de los trastornos alérgicos de tipo I tal y como se utilizan en la actualidad de forma sistemática para la inmunoterapia. Son ejemplos las formas farmacéuticas para inmunoterapia sublingual o los polipéptidos híbridos unidos a un adyuvante para la inmunoterapia mediante inyección. Las posibles aplicaciones comprenden también formas de inmunoterapia a base de células que pueden estar basadas en, por ejemplo, células dendríticas u otras células presentadoras de antígeno. Se transforman dichas células y se expresa el antígeno *in vivo*. Preferiblemente, se utilizan células autólogas transformadas con los vectores adecuados.

Un modo de aplicaciones puede ser la inyección subcutánea de polipéptidos híbridos unidos a un adyuvante. Otra posibilidad es la administración oral o nasal del polipéptido híbrido para inducir la tolerancia inmunitaria o anergia contra los componentes de los polipéptidos híbridos. Todas estas formas farmacéuticas posibles se pueden preparar de acuerdo con las normas (dosis, adyuvantes, pautas de administración) conocidas por el experto en la técnica.

La invención también se refiere al uso de un polipéptido híbrido, de un polinucleótido o de una célula de la invención para la preparación de un fármaco para la vacunación profiláctica o la inducción de la tolerancia. La administración profiláctica de polipéptidos híbridos significa la administración del polipéptido a individuos, preferiblemente niños que todavía no padecen la alergia de tipo I, para inducir un estado de tolerancia inmunitaria, anergia o ausencia de respuesta, o una inmunidad protectora contra los compuestos de la vacuna híbrida. Esto se puede conseguir

mediante los diferentes protocolos descritos en líneas generales para el tratamiento de un trastorno alérgico comprobado. Se puede realizar el tratamiento profiláctico con polipéptidos híbridos que consisten en polipéptidos híbridos o polinucleótidos que codifican los polipéptidos híbridos que se describieron en líneas generales anteriormente.

5 En otra realización, la invención se refiere al uso de un polipéptido híbrido de la invención para detectar anticuerpos contra una proteína alergénica en una muestra. El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgM, IgE, IgG o IgA. La concentración del anticuerpo se puede determinar a partir de una muestra que se haya obtenido de un líquido corporal. La muestra se puede obtener de animales o humanos. Tales pruebas pueden utilizar un polipéptido híbrido inmovilizado en fase sólida o el polipéptido híbrido en la fase líquida. Ejemplos de tales pruebas pueden ser los análisis por
10 ELISA, los análisis de inmunotransferencia o cualquier otra prueba donde el polipéptido híbrido se inmoviliza para unirse a los anticuerpos específicos que hay en la muestra a analizar. Alternativamente, el polipéptido híbrido se añade directamente al líquido que contiene anticuerpos para adsorber los anticuerpos específicos como, por ejemplo, se hace para los inmunoanálisis de competición.

15 El polipéptido de la invención también se puede utilizar para análisis celulares tales como la prueba de proliferación de linfocitos T, la prueba de liberación de mediadores, etc. El polipéptido híbrido puede exponerse a varios tipos de células para desencadenar respuestas medibles. Tales respuestas pueden comprender la liberación de histamina u otros mediadores (por ejemplo, leucotrienos, serotonina, ECP) en el caso de las células efectoras alérgicas (por ejemplo, mastocitos, basófilos, eosinófilos). En otro tipo de análisis, se puede medir la proliferación o la muerte (por ejemplo, apoptosis) de las células, por ejemplo mediante la captación de ³H-timidina o cualquier otro análisis adecuado. Tales
20 células pueden ser linfocitos T. Además, se pueden utilizar polipéptidos híbridos para inducir la liberación de citocinas u otras sustancias relevantes inmunitariamente (por ejemplo, desde los linfocitos T) y cuantificables. Además, se pueden utilizar para los análisis de presentación de antígenos. El polipéptido híbrido de la invención también se puede utilizar con vistas a la detección diagnóstica. También se pueden utilizar polipéptidos híbridos para la prueba de provocación *in vivo*. Tales pruebas pueden comprender una prueba cutánea (por ejemplo, prueba de punción o intradermorreacción), la prueba de provocación nasal, todos los tipos de pruebas de tolerancia a los alimentos o las pruebas de provocación bronquial.

Dado que los polipéptidos híbridos pueden contener epítopos de alérgenos sin relación entre ellos, se pueden uti-
30 lizar para pruebas de detección diagnósticas (*in vitro* e *in vivo*, como se describió anteriormente) para detectar la sensibilización o la incapacidad de respuesta contra uno de los componentes del polipéptido híbrido. Esto también proporciona al médico una prueba diagnóstica adecuada para detectar los pacientes sensibilizados de un modo rápido. Actualmente, tales pruebas (por ejemplo, Phadiatop, Pharmacia, Uppsala, Suecia) consisten en una mezcla de alérgenos unidos no covalentemente que se acoplan a un vehículo. Por lo tanto, la tasa de unión de cada compuesto es difícil
35 de controlar mientras que un polipéptido híbrido representaría una forma farmacéutica preferencial para la preparación de tal prueba de detección.

Más del 40% de los pacientes alérgicos son sensibles al polen de diferentes especies de gramíneas. Las gramíneas también son fuentes alérgicas importantes debido a su distribución mundial y a la gran cantidad de polen que producen. Contienen una serie de compuestos alérgicos diferentes que aparecen como alérgenos de reacción cruzada en diferentes monocotiledóneas. Los inventores demostraron que es posible generar, mediante la tecnología del ADN recombinante, alérgenos híbridos que consisten en alérgenos sin relación inmunitaria y sus epítopos.

En una primera etapa, se determinaron las cosensibilizaciones frecuentes utilizando alérgenos recombinantes purificados del polen del fleo de los prados para seleccionar las combinaciones de alérgenos reconocidas con más frecuencia por el método del alérgeno híbrido. De acuerdo con los experimentos piloto, se fabricaron híbridos que consisten en los principales alérgenos del polen del fleo de los prados sin relación inmunitaria. Comprenderían los híbridos de los principales alérgenos del polen del fleo de los prados Phl p 5/Phl p 1, Phl p 2/Phl p 6 y una combinación de las cuatro moléculas. Tal y como se demostró para Phl p 2/Phl p 6, no encontramos ninguna prueba de que un determinado orden
50 de fabricación para los compuestos por separado afectara la presentación de los epítopos. Ambos, el híbrido rPhl p 2/Phl p 6 y el híbrido rPhl p 6/Phl p 2 conservaron los epítopos de los componentes relevantes para los linfocitos T y B. El gigante que consiste en los 4 alérgenos también contenía los epítopos relevantes de cada uno de los componentes.

El método de alérgenos híbridos abrirá nuevas vías para el diagnóstico y el tratamiento de la alergia de tipo I.
55 Los híbridos que consisten en los alérgenos reconocidos con más frecuencia y los epítopos conservados representan moléculas candidatas para las pruebas de detección de alergia *in vitro* así como *in vivo*. El gigante descrito en la presente solicitud probablemente identificará más del 95% de los pacientes alérgicos al polen del fleo de los prados cuando se utiliza para el diagnóstico porque se parece a la mayoría de los epítopos relevantes para la IgE presentes en extracto de polen del fleo de los prados natural. Las moléculas como el gigante se pueden producir también para otros
60 sistemas de alérgenos (por ejemplo, alergia a los ácaros). La ventaja de utilizar alérgenos híbridos para el diagnóstico es que se pueden producir de una manera bien controlada. A diferencia de los extractos de alérgenos naturales, que consisten en una dificultad para estandarizar una mezcla de alérgenos y de materiales no alergénicos, los alérgenos híbridos contendrán los epítopos relevantes en una proporción bien definida.

65 Los alérgenos híbridos recombinantes también se pueden utilizar para la inmunoterapia. Pueden estar compuestos de los compuestos biológicamente activos o de unidades de alérgenos hipoalergénicas. A continuación, los alérgenos híbridos que cubren patrones de consensibilización frecuente se pueden utilizar para el tratamiento de alergias con el objeto de que se complejen con fuentes de alérgenos, por ejemplo la alergia al polen de las gramíneas, porque se

parecen a los epítomos relevantes del extracto total. Ya que los alérgenos híbridos consisten en componentes definidos, será posible producir formas farmacéuticas bien definidas para el tratamiento por vacunación. Los alérgenos híbridos producidos de las variantes hipoalérgicas se tolerarán a grandes dosis y, por lo tanto, se pueden utilizar regularmente como vacunas que se usan para la prevención de infecciones víricas. En este sentido, se puede considerar la utilización de alérgenos híbridos que contienen los epítomos de la mayoría de los alérgenos relevantes para la vacunación profiláctica o la inducción de la tolerancia incluso en los individuos que todavía están sin sensibilizar.

El hecho de que la fusión de diferentes compuestos antigénicos en forma de una molécula híbrida aumentase la inmunogenia de los compuestos individuales tiene varias implicaciones para la inmunoterapia específica de alérgenos y para la vacunación en general. Los alérgenos o los antígenos contra los cuales se desean respuestas inmunitarias y que muestran por sí mismos una inmunogenia baja, se pueden fusionar a los híbridos para aumentar su inmunogenia sin utilizar otros adyuvantes o proteínas transportadoras. Este principio permitirá inducir unos niveles elevados de respuestas protectoras con anticuerpos contra alérgenos, fragmentos de alérgenos, epítomos de alérgenos e imitaciones de los mismos. Utilizando este principio, también es posible aumentar la respuesta inmunitaria frente a epítomos de antígenos obtenidos de agentes infecciosos, tumores u otros compuestos frente a los cuales es difícil inducir respuestas inmunitarias.

Descripción de las tablas y figuras

La tabla 1 muestra el porcentaje de inhibición de la unión de IgE a Phl p 2 y Phl p 6 recombinantes conseguida después de la preadsorción de suero de 20 pacientes con los alérgenos híbridos (rPhl p 2/rPhl p 6, rPhl p 6/rPhl p 2) o los alérgenos recombinantes (rPhl p 2, rPhl p 6).

La tabla 2 muestra el porcentaje de inhibición de la unión de IgE a Phl p 1, Phl p 5 y Bet v 1 recombinantes conseguida después de la preadsorción de suero de 20 pacientes con el alérgeno híbrido rPhl p 5/rPhl p 1 o los alérgenos recombinantes (rPhl p 1, rPhl p 5, y rBet v 1).

Tabla 3. Los antisueros de ratón generados contra las moléculas híbridas inhiben la unión de la IgE a los distintos alérgenos en los pacientes alérgicos al polen de las gramíneas. Los alérgenos unidos en la placa de ELISA (A: rPhl p 2 y rPhl p 6; B: rPhl p 1 y rPhl p 5) se preincubaron con antisueros de ratón (anti-rP2-P6, anti-rP6-P2, anti-rPhl p 2, anti-rPhl p 6, anti-rP5-P1, anti-rPhl p 1, anti-rPhl p 5 de ratón). Se muestran los porcentajes de inhibición de la unión de la IgE obtenidos de 4 pacientes alérgicos al polen de las gramíneas.

La figura 1 muestra la frecuencia de cosensibilización a los alérgenos del polen del fleo de los prados rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, y rPhl p 6 que se determinó en una población de 110 pacientes alérgicos al polen de las gramíneas.

La figura 2 ilustra la construcción de las vacunas híbridas. La fusión de los dos genes (por ejemplo, Phl p 5, Phl p 1) está mediada por una reacción de PCR de dos fases, lo que crea unos extremos solapantes en la primera reacción de PCR seguido de la amplificación de ambas secuencias en una segunda fase de la PCR.

La figura 3 muestra el resultado del ejemplo 3. Los alérgenos del polen del fleo de los prados purificados (rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, y rPhl p 6) y sus híbridos (rPhl p 5/rPhl p 1, rPhl p 2/rPhl p 6, y rPhl p 6/rPhl p 2) se cargaron en un gel de poliacrilamida en SDS y se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Las masas moleculares se muestran en el margen izquierdo.

En la figura 4 (A), un híbrido recombinante purificado que consiste en Phl p 6/Phl p 2/Phl p 5/Phl p 1 se transfirió de manera puntiforme sobre filtros de nitrocelulosa. En la fila (B), se inmovilizaron rPhl p 2 (carriles 1, 3, 4 y 5) y rPhl p 5 (carril 2). Los filtros se incubaron con antisuero de conejo contra rPhl p 1 (carril 1), rPhl p 2 (carril 2), rPhl p 5 (carril 3), y rPhl p 6 (carril 4). El filtro en el carril 5 se expuso a un anticuerpo monoclonal de ratón anti-etiqueta de histidinas.

Las figuras 5 a 7 muestran que las moléculas híbridas recombinantes inducen respuestas más fuertes de anticuerpos IgG en los ratones que los compuestos individuales o las mezclas de los mismos.

Figura 5. Los alérgenos recombinantes purificados unidos a placas de ELISA (A: rPhl p 2; B: rPhl p 6; C: rPhl p 1; D: rPhl p 5) se incubaron con suero de ratón (8 ratones por grupo) que se habían inmunizado con moléculas híbridas (rP2-P6, rP6-P2, rP5-P1), los alérgenos recombinantes individuales (rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, rPhl p 6), o con extracto del polen del fleo de los prados, tal y como se indica en el eje x. Los niveles medios de la IgG₁ en suero recogido 4 y 8 semanas después de la inmunización corresponden a los valores de DO mostrados en el eje y.

Figura 6. Los alérgenos recombinantes purificados unidos a placas de ELISA (rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, rPhl p 6) se incubaron con suero de ratones (8 ratones por grupo) que se habían inmunizado con (A) la molécula gigante o los alérgenos recombinantes individuales rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, rPhl p 6, y con (B) la molécula gigante o una mezcla equimolar de rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, y rPhl p 6, tal y como se indica en el eje x. Los niveles medios de la IgG₁ en suero recogido 4 y 8 semanas después de la inmunización corresponden a los valores de DO mostrados en el eje y.

Figura 7. El gigante unido a la placa de ELISA (A), y el extracto de polen del fleo de los prados (B) se incubaron con suero de ratones (8 ratones por grupo) que se habían inmunizado con el gigante o con extracto del polen del fleo

de los prados tal y como se indica en el eje x. Los niveles medios de la IgG₁ en suero recogido 4 y 8 semanas después de la inmunización corresponden a los valores de DO mostrados en el eje y.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención:

5

Ejemplo 1

Determinación de los patrones de cosensibilización frecuentes

10 El polen de las gramíneas contiene una serie de alérgenos distintos y relacionados inmunitariamente. Estos compuestos se reconocen con diferentes frecuencias e intensidades. Los alérgenos recombinantes del polen del fleo de los prados, rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, y rPhl p 6 se identificaron previamente como los compuestos más importantes que se parecen más a los epítomos para la IgE de los extractos naturales del polen de las gramíneas [Niederberger *et al.* (1998) "IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE". *J Allergy Clin Immunol* 101: 258-264]. Los resultados de la evaluación de las cosensibilizaciones en 110 pacientes alérgicos al polen de las gramíneas a combinaciones de los alérgenos recombinantes del polen del fleo de los prados se muestran en la figura 1. Los análisis de ELISA con alérgenos recombinantes purificados demostraron que el 60% de los pacientes estaban cosensibilizados a rPhl p 1 y rPhl p 5, que el 30% contenía anticuerpos IgE contra rPhl p 2 y rPhl p 6, y que el 30% reaccionaba simultáneamente a los cuatro alérgenos recombinantes (figura 1). Los estudios de competición previos indicaron que una mezcla de los cuatro alérgenos anteriormente citados contenía la mayor parte de los epítomos para la IgE presentes en 8 pólenes de monocotiledóneas diferentes (gramíneas, maíz) [Laffer *et al.* (1996) "Comparison of recombinant timothy grass pollen allergens with natural extract for diagnosis of grass pollen allergy in different populations". *J Allergy Clin Immunol*; 98 652-658].

25 Suero de pacientes, antisueros y alérgenos recombinantes:

El suero de 110 pacientes alérgicos se caracterizó mediante un resultado positivo del análisis RAST (análisis radioalergosorbente) para el polen del fleo de los prados y mediante la determinación de anticuerpos IgE contra extractos del polen del fleo de los prados por análisis de inmunotransferencia tal y como está descrito [Niederberger *et al.* (1998) *J Allergy Clin Immunol* 101: 258-264]. Los alérgenos recombinantes del polen del fleo de los prados rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, y rPhl p 6 se purificaron tal y como se describió previamente [Vrtala *et al.* (1995) *J. Allergy Clin. Immunol.* 97: 781-787; Vrtala *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163: 5489-5496]. Se generaron los antisueros de conejo anti-rPhl p 1, anti-rPhl p 2, anti-rPhl p 5, y anti-rPhl p 6 contra rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5 y rPhl p 6 purificados utilizando CFA (Charles River, Kisslegg, Alemania).

35

Ejemplo 2

Construcción de alérgenos híbridos recombinantes

40 El protocolo para la construcción de los alérgenos híbridos recombinantes se muestra en la figura 2. Tal y como se ejemplificó para un híbrido que consiste en rPhl p 5 unido a rPhl p 1, los ADNc que codifican los compuestos se amplifican con las parejas de cebadores adecuados (figura 2: Phl p 5: w, x; Phl p 1: y, z) para crear extremos solapantes. En una segunda reacción de PCR posterior, se crea un ADNc que comprende ambos ADNc mediante cebadores específicos para el extremo 5' del primer ADNc (Phl p 5: w) y el extremo 3' del segundo ADNc (Phl p 1: z) utilizando ambos los productos de PCR de las primeras reacciones como moldes. Mediante esta tecnología, se produjeron híbridos recombinantes que consistían en una combinación de Phl p 5/Phl p 1, rPhl p 2/rPhl p 6, rPhl p 6/rPhl p 2 y de los cuatro alérgenos (extremo amino-rPhl p 6-rPhl p 2-rPhl p 5-rPhl p 1-extremo carboxilo), denominándose el último el "gigante".

50 Construcción de los plásmidos de expresión para las proteínas híbridas rPhl p 5/rPhl p 1, rPhl p 2/rPhl p 6, rPhl p 6/rPhl p 2 y rPhl p 6/rPhl p 2/rPhl p 5/rPhl p 1.

Los ADNc de Phl p 5 y Phl p 1 se obtuvieron mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando los cebadores 5' GGA ATT CAT ATG GCC GAT CTC GGT TAC 3' (SEQ ID n.º 1) y 5' CGG GGT ACC GAC TTT GTA GCC ACC AGT 3' (SEQ ID n.º 2) para Phl p 5 y 5' CGG GGT ACC ATG ATC CCC AAG GTT CCC 3' (SEQ ID n.º 3) y 5' CGG GAT CCT CAG TGG TGG TGG TGG TGG TGC TTG GAC TCG TAG CTG GT 3' (SEQ ID n.º 4) para Phl p 1. El péptido señal de Phl p 5 se reemplazó por un sitio de restricción *NdeI*, que contiene el codón de inicio ATG en el extremo 5' de la región codificante. Se introdujo un sitio de restricción *KpnI* en el extremo 3' de Phl p 5 que reemplazó el codón de parada. La secuencia Phl p 1, que carece del péptido señal, comenzaba con un sitio de restricción *KpnI* en el extremo 5'. En el extremo 3', se introdujo una cadena de nucleótidos que codifica la etiqueta de hexahistidina, seguida de un codón de parada y un sitio de restricción *BamHI*. Los productos de la PCR se introdujeron como fragmento *NdeI/KpnI/BamHI* en el vector de expresión pET17b.

65 Las secuencias Phl p 2/Phl p 6 y Phl p 6/Phl p 2 se construyeron utilizando el empalme génico por extensión del solapamiento (*gene SOEing*) (17) basada en la PCR. En una primera reacción de PCR, los ADNc de Phl p 2 y Phl p 6 se amplificaron utilizando los cebadores 5' GGA ATT CAT ATG GTG CCG AAG GTG ACG 3' (SEQ ID n.º 5), y 5' CGT GGC CTT CCC CAT AAG CTT CTC TTC TGG CGC GTA GGT 3' (SEQ ID n.º 6) para Phl p 2 y 5' AAG CTT ATG GGG AAG GCC ACG ACC 3' (SEQ ID n.º 7) y 5' C GGG ATC CTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTG CGC

GCC GGG CTT GAC AGC 3' (SEQ ID n.º 8) para Phl p 6 para crear extremos solapantes. En una reacción de PCR posterior, dos productos de PCR purificados en gel de agarosa (utilizando el kit de purificación en gel de QIAGEN) se utilizaron como moldes y se amplificaron utilizando los cebadores 5' 3' (SEQ ID n.º 9) y 5' 3' (SEQ ID n.º 10). El péptido señal de Phl p 2 se reemplazó mediante un sitio de restricción *NdeI* en el extremo 5', y se eliminó el codón de parada en el extremo 3'. En la secuencia de Phl p 6, que también carece de péptido señal, se introdujo la etiqueta de hexahistidina seguida de un codón de parada y un sitio de restricción *BamHI*. La construcción Phl p 2/Phl p 6 resultante se introdujo como fragmento *NdeI/BamHI* en el vector de expresión pET17b.

La secuencia de Phl p 6/Phl p 2 se construyó utilizando el mismo método con los cebadores de PCR 5' GGA ATT CAT ATG GGG AAG GCC ACC GAG 3' (SEQ ID n.º 11) y 5' CAC CTT CGG CAC CAT AAG CTT CGC GCC GGG CTT GAC AGC 3' (SEQ ID n.º 12) para Phl p 6 y 5' AAG CTT ATG GTG CCG AAG GTG ACG 3' (SEQ ID n.º 13) y 5' C GGG ATC CTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG CTC TTC TGG CGC GTA GGT 3' (SEQ ID n.º 14) para Phl p 2 en la primera reacción de PCR, y los cebadores 5' GGA ATT CAT ATG GGG AAG GCC ACC GAG 3' (SEQ ID n.º 15) y 5' C GGG ATC CTA GTG GTG GTG GTG GTG CTC TTC TGG CGC GTA GGT 3' (SEQ ID n.º 16) para la segunda reacción de PCR. La construcción Phl p 6/Phl p 2 resultante se introdujo en el vector pET17b como un fragmento *NdeI/BamHI*.

Para la construcción del híbrido Phl p 6/Phl p 2/Phl p 5/Phl p 1 ("gigante"), se tomó la construcción Phl p 6/Phl p 2 como molde en una reacción de PCR con los cebadores 5' GGA ATT CAT ATG GGG AAG GCC ACC GAG 3' (SEQ ID n.º 17) y 5' GGG ATT TCC ATA TGC TCT TCT GGC GCG TAG G 3' (SEQ ID n.º 18) que reemplaza la etiqueta de hexahistidina en 3' y el codón de parada por un sitio de restricción *NdeI*. Se clonó la secuencia en el vector pET17b, que contiene la construcción Phl p 5/Phl p 1 como un fragmento *NdeI*. La orientación correcta del inserto se examinó por digestión de restricción.

Ejemplo 3

Expresión y purificación de los alérgenos híbridos

Los alérgenos híbridos recombinantes con una etiqueta de hexahistidina en el extremo carboxilo se expresaron en *E. coli* BL21 (DE3) y se purificaron mediante cromatografía de afinidad de níquel. Los híbridos rPhl p 2/rPhl p 6 y rPhl p 6/rPhl p 2 se purificaron a partir de la fracción citoplásmica soluble de extractos de *E. coli* mientras que el híbrido rPhl p 5/rPhl p 1 y el "gigante" se solubilizaron en urea a partir de la fracción insoluble de cuerpos de inclusión de *E. coli*. La figura 3 muestra un SDS-PAGE teñido con Coomassie que contiene tres de los híbridos y los alérgenos recombinantes por separado. La masa molecular determinada mediante SDS-PAGE correspondía a la masa molecular calculada para los híbridos sobre la base de su secuencia de aminoácidos deducida (rPhl p 5/rPhl p 1: 60 kDa; rPhl p 2/rPhl p 6 y rPhl p 6/rPhl p 2: 22 kDa; "gigante": 82 kDa; datos no mostrados).

Protocolo experimental

Todas las construcciones se expresaron en *E. coli* BL21 (DE3). Las células se cultivaron en medio LB que contenía ampicilina a 100 mg/l hasta alcanzar una DO_{600} de 0,8. Se indujo la expresión de las proteínas recombinantes añadiendo isopropil-p-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,5 mM. Después de 4 horas a 37°C, se recogieron las células por centrifugación.

rPhl p 2/rPhl p 6 y rPhl p 6/rPhl p 2 se expresaron como proteínas solubles. Las células se resuspendieron en tampón de lisis (NaH_2PO_4 a 50 mM, NaCl a 300 mM, imidazol a 10 mM, pH 8,0) y se lisaron con un ultraturrax (Polytron, Kinematic AG, Suiza). Se centrifugó el lisado a 10 000 xg durante 30 minutos a 4°C para sedimentar los restos celulares. Se cargó el sobrenadante en una columna Ni-NTA (QIAGEN), se eluyeron las proteínas con imidazol a 250 mM y se dializó frente a agua.

rPhl p 5/rPhl p 1 y rPhl p 6/rPhl p 2/rPhl p 5/rPhl p 1 se expresaron en la fracción de cuerpos de inclusión. Se resuspendieron las células en Tris a 10 mM y Tritón al 0,1%, pH 7,4, y se lisaron añadiendo lisozima a 1 mg/ml. Después de centrifugar a 14 000 xg durante 20 minutos a 4°C, se lavó el sedimento 4 veces con Tris a 5 mM pH 8,0, NaCl a 0,05 M, desoxicolato al 0,25% y p-mercaptoetanol a 0,25 mM, y una vez con Tris a 10 mM, pH 8,0 e isopropanol al 3%. Se solubilizaron los cuerpos de inclusión con urea a 8 M, NaH_2PO_4 a 100 mM y Tris a 10 mM, pH 8,0. Después de centrifugar a 14 000 xg durante 20 minutos, se cargó el sobrenadante en una columna de Ni-NTA (QIAGEN). Se renaturalizaron las proteínas sobre la columna utilizando un gradiente de urea lineal de 6 M a 1 M en NaCl a 500 mM, glicerol al 20% y Tris a 20 mM, pH 7,4 durante un periodo de 1,5 horas (18). Se eluyeron las proteínas mediante la adición de imidazol a 250 mM y se dializaron frente PBS a pH 7,4.

Ejemplo 4

Los alérgenos híbridos contienen los epítomos relevantes de sus componentes

Los alérgenos híbridos recombinantes contenían las secuencias de aminoácidos primarias completas de sus componentes y, por lo tanto, el repertorio completo de epítomos de los alérgenos por separado para los linfocitos T. Se investigó la presencia de epítomos para los linfocitos B con anticuerpos de especificidad predefinida para los componentes por separado y mediante experimentos inmunitarios de competición. La figura 4 muestra que el "gigante" es

reconocido por los antisueros generados contra rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5 y rPhl p 6, respectivamente (figura 4, fila A: 1-4). La expresión correcta de la etiqueta de hexahistidina en el extremo carboxilo se demostró mediante la reactividad de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-etiqueta de hexahistidina que reconoció específicamente el “gigante” (figura 4: fila A, 5) pero no el rPhl p 2 que no contiene ninguna etiqueta de hexahistidina (figura 4: fila B, 5). Los Phl p 2 (fila B: 1, 3, 4) y rPhl p 5 (fila B: 2) recombinantes (controles negativos) no reaccionaron con los antisueros (figura 4: fila B).

A continuación, se investigó si los alérgenos híbridos se pueden utilizar para bloquear la unión entre los anticuerpos IgE de los pacientes alérgicos al polen de las gramíneas ($n = 20$) y cada uno de los compuestos (tablas 1, 2). La tabla 1 muestra que el híbrido rPhl p 2/rPhl p 6, así como el rPhl p 6/rPhl p 2, inhibía la unión de la IgE a ambos componentes (rPhl p 2, rPhl p 6) de una manera comparable a la de los alérgenos recombinantes por separado (una inhibición de aproximadamente el 80% de la unión de la IgE). Asimismo, encontramos que el híbrido rPhl p 5/rPhl p 1 inhibió la unión de las IgE de los 20 pacientes a ambos, rPhl p 1 y rPhl p 5, de forma tan eficaz como los compuestos por separado (inhibición media del 85%) (tabla 2). No se observó ninguna inhibición cuando los sueros se preadsorbieron con el híbrido rPhl p 5/rPhl p 1 y se hicieron reaccionar con un alérgeno no relacionado (alérgeno principal del polen de abedul, Bet v 1) mientras que rBet v 1 causó una autoinhibición casi completa (inhibición del 83%) (tabla 2).

Protocolo experimental

Experimentos de competición por ELISA:

Se diluyeron los sueros de 20 pacientes en una solución salina tamponada con Tris (TBS) 1:10 para la inhibición con rPhl p 5/rPhl p 1 y 1:5 para la inhibición con rPhl p 2/rPhl p 6 y rPhl p 6/rPhl p 2. Los sueros se preadsorbieron durante una noche a 4°C bien con Phl p 1, Phl p 5, Phl p 5/Phl p 1, Phl p 2, Phl p 6, Phl p 2/Phl p 6, Phl p 6/Phl p 2, Bet v 1 recombinantes, o con SAB (10 µg/ml). Se recubrieron las placas de ELISA con Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 y Bet v 1 recombinantes (5 µg/ml) a 4°C durante una noche. Se realizó el ELISA tal y como está descrito [Niederberger *et al.* (1998) *J Allergy Clin Immunol* 101: 258-264].

Inmunotransferencia en puntos

Se transfirieron en puntos sobre membranas de nitrocelulosa alícuotas de aproximadamente 1 µg de Phl p 6/Phl p 2/Phl p 5/Phl p 1 recombinante, y rPhl p 5 y rPhl p 2 purificados como controles negativos. Los filtros se bloquearon con TBS, SAB al 1% y Tween-20 al 0,05% durante 1 hora y se incubaron con sueros de conejo anti-Phl p 1, anti-Phl p 5 (diluido 1:5000), anti-Phl p 2 (diluido 1:500), anti-Phl p 6 (diluido 1:2000), y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-hexahistidina (Dianova, Alemania) diluido 1:1000 en TBS, SAB al 1% y Tween-20 al 0,05%. Se lavaron los filtros 3 veces con TBS y Tween-20 al 0,05%, se incubaron con un segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina (Jackson), y para la detección de la etiqueta de histidinas con un anticuerpo anti-IgG de ratón unido a fosfatasa alcalina (PharMingen) diluido 1:1000 en TBS, SAB al 1% y Tween-20 al 0,05% durante 1 hora, y se lavaron 3 veces con TBS y Tween-20 al 0,05%. Se comenzó la reacción del color añadiendo NBT/BCIP (300 µg/ml) y se paró con la adición de agua.

Ejemplo 5

Las moléculas híbridas inducen respuestas inmunitarias más fuertes que los compuestos por separado o mezclas de los mismos

Para evaluar si la inmunización con los alérgenos híbridos induce anticuerpos IgG que reconocen los componentes alérgicos por separado, se inmunizaron grupos de 8 ratones cada uno con los híbridos, los alérgenos por separado, o con extracto de polen del fleo de los prados. La figura 5 muestra que las respuestas de IgG₁ medias inducidas por las moléculas híbridas a cada uno de los alérgenos individuales (rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, o rPhl p 6) fueron mayores que las obtenidas mediante la inmunización con los componentes de los alérgenos por separado. Los niveles elevados del anticuerpo IgG₁ inducidos por los híbridos ya eran detectables 4 semanas después de la primera inmunización y habían aumentado más después de 4 semanas más. Quizás lo más interesante fue el resultado de que las moléculas híbridas inducían unos mayores niveles de IgG₁ contra los compuestos de los alérgenos por separado que con el extracto del polen del fleo de los prados (figura 5). Lo último fue particularmente evidente para Phl p 2, Phl p 6 y Phl p 1, que los anticuerpos inducidos por extractos reconocían mal, mientras que las moléculas híbridas indujeron unas respuestas fuertes de los anticuerpos anti-Phl p 1, anti-Phl p 2 y anti-Phl p 6 (figura 5).

Asimismo, encontramos que la inmunización con la molécula gigante inducía unas mayores respuestas de anticuerpos contra cada uno de los componentes (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6) que la inmunización con los antígenos por separado (figura 6A) o una mezcla equimolar de los antígenos (figura 6B). La inmunización con el gigante también produjo unas mejores respuestas inmunitarias que la inmunización con el extracto del polen del fleo de los prados. Los anticuerpos IgG inducidos con el extracto de polen del fleo de los prados mostraron una menor reactividad contra el gigante y contra el extracto que los inducidos con el gigante (figura 7A, B).

Inmunización de ratones y medición de los niveles de anticuerpos específicos

Grupos de 8 ratones BALB/c hembra (edad: 8 semanas) (Charles River, Alemania) se inmunizaron por vía subcutánea con rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, rPhl p 6, rP2-P6, rP6-P2, rP5-P1, la molécula del gigante, extracto del polen del fleo de los prados, o una mezcla equimolar de rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, y rPhl p 6 absorbida a $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Alu-Gel-S, Serva, Ingelheim, Alemania). Se mantuvieron los animales en el estabulario del Instituto de Fisiopatología, Universidad de Viena, según las directrices locales para cuidado de los animales. Los ratones se inmunizaron y se sangraron por la vena de la cola a intervalos de cuatro semanas y los sueros se guardaron a -20°C hasta el análisis.

Las IgG_1 de las respuestas contra rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, rPhl p 6, rP2-P6, rP6-P2, rP5-P1, la molécula del gigante, una mezcla equimolar de rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5, y rPhl p 6 y el extracto del polen del fleo de los prados se midieron por ELISA. Los alérgenos (alérgenos recombinantes: $5 \mu\text{g/ml}$; extracto: $50 \mu\text{g/ml}$) se usaron para recubrir placas Nunc Maxisorp (Roskilde, Dinamarca) y se incubaron con sueros de ratón diluidos a 1:1000. Los anticuerpos unidos se detectaron con una IgG_1 monoclonal antirratón de rata diluido a 1:1000 (Pharmingen, San Diego, Cal, EE. UU.) y un antisuero de oveja antirrata marcado con HRP diluido a 1:2000 (Amersham, Buckinghamshire, GB).

Ejemplo 6

Las moléculas híbridas inducen respuestas protectoras de anticuerpos que bloquean la unión de las IgE de los pacientes alérgicos a los alérgenos del polen de las gramíneas

A continuación, examinamos si los anticuerpos de ratón inducidos con las moléculas híbridas pueden bloquear la unión de los anticuerpos IgE de los pacientes alérgicos al polen de las gramíneas con los alérgenos purificados del polen de las gramíneas (tabla 3). Los experimentos de competición por ELISA realizados con sueros de 4 pacientes representativos alérgicos al polen de las gramíneas demostraron que los anticuerpos inducidos por las moléculas híbridas inhibían fuertemente la unión de las IgE a los alérgenos purificados: los anticuerpos IgG inducidos con la molécula híbrida rP2-P6 y la rP6-P2 causaron una inhibición del 48%-54% de la unión de las IgE a Phl p 2, y una inhibición del 54%-67% de la unión de las IgE a Phl p 6 (tabla 3A). En cambio, la inhibición de la reactividad de la IgE producida mediante la preincubación con los anticuerpos inducidos con rPhl p 2 y rPhl p 6 solos fue muy baja (0-15%) (tabla 3A). Los anticuerpos anti-P5-P1 causaron una inhibición de más del doble de la unión de IgE a Phl p 5 (inhibición media del 59,5%) que los anticuerpos generados contra Phl p 5 solo (28%) (tabla 3B). La inhibición de la unión de IgE a Phl p 1 producida con los anticuerpos generados contra el híbrido rP5-P1 (inhibición media del 18,5%) y Phl p 1 solo (inhibición media del 29,5%) fue menor (tabla 3B).

Se obtuvieron resultados similares con la molécula gigante que induce anticuerpos IgG que bloquearon con eficacia la unión de las IgE de los pacientes alérgicos al polen de las gramíneas a Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 y el extracto de polen del fleo de los prados (datos no mostrados).

ELISA para evaluar la actividad bloqueadora de los anticuerpos

La capacidad de los anticuerpos de ratón anti-rP2-P6, anti-rP6-P2 y anti-rP5-P1 para inhibir la unión de los anticuerpos IgE de pacientes alérgicos al polen de las gramíneas a rPhl p 1, rPhl p 2, rPhl p 5 o rPhl p 6 se examinó mediante experimentos de competición por ELISA. Se recubrieron las placas de ELISA (Nunc) con Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 y Phl p 6 recombinantes ($1 \mu\text{g/ml}$) durante una noche a 4°C , las placas se lavaron dos veces con TBST (solución salina tamponada con Tris, Tween al 0,05%), se saturaron con $200 \mu\text{l}$ de TBST/SAB al 1% y se preincubaron con antisueros de ratón anti-rP2-P6, anti-rP6-P2 y anti-rP5-P1 o, para propósitos de control, con los correspondientes sueros preinmunitarios cada uno diluido 1:50 en TBST/SAB al 0,5% durante una noche a 4°C . Después de lavar 5 veces con TBST, se incubaron las placas con sueros humanos de pacientes alérgicos al polen de las gramíneas diluido 1:5 en TBST/SAB al 0,5% durante una noche a 4°C . Después de lavar 5 veces con TBST, se detectó la IgE humana unida con un anticuerpo de ratón anti-IgE humana marcado con FA (Pharmingen) diluido 1:1000 en TBST/SAB al 0,5% (1 hora a 37°C , 1 hora a 4°C). Después de lavar 5 veces con TBST, se comenzó la reacción del color añadiendo $100 \mu\text{l}$ del sustrato del ELISA (Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, EE. UU.). El porcentaje de reducción de la unión de la IgE humana después de la preincubación con antisueros de ratón se determinó según la fórmula: % de inhibición de la unión de IgE = $100 - \text{DO}_i/\text{DO}_p \times 100$. DO_i y DO_p representan las extinciones después de la preincubación con el suero inmunitario y el suero preinmunitario, respectivamente.

ES 2 287 067 T3

TABLA 1

Paciente	rPhl p2	rPhl p2/ rPhl p6	rPhl p6/ rPhl p2	rPhl p6	rPhl p2/ rPhl p6	rPhl p6/ rPhl p2
1	69	72	78	72	72	73
2	72	78	81	81	80	81
3	97	95	98	93	91	97
4	93	93	94	80	80	80
5	79	79	78	69	76	75
6	44	44	45	80	82	82
7	97	97	97	87	97	96
8	92	93	92	84	93	93
9	84	85	85	64	68	68
10	53	56	56	45	53	52
11	83	84	82	78	93	91
12	67	64	65	70	72	71
13	90	89	89	86	91	91
14	94	94	93	85	89	89
15	81	81	81	86	89	95
16	97	96	97	95	96	96
17	97	97	94	95	97	97
18	90	90	91	43	53	52
19	76	75	76	68	83	82
20	97	97	97	73	89	89
media	83	83	84	77	82	83

recubierto con rPhl p2

recubierto con rPhl p6

ES 2 287 067 T3

TABLA 2

Paciente	rPhl p1	rPhl p5/ rPhl p1	rPhl p5	rPhl p5/ rPhl p1	rBet v 1	rPhl p5/ rPhl p1
1	77	81	85	83	74	0
2	90	89	94	92	96	18
3	96	92	96	92	67	0
4	92	92	95	90	-	-
5	82	84	87	87	-	-
6	92	93	93	93	75	9
7	88	90	90	91	97	0
8	90	91	93	92	88	2
9	50	52	57	57	59	4
10	89	89	93	90	58	5
11	88	95	89	94	-	-
12	95	95	95	96	97	0
13	94	96	94	95	97	0
14	95	96	95	95	98	0
15	78	78	81	79	92	0
16	94	95	95	94	94	0
17	46	58	66	65	-	-
18	77	78	86	85	63	42
19	91	91	94	93	-	-
20	95	93	97	95	96	32
media	85	86	89	88	83	7

recubierto con rPhl p1

recubierto con rPhl p5

recubierto con rBet v1

TABLA 3

A	% de inhibición de la unión de IgE a					
		rPhl p2	rPhl p6	rPhl p2	rPhl p6	
	con	anti-rP2-P6 de ratón	anti-rP6-P2 de ratón	anti-rPhl p2 de ratón	anti-rPhl p6 de ratón	
paciente						
1		56	62	48	63	0
2		38	63	38	65	0
3		56	39	53	65	0
4		65	52	54	75	0
media		54	54	48	67	0
B						
		rPhl p1	rPhl p5		rPhl p1	rPhl p5
	con	anti-rP5-P1 de ratón			anti-rPhl p1 de ratón	anti-rPhl p5 de ratón
paciente						
1		16	59		33	23
2		19	67		39	15
3		14	69		17	40
4		25	43		29	33
media		19	60		30	28

REIVINDICACIONES

1. Un alérgeno híbrido que es un polipéptido que comprende al menos dos proteínas alergénicas diferentes o fragmentos de las mismas, en el que cada fragmento consiste en al menos ocho aminoácidos consecutivos de la proteína alergénica correspondiente, **caracterizado** porque la proteína alergénica de la que se obtiene el polipéptido híbrido consiste en los alérgenos principales sin relación inmunitaria entre sí del polen del fleo de los prados.
2. Un alérgeno híbrido según la reivindicación 1, en la que el polipéptido híbrido comprende los alérgenos principales sin relación entre sí del polen del fleo de los prados seleccionados entre Phl p 5/Phl p 1, Phl p 2/Phl p 6 y una combinación de las cuatro moléculas.
3. Un alérgeno híbrido según la reivindicación 1, en el que el polipéptido híbrido comprende al menos una proteína alergénica completa.
4. Un alérgeno híbrido según la reivindicación 3, en el que el polipéptido híbrido comprende al menos dos proteínas alergénicas completas.
5. Un alérgeno híbrido según la reivindicación 1, en el que el polipéptido híbrido comprende al menos un fragmento de proteínas alergénicas cuyo fragmento tiene una actividad alergénica sustancialmente reducida en comparación con la proteína alergénica de la que se obtiene.
6. Un alérgeno híbrido según la reivindicación 5, en el que el polipéptido híbrido comprende fragmentos de al menos dos proteínas alergénicas diferentes cuyos fragmentos, todos, tienen una actividad alergénica sustancialmente reducida en comparación con las proteínas alergénicas correspondientes de las que obtienen.
7. Un alérgeno híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que comprende al menos tres proteínas alergénicas diferentes o fragmentos de las mismas.
8. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. El uso de un polinucleótido según la reivindicación 8 para la preparación de una vacuna de ADN.
10. Una célula transfectada o transformada con un polinucleótido que comprende un polinucleótido según la reivindicación 8.
11. Una composición farmacéutica que contiene un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, o una célula según la reivindicación 10.
12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 11 que es una composición de vacuna.
13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 11 o 12 que contiene además un adyuvante.
14. Un método para la preparación de un polipéptido híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las siguientes etapas:
 - a) proporcionar un polinucleótido que codifica el polipéptido híbrido;
 - b) introducir dicho polinucleótido en una célula hospedadora; y
 - c) cultivar la célula hospedadora obtenida en la etapa b) en condiciones tales que se exprese el polipéptido híbrido;
 - y
 - d) recuperar el producto de expresión de la célula.
15. Un método según la reivindicación 14, en el que el polinucleótido que codifica el polipéptido híbrido se prepara utilizando la tecnología de la PCR.
16. Un método para la preparación de un polipéptido híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el polipéptido se prepara mediante síntesis química.
17. El uso de un polipéptido híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o de un polinucleótido según la reivindicación 8, o de una célula según la reivindicación 10, para la preparación de un fármaco para el tratamiento de un trastorno alérgico.
18. El uso de un polipéptido híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o de un polinucleótido según la reivindicación 8, o de una célula según la reivindicación 10, para la preparación de un fármaco para la vacunación profiláctica o la inducción de tolerancia.

ES 2 287 067 T3

19. El uso de un polipéptido híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la detección de anticuerpos contra una proteína alergénica en una muestra.

20. La utilización según la reivindicación 19, en la que la detección se realiza mediante pruebas con anticuerpos *in vitro* y pruebas que utilizan células.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

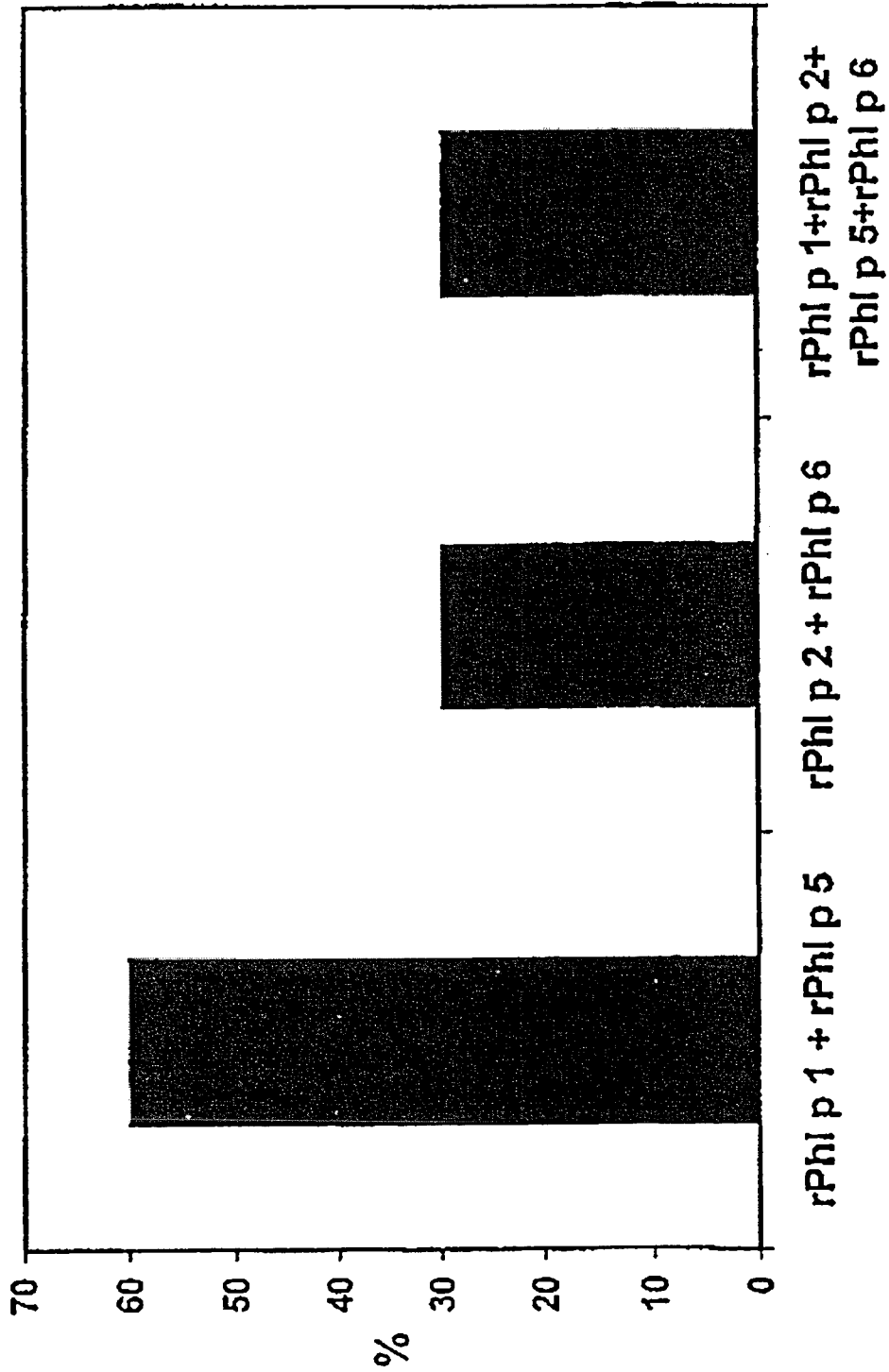


Figura 1

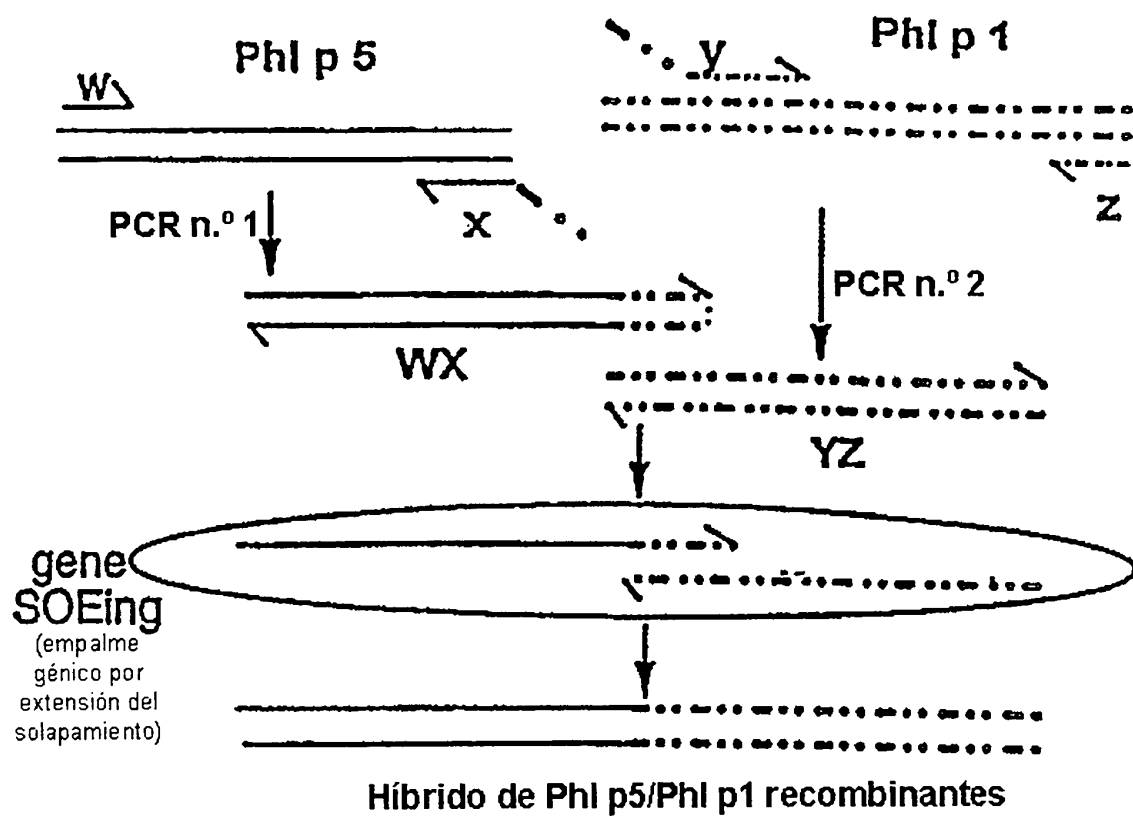


Figura 2

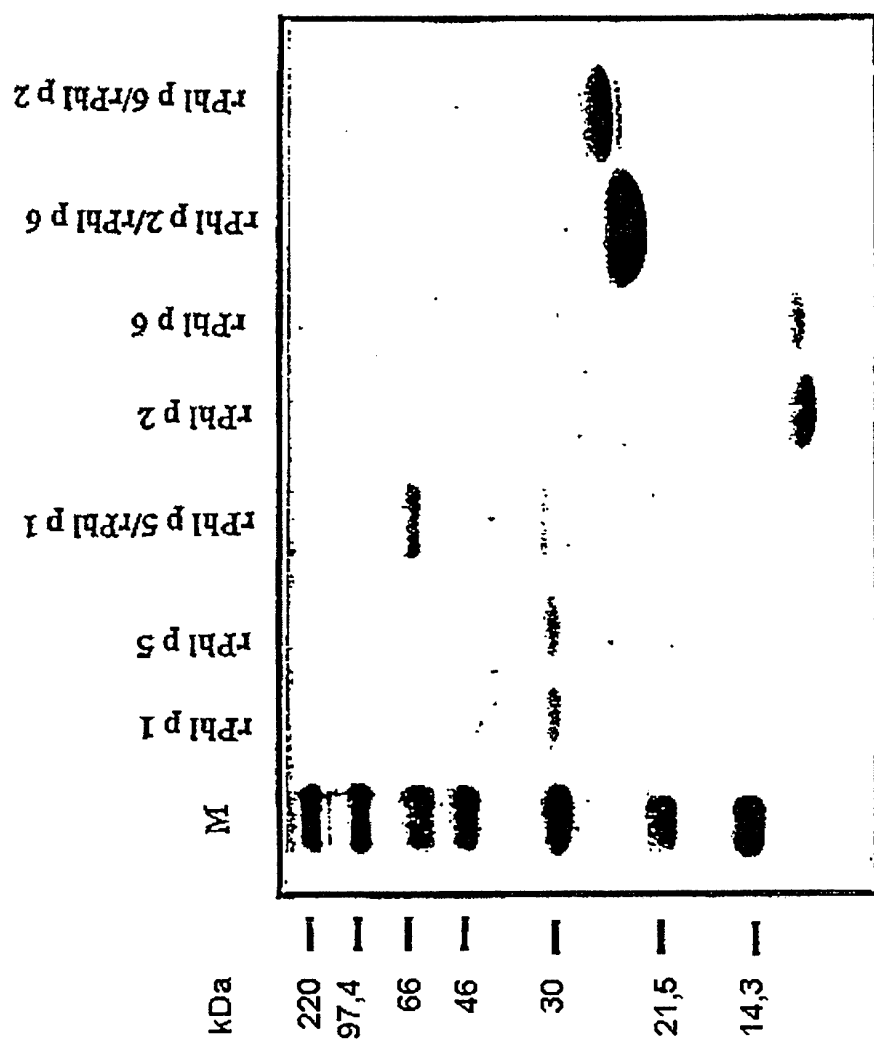


Figura 3

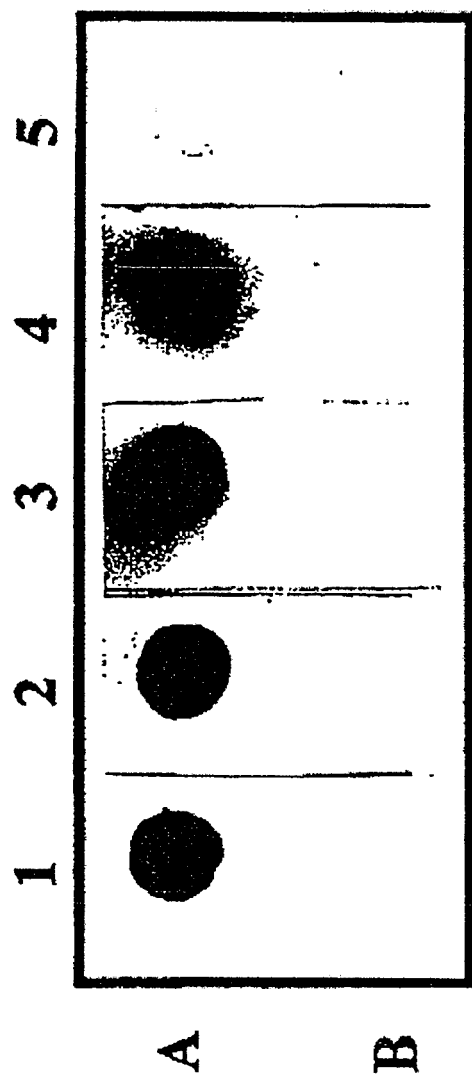


Figura 4

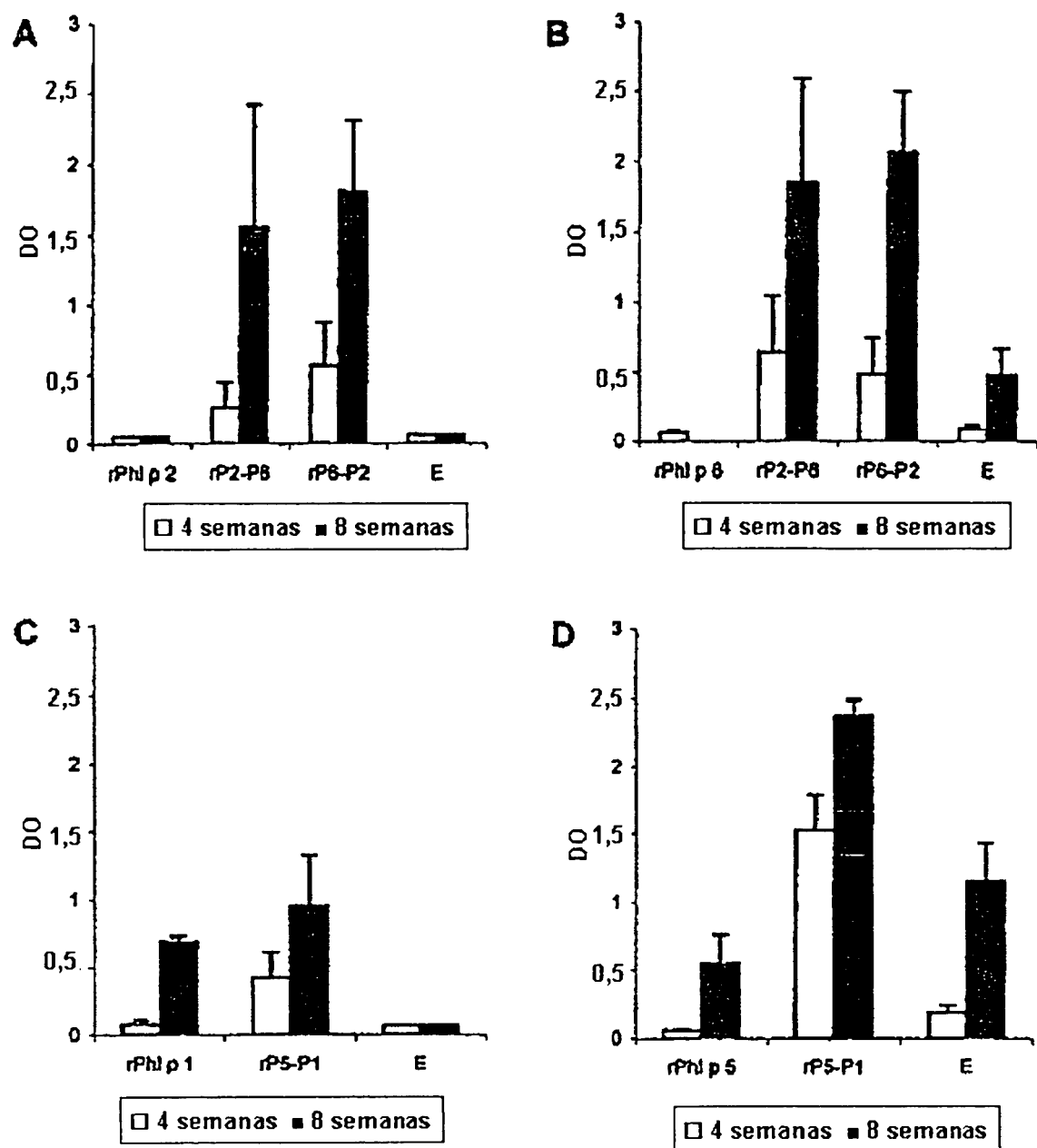


Figura 5

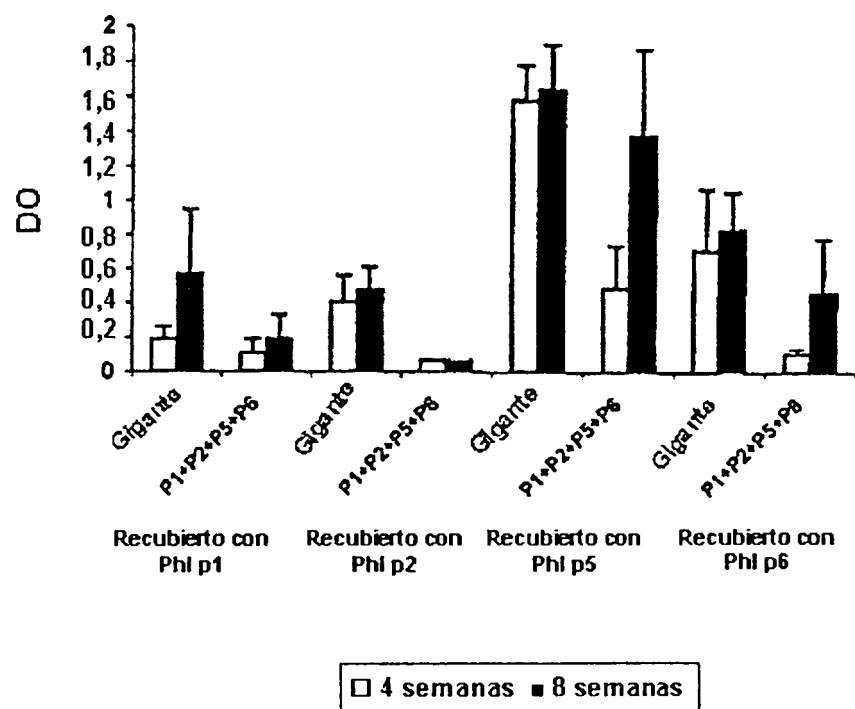
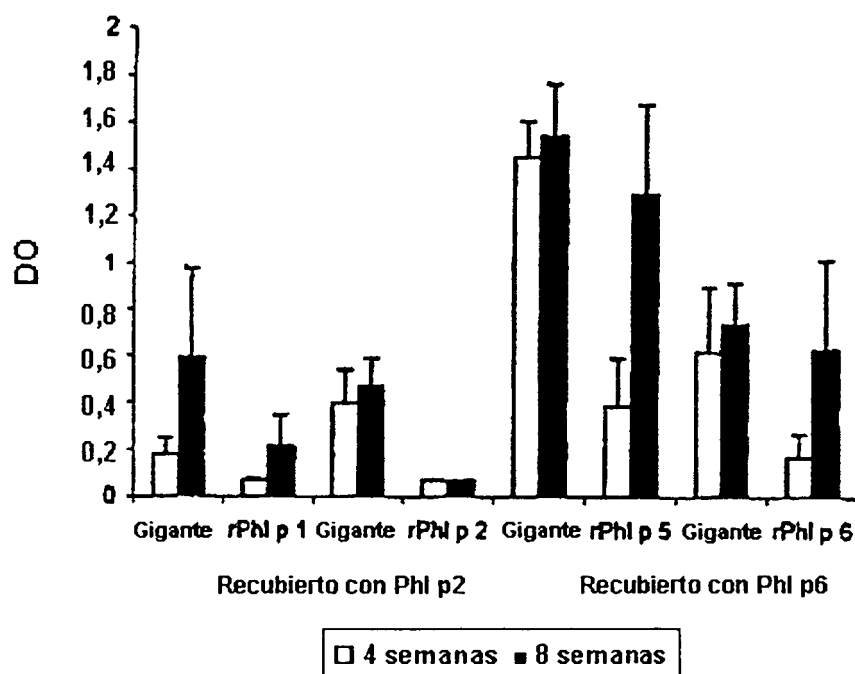


Figura 6

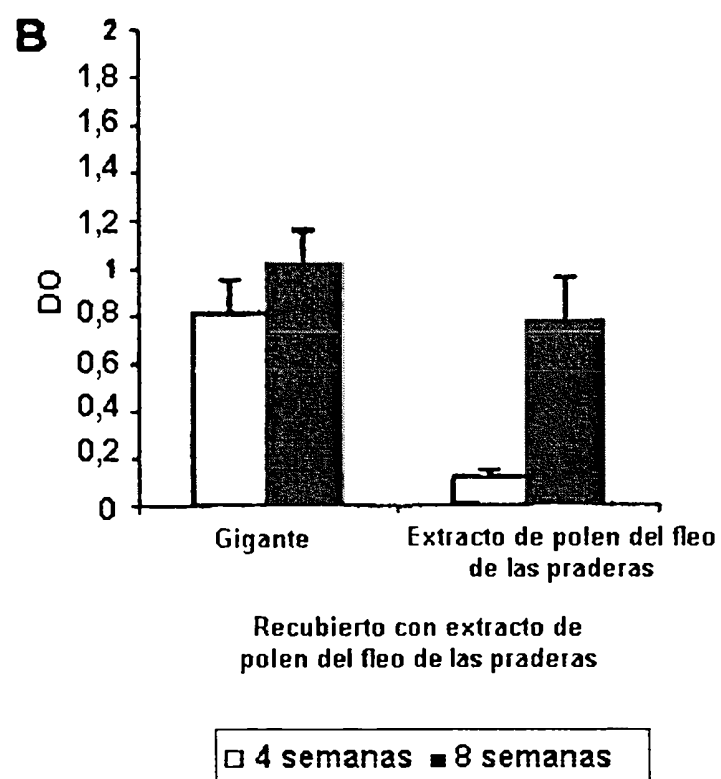
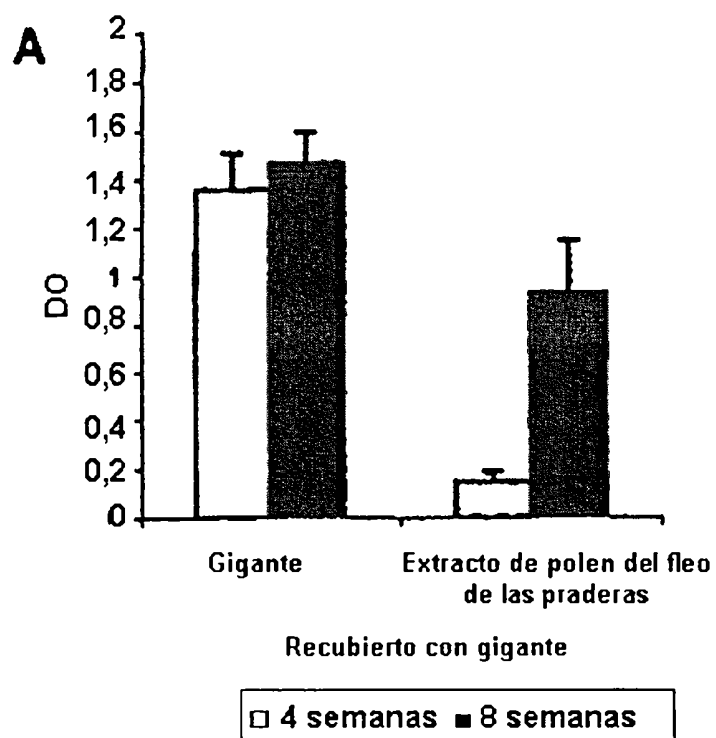


Figura 7

ES 2 287 067 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> SHAN-Beteiligungsgesellschaft m.b.H.	
5	<120> Vacunas de alergia que contienen polipéptidos híbridos	
	<130> Vacunas de alergia que contienen polipéptidos híbridos	
	<140>	
	<141>	
10	<150> EP-A 00.128660.8	
	<151> 28-12-2000	
	<160> 18	
15	<170> PADAT Sequenzmodul, versión 1,0	
	<210> 1	
	<211> 27	
20	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
25	<400> 1	
	ggaattcata tggccgatct cggttac	27
30	<210> 2	
	<211> 27	
	<212> ADN	
35	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
40	<400> 2	
	eggggtaccg actttgtagc caccag	27
45	<210> 3	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador	
55	<400> 3	
	eggggtacca tgatcccaaa ggtcccc	27
60	<210> 4	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> cebador	

ES 2 287 067 T3

	<400> 4	
	cgggatcctc agtgggtggtg gtggtggtgc ttggactcgt agctggt	47
5	<210> 5	
	<211> 27	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
15	<400> 5	
	ggaattcata tgggtccgaa ggtgacg	27
20	<210> 6	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
30	<400> 6	
	cgtggccttc ccataagct tctcttctgg cgcgtaggt	39
35	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 7	
45	aagcttatgg ggaaggccac gacc	24
	<210> 8	
50	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> cebador	
	<400> 8	
60	cgggatccta gtggtggtgg tgggtgtgcg cgccgggctt gacagc	46
	<210> 9	
	<211> 27	
65	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	

ES 2 287 067 T3

	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 9	
	ggaattcata tgggtccgaa ggtgacg	27
10	<210> 10	
	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
15	<210>	
	<223> cebador	
	<400> 10	
20	cgggatccta gtggtggtgg tgggtgtgcg cgccgggctt gacagc	46
	<210> 11	
25	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 11	
35	ggaattcata tggggaaggc cacgaccgag	30
	<210> 12	
40	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador	
	<400> 12	
50	caccttcggc accataagct tcgcgccggg cttgacagc	39
	<210> 13	
	<211> 24	
55	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
60	<400> 13	
65	aagcttatgg tgccgaaggt gacg	24
	<210> 14	
	<211> 46	

ES 2 287 067 T3

	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador	
	<400> 14	
10	cgggaccta gtggtggtgg tgggtgtgct cttctggcgc gtaggt	46
	<210> 15	
	<211> 30	
15	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> cebador	
	<400> 15	
25	ggaattcata tggggaaggc cacgaccgag	30
	<210> 16	
	<211> 46	
30	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
35	<400> 16	
40	cgggaccta gtggtggtgg tgggtgtgct cttctggcgc gtaggt	46
	<210> 17	
	<211> 30	
	<212> ADN	
45	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
50	<400> 17	
	ggaattcata tggggaaggc cacgaccgag	30
55	<210> 18	
	<211> 31	
	<212> ADN	
60	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
65	<400> 18	
	gggattcca tatgctcttc tggcgcgtag g	31