PROTEINAS DE FUSIÓN CON REPRESENTACION DE DIFERENTES ALERGENOS: PROPUESTA DE VACUNA PARA ALERGIA A LOS ACAROS

CAMPO TECNOLÓGICO

La presente invención se relaciona con el diseño de secuencias de nucleótidos sintéticas y la producción de proteínas de fusión recombinantes para tratamiento y prevención de alergias causadas por ácaros domésticos, particularmente las causadas por las especies *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides pteronyssinus.*

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las personas alérgicas a los ácaros domésticos están sensibilizadas generalmente a los ácaros del género *Dermatophagoides*, siendo las especies más prevalentes a nivel mundial las especies *D. pteronyssiuns* y *D. farinae*. En las regiones tropicales y subtropicales además es muy abundante la presencia de *B. tropicalis* siendo en algunos casos predominante en la población de ácaros encontrada en el polvo de las casas. En estas regiones los alérgicos a los ácaros están sensibilizados mayoritariamente a *D. pteronyssinus* y *B. tropicalis* (1).

En los ácaros domésticos se han identificado aproximadamente una veintena de alergenos. Sin embargo, solo unos cuantos de estos tienen una alta frecuencia de reactividad en la población alérgica y algunos presentan reactividad cruzada. Entre los alergenos de *B. tropicalis*, el Blo t 5 es el de mayor frecuencia de reactividad, mientras que el Blo t12 y Blo t13 son de menor frecuencia, pero inducen una respuesta IgE intensa en muchos de los sensibilizados (2, 3).

Otros como Der p1 y Der p2 son los alergenos más importantes de *D. pteronyssinus* y entre 50% y 100% de los alérgicos tienen IgE específica contra estos dos alergenos.

Otro alergeno importante de *D. pteronyssinus* es Der p7, se estima que el 50% de los alérgicos a ácaros domésticos presentan IgE contra este alergeno. Los alergenos del grupo 8 y 10 de los ácaros como la glutatión S transferasa (GST) y la tropomiosina, respectivamente, revisten particular importancia debido a la significativa reactividad cruzada observada con los homólogos derivados de las diferentes especies de ácaros y otros organismos (4).

Un alergeno debe producir el entrecruzamiento de anticuerpos IgE unidos a la superficie de las células efectoras para inducir la activación celular y la respuesta inflamatoria, este proceso requiere por lo menos de dos epitopes IgE sobre la superficie del alergeno. Los anticuerpos IgE del paciente alérgico pueden reconocer epitopes continuos o epitopes discontinuos. El entrecruzamiento de los anticuerpos IgE sobre la superficie de los mastocitos induce la liberación inmediata de mediadores biológicamente activos como histamina y leucotrienos.

La disminución de la capacidad alergénica se puede lograr interviniendo los epitopes IgE mediante mecanismos como mutación de punto, eliminación de aminoácidos y desorganización del plegamiento natural de la molécula. El reordenamiento de segmentos de aminoácidos que conforman la secuencia primaria del alergeno también modifica la capacidad alergénica.

Se conocen estudios en los que se han generado proteína de fusión o híbridas con el objeto de proponer una mejor inmunoterapia alergeno-específica. se han generado proteínas de fusión en la modalidad de varias porciones de diferentes alergenos unidos en una sola molécula con el fin de obtener vacunas con poca reactividad con el anticuerpo IgE disminuyendo los riesgos de anafilaxis y para administrar al paciente solo los alergenos comprometidos en el desarrollo de la respuesta alérgica (5).

En este campo se conocen patentes con alergenos de pólenes (US7,862,828) y de ácaros domésticos como en los documentos US20080274059; US20110052640; US20070065468; US20060233839; US20090130130 y WO2007140505.

En efecto, el documento US 7,862,828 describe un método para la preparación de alérgenos de fusión que consiste de dos o más poli péptidos recombinantes del polen del pasto para su uso como agente inmuno-terapéutico que comprende: (a) proporcionar una secuencia de poli nucleótidos que codifica el alérgeno de fusión, (b) introducir dicha secuencia de poli nucleótido en la célula hospedera, (c) cultivar la célula hospedera para que la secuencia sea expresada, (d) recuperar el alérgeno de fusión expresado de la célula cultivada, (e) probar el alérgeno de fusión como candidato de agente de inmunoterapia por la administración del alérgeno a un animal de prueba y seleccionar aquellos que induzcan la respuesta inmune más fuerte y la generación de anticuerpos bloqueadores de IgE comparada con la expresada con los componentes individuales.

En este caso, el poli péptido tiene al menos dos diferentes proteínas alergénicas o sus fragmentos. El poli péptido hibrido, poli nucleótido y célula son útiles para la preparación de medicamentos para tratamiento de un desorden alergénico o vacunación profiláctica. Las fuentes alergénicas de las proteínas alergénicas pueden ser polen de las gramíneas más importantes, los ácaros, el veneno de abeja o los alérgenos de pelo de animales. Ejemplos específicos de las proteínas alergénicas son el grupo 1, grupo 2, grupo 4, grupo 5 grupo 6, grupo 11, grupo 12 y grupo 13 de alérgenos de polen de gramíneas más importantes, Der p 1 y Der p 2 (ácaros), la fosfolipasa del veneno de abeja y Fel d 1 (gato).

Por su parte, el documento US20080274059 enseña una proteína de fusión que comprende un alérgeno del grupo 1 y un alérgeno del grupo 2 del genero Dermatophagoides fusionadas en el N- o C- terminal del alérgeno del grupo 1 donde puede ser Der p 1 ó proDer p 1 y del grupo 2 puede ser Der p 2. Este documento incluye reivindicaciones para el ácido nucleico para el desarrollo de la proteína de fusión, el cassette de expresión, el vector conteniendo este cassette y una célula de cualquier tipo incluyendo el cassette o el vector de expresión y la composición de vacuna que incluye la proteína de fusión en un soporte aceptable farmacéuticamente. La proteína de fusión se aplica para la

prevención o el tratamiento de reacción alérgica a los ácaros. La célula de expresión puede ser *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* o *Saccharomyces cerevisiae*.

La solicitud de patente estadounidense 20110052640 reporta un poli péptido hibrido hipo alergénico que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 50 aminoácidos de una secuencia seleccionada del grupo 1 y 2 de los alérgenos de ácaros del polvo (*Dermatophagoides pteronyssinus*) y donde un epitote de unión a anticuerpo IgE de dicho alergeno es retirado. Se incluyen el poli péptido con 70% de identidad en la secuencia, el poli nucleótido correspondiente, el vector, la célula hospedera de expresión que incluya el poli nucleótido, el método para producir el poli péptido y la preparación farmacéutica que contiene al poli péptido. El alérgeno del grupo 1 es Der p 1 y del grupo 2 es Der p 2. El poli péptido obtenido mantiene la capacidad inmunogénica, siendo particularmente útil para el tratamiento de la alergia. Adicionalmente se describen los métodos de producción de estos poli péptidos en sistemas de expresión heteróloga junto con métodos de purificación eficiente.

La patente US20070065468 reporta un producto para la reducción específica de la inmunoglobulina E (IgE) y de la reacción alérgica, específicamente un poli péptido quimérico de al menos dos alérgenos de ácaros. Esto incluye la secuencia de aminoácidos de tales alérgenos como Der p 1, Der p 2 y Blo t 5. Los alérgenos pueden ser expresados en *Escherichia coli* o CHO-K1.

La patente US20060233839 describe una proteína recombinante con el alérgeno derivado de Der p1 donde la proteína tiene una actividad alergénica reducida importante respecto al alérgeno en su estado natural y que comprende tres sitios de mutación. Adicional al alérgeno Der p 1 se incluyen ProDer p 1 y Der p 3 con ProDer p 3 y PreProDer p 3. Las reivindicaciones incluyen la molécula de ácido nucleico, el vector de expresión, la célula

transformada para la producción de la proteína recombinante y la composición inmunológica que se usa en el tratamiento de pacientes.

El documento US20090130130 hace referencia a un poli péptido aislado, derivado o fragmento compuesto por (a) un polipéptido, su isoforma derivada, o un fragmento del mismo, que comprende un mutante no helicoidal de al menos un alérgeno del Grupo 5 de los ácaros y (b) un polipéptido, su isoforma derivada, o un fragmento del mismo que comprende al menos un aminoácido sustituido, adicionado, eliminado, o al menos una modificación química, y en la que polipéptido exhibe reducción de la reactividad igual o mayor de IgE del polipéptido natural en los sujetos alérgicos por lo menos a un alérgeno del Grupo 5 de los ácaros. Este polipéptido del Grupo 5 de alérgenos puede ser Blo t 5, Der p 5, Der f 5, y Der m 5. Las reivindicaciones incluyen la secuencias de ácidos nucleicos, un vector / célula hospedera que comprende las moléculas de ácidos nucleicos, una preparación farmacéutica que incluya el polipéptido o una vacuna.

La patente WO2007140505 reporta una proteína hipo alergénica que comprende un alérgeno que es fusionado o conjugado con al menos una segunda proteína no alergénica o un fragmento. Se incluyen reivindicaciones para la molécula de ácidos nucleicos codificantes para la molécula hipo alergenica o la proteína fusionada, el vector, la célula hospedera, un anticuerpo dirigido contra la proteína hipoalergenica o de fusión y la vacuna que puede comprenderla. La proteína es derivada de Phl p 5, Fel d 1, Der p 2, Der p 7, Der p 21, Clone 30, Alt a 1, Par j 1, Ole e 1, Fel d 2, Can f 1, Can f 1, Art v 1, Amb a 1, Alt a 2 o Alt a 6 teniendo una truncación terminal en C- o N- y exhibiendo una capacidad reducida al IgE al compararse con Phl p 5 natural. La segunda proteína es una proteína viral, de bacteria, de hongo o protozoario. Por ejemplo la proteína de la capside de un virus, preferiblemente de picornaviridae.

Adicionalmente, se conoce que Linhart y colaboradores (6) construyeron por recombinación basada en PCR una molécula de fusión compuesta por los

alergenos mas importantes de la *grama timotea*, en el orden; Phl p6, Phl p2, Phl p5 y Phl p1, la cual se expresó en *E. coli* como una proteína de 79 kDa. Esta molécula mostró utilidad para la inmunoterapia ya que indujo la linfoproliferación en un grado similar a la inducida por una mezcla equimolar de los alergenos individuales y en un modelo de ratones alérgicos al polen, indujo la producción de citoquinas del perfil Th1 e IgG capaz de bloquear la degranulación de mastocitos incubados con el alergeno.

El concepto de proteínas de fusión se ha explorado también con alérgenos de ácaros; una proteína de fusión compuesta por porciones de Der p1 y Der p2 mostró menor reactividad IgE comparada con los alergenos nativos y pueden inducir en ratones la producción de IgG bloqueadora, lo cual sugiere su utilidad en inmunoterapia (7).

Recientemente, Bussieres L. y colaboradores (8) construyeron varias proteínas híbridas compuestas por porciones de Der p1, Der p2 y un precursor de Der p1 (pro-Der p1), demostrando que pueden inducir la degranulación de basófilos de alérgicos a los ácaros domésticos y mediante "immunoblotting" con anticuerpos policlonales y monoclonales se demostró que conservaron los epítopes B de los alergenos nativos.

No obstante, existe aún la necesidad no satisfecha de poder ofrecer vacunas a base de moléculas recombinantes que contengan varias regiones antigénicas de ácaros comunes a zonas tropicales y subtropicales que puedan ser alternativas viables a los esquemas de inmunoterapia conocidos en la actualidad que se encuentran basado en aplicación de extractos naturales de alergenos completos y que puedan disminuir el riesgo de anafilaxia y mejorar la eficacia en el tratamiento.

DEFINICIONES

Los términos usados tendrán el siguiente significado:

"**alergeno**", sustancia capaz de inducir una reacción alérgica mediante la inducción de la producción de anticuerpos IgE.

"Vacuna", una sustancia que puede usarse para estimular el sistema inmune para proveer protección, la sustancia puede ser un polipéptido, como lo son las proteínas de fusión motivo de esta invención en presencia o ausencia de vehículos o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

"expresión", se refiere a la expresión de un gen o producto de un gen incluyendo el polipéptido codificado.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1. Representación esquemática de los péptidos que conforman la secuencia primaria del recombinante PF3a.

La Figura 2. Niveles de IgE sérica específica a PF14c determinada mediante ELISA en comparación con los niveles de reactividad de los extractos naturales de *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus.*

La Figura 3. Representación esquemática de los péptidos que conforman la secuencia primaria del recombinante PF14c.

La Figura 4. Niveles de IgE sérica específica a PF14c determinada mediante ELISA en comparación con los niveles de reactividad de los extractos naturales de *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus.*

La Figura 5. Perfil de la Purificación de PF3a realizado en Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, teñido con azul de commassie. 1 es el marcador de peso molecular, 2 y 3 corresponden a las muestras sin dializar y 4 corresponde a la muestra del dializado en buffer Triton X-100 al 0. 1%.

La Figura 6. Perfil de la purificación de PF14c realizado en Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, teñido con azul de commassie. 1 representa el marcador de peso molecular, 2 y 3 representan las fracciones purificadas

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuentra dirigida a proteínas de fusión con epitopes de diferentes alérgenos y con reducida capacidad de unión a IgE. La presente

invención también se encuentra dirigida a la presentación farmacéutica que haga posible su aplicación en un esquema de vacunación cutánea ("Skin Prick Test"). Con la siguiente composición: 1. Proteína de fusión, 2. Glicerol y 3. Fenol.

En la invención también se reporta el diseño de secuencias de nucleótidos sintéticas y la producción de proteínas de fusión recombinantes para tratamiento y prevención de alergias causadas por ácaros domésticos, particularmente las causadas por las especies *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides pteronyssinus.*

Otra modalidad de la invención comprende las secuencias de nucleótidos artificialmente diseñadas que codifican las proteínas relacionadas con alergenos de los ácaros domésticos.

La invención también hace referencia al diseño de dos vectores basados en el vector pET45b+, con la inserción de la secuencia de nucleótidos artificialmente diseñada de tal manera que se conserva un marco de lectura apropiado para la expresión de la proteína recombinante con una etiqueta histidina 6 X, en la región amino terminal.

En este sentido, la presente invención también se encuentra dirigida al vector pET-45b(+) el cual es un vector plasmidico que se solicitó como obra por encargo a Novagen y contiene una secuencia codificadora por una etiqueta de histidina 6 X en la región N terminal seguida por una secuencia para sitio de corte por la enzima enteroquinasa y una secuencia para etiqueta S en la región C- terminal. Contiene 5.260 pares de bases. Se ordenó la inserción de la secuencia de nucleótidos diseñada codificando por la proteína de fusión, PF3a o PF14c, en la posición flanqueada por los sitios de restricción Pml I y Kpn I, y de tal manera que se generara un marco de lectura (ORF- Open Reading Frame) para la expresión de la de la proteína de interés con nueve amino ácidos adicionales (MAHHHHHHV) en la región N terminal bajo en control del

promotor T7. De esta manera la invención se reporta un vector denominado pET45b/PF3a constituido por 5.852 pares de bases y un vector denominado pET45b/PF14c constituido por 5.719 pares de bases, los cuales al ser introducidos en la bacteria *E. coli* permiten la expresión de las proteínas recombinantes PF3a de 196 amino ácidos (SEQ ID No. 2) y PF14 c de 152 amino ácidos (SEQ ID No. 4) con las características únicas relatadas en esta invención.

La invención también contempla la posibilidad de combinar en una sola composición, formulación farmacéutica ó vacuna las dos proteínas recombinantes con la posibilidad de mejorar o aumentar su eficacia en la inmunoterapia de alergia por ácaros domésticos.

La vacuna para inmunoterapia de alergia por ácaros domésticos de la presente invención se caracterizada porque contiene una secuencia de amino ácidos que se selecciona del grupo que consiste de la Secuencia ID No. 2 y la Secuencia ID No. 4 o una mezcla de estas dos.

Aún otra modalidad de la invención se refiere a un método de obtención de una proteína recombinante de fusión de diferentes segmentos de alergenos de *B. tropicalis* expresada en la bacteria *Escherichia coli* y con reactividad contra anticuerpos IgE de población alérgica en menor frecuencia e intensidad comparada a la obtenida con el extracto alergénico de *B. tropicalis.*

Aún otra modalidad de la invención se refiere a un método de obtención de una proteína recombinante de fusión de varios segmentos de alergenos de *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus* expresada en la bacteria *Escherichia coli* y con reactividad contra anticuerpos IgE de población alérgica en menor frecuencia e intensidad comparada a la obtenida con los correspondientes extractos alergénicos naturales.

La invención también hace referencia al uso de las proteínas diseñadas de acuerdo con la invención para la preparación de una vacuna medicamento para tratar a un individuo que padezca de alergias ocasionadas por ácaros domésticos.

La invención también se encuentra dirigida al método de tratamiento de un sujeto con alergias producidas por ácaros domésticos, el cual comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente efectiva de una proteína de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica que la contenga a dicho sujeto.

El diseño de las proteínas de acuerdo con la presente invención, comienza con la selección de diferentes alergenos de los ácaros del polvo doméstico *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus*, de sus regiones antigénicas reportadas en publicaciones científicas o predichas mediante nuestro análisis bioinformático. Las diferentes regiones seleccionadas se unieron para formar una sola estructura primaria de proteína. A partir de la secuencia de aminoácidos se modeló la probable estructura 3D de la proteína diseñada, la cual se optimizó buscando tener éxito en la expresión como proteína recombinante. De esta forma se obtuvieron sendos modelos para cada una de las dos proteínas de fusión materia de esta solicitud.

La predicción de la estructura tridimensional se realizó utilizando las herramientas y programas I-TASSER (9) y Swiss-Model (10, 11).

La combinación y orden de segmentos que produjo un modelo que satisfizo requisitos de energía, estereoquímica y estructurales se escogió para ordenar la síntesis de una secuencia de nucleótidos artificial codificadora por la secuencia primaria.

Se eligió un vector de expresión en *Escherichia coli*, el pET 45b+ (Novagen^{R}, catálogo 71327-3), y se insertó la secuencia artificial de tal manera que

resultara en marco de lectura para la expresión de la proteína codificada por el inserto, con una etiqueta de histidina 6X en la región N-terminal, sin sitio de corte para separar la etiqueta.

La síntesis del gen artificial con una optimización de los codones para la expresión en bacteria, y su inserción en el vector pET 45b+, de tal manera que se obtuviera un vector pET 45+b/PF para expresión de la proteína de fusión unida a la etiqueta de histidina 6X, se ordenó a una compañía especializada en los Estados Unidos (GeneScript).

Recibido el gen artificial y el vector para expresión con el inserto, se procedió a la transformación en diferentes cepas de *E. coli*, según los requerimientos de la proteína de interés. Las clonas positivas se seleccionaron previa confirmación del inserto esperado mediante PCR usando "primers" o cebadores universales y se procedió a la expresión en medio LB (Luria-Bertani), compuesto por 1% triptona, 0,5% extracto de levadura y 1% NaCl, pH 7.0, con antibiótico e inducción con IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido), un análogo de la lactosa, regulador de la expresión de proteínas bajo control del operon lac. Luego, el cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 4000 – 6000 r.p.m. y se recuperó el botón celular. Se siguió procedimiento estándar (The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook and Russel, CSHL Press), con modificaciones.

El botón de células obtenido se re-suspendió en buffer de lisis (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM y Urea 8 M, pH 8.0) y dejó en agitación a 20 r.p.m. durante una a dos horas. La mezcla se centrifugó a 6000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C y se recuperó la fracción soluble contenida en el sobrenadante. Ocho mililitros de este sobrenadante se mezclaron con la resina Ni-NTA previamente preparada mediante dos lavados con agua y equilibrada con buffer de lisis, pH 6 y se dejó en agitación a 20 r.p.m. durante dos horas. La mezcla se centrifugó a entre 1200 y 1600 r.p.m. durante un minuto y se separó el sobrenadante que contenía la fracción no unida a la resina. Se realizaron varios lavados de la resina con solución amortiguadora de NaH_2PO_4 20 mM, Urea 8 M y NaCl 500 mM a pH 8.0, 6.0 y 5.3 (2 lavados a cada pH). Después de cada

lavado, la fracción no unida a la resina se separó centrifugando entre 1200 y 1600 r.p.m. durante un minuto y descartó. La resina se cargo en una columna y se recuperó la proteína de fusión aplicando solución amortiguadora de elución (NaH_2PO_4 20 mM, Urea 8 M y NaCl 500 mM a pH 4.0) a la columna. La presencia de la banda de interés en las fracciones recolectadas se analizó mediante electroforesis en poli-acrilamida 15% en condiciones de reducción. Las fracciones se mezclaron según la intensidad de la banda de interés en el gel de electroforesis y se diluyeron con solución amortiguadora de elución.

Para eliminar la urea e inducir la renaturalización de las proteínas, se realizó renaturalización oxidativa asistida con arginina. En resumen; las fracciones obtenidas y diluidas luego de la purificación se dializaron en bolsas de diálisis con punto de corte de 6-8000 kDa, contra solución de renaturalización (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, L-Arginina 0,5 M, Cisteina 5 mM y Cistina 1 mM) en relación 1:20, bajo agitación suave y constante durante la noche a 4°C. Luego se dializaron contra solución amortiguadora de Tris-HCl 10 mM, Triton X-100 0,1% durante cuatro horas con un recambio a las dos horas, a las mismas condiciones. Los productos de la renaturalización se analizaron mediante electroforesis en poli-acrilamida 15% en condiciones de reducción y se guardaron a -20°C hasta su uso.

La capacidad de unión a los anticuerpos IgE e IgG en sueros humanos, se demostró mediante técnica de ELISA y de electrotransferencia e inmunodetección, siguiendo procedimiento estandarizado en nuestro laboratorio.

El método reportado en la presente invención para obtención de la proteína recombinante de fusión de segmentos de alergenos de *B. tropicalis* (PF14c) y de segmentos de alergenos de *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus* (PF3a) expresadas en la bacteria *Escherichia coli* y con reactividad contra anticuerpos IgE de población alérgica, en menor frecuencia e intensidad comparada a la obtenida con los extractos alergénicos naturales de *B. tropicalis y D. pteronyssinus* comprende los siguientes pasos:

Transformación de células de *E. coli:*

El vector pET 45b(+)/PF conteniendo el segmento de nucleótidos codificadores de la proteína de fusión se utilizó para transformar células competentes *E. coli* One Shot® BL21Star™ (DE3) (Invitrogen, Cat. No. C6010-03) y TOP10 (Invitrogen Cat. No. C4040-10), mediante tratamiento químico combinado con shock o golpe térmico. En resumen, 10 ng del vector se mezclaron e incubaron con las células competentes por 30 minutos en hielo, seguido por 30 segundos a 42ºC y posterior enfriamiento rápido en hielo. A la mezcla anterior se le agregaron 250 µL de medio de óptimo S.O.C. compuesto por 2% triptona, 0,5% extracto de levadura 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ y 20 mM glucosa) y se incubó a 37ºC y 250 r.p.m. por 30 minutos. Luego se realizó siembra homogénea en platos LBA (Luria-Bertani, compuesto por 1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7.0, con ampicilina 100 mg/mL) a 37ºC durante la noche.

Selección de colonias transformadas:

La presencia del inserto en las colonias transformadas se determinó mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) a partir de las colonias directamente, usando los cebadores universales "T7 Promoter" (5´-TAATACGACTCACTATAGGG-3´) y "T7 Terminator" (5´-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3´). Para la PCR se preparó una mezcla de reacción así:

ADN plantilla (colonia) 100 ng..... 2 µL

dNTPs 50mM..... 1 µL

Cebador "T7 terminator" (10 pmol)..... 1 µL

Cebador "T7 promoter" (10 pmol)..... 1 µL

Solución amortiguadora para PCR 10X..... 5 µL

$MgCL_2$ 50 mM..... 1.5 µL

Taq Polimerasa 5U/µL (Invitrogen, Cat. No. 116 15-010)..... 1 uL

Agua desionizada..... c.s.p. 50 µL

La programación de la amplificación que consistió de 30 ciclos de tres etapas así: 1) 94ºC por un minuto, 2) 50ºC por 1 minuto y 3) 72ºC por 2 minutos, con una extensión final de 7 minutos a 72ºC. La reacción se realizó en un termo-ciclador S-1000 (BioRad). El producto de la amplificación se analizó mediante electroforesis en agarosa al 2% en equipo Mini Sub^{TM} DNA Cell (BioRad) a 50 voltios. Las clonas positivas se conservaron a -70ºC en glicerol al 8%.

Expresión de la proteína de fusión:

La proteína unida a la etiqueta de seis residuos de histidina (6xHis-tag) se obtuvo mediante inducción con IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido, un análogo de la galactosa, regulador de la expresión de proteínas bajo control del operon lac. Una sola colonia aislada de un cultivo de clona positiva incubada en plato LBA se sembró en medio LBA líquido e incubó a 37ºC y 250 r.p.m. durante 12-14 horas. Luego, el cultivo se diluyó en LBA líquido (dilución 1:20) y se incubó durante 3 – 4 horas en iguales condiciones hasta alcanzar una OD_{600} (densidad óptica a 600 nm) entre 0.5 – 0.8, momento en que se añadió IPTG y se dejó en inducción durante 3 – 6 horas a 37°C. Luego, el cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 4000 – 6000 r.p.m. y se recuperó el botón celular. Se siguió procedimiento estándar (The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook and Russel, CSHL Press), con modificaciones.

Purificación y renaturalización de las proteínas de fusión:

El botón de células obtenido se resuspendió en buffer de lisis (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM y Urea 8 M, pH 8.0) y dejó en agitación a 20 r.p.m. durante una a dos horas. La mezcla se centrifugó a 6000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C y se recuperó la fracción soluble contenida en el sobrenadante. Ocho ml de este sobrenadante se mezclaron con la resina de afinidad basada en Ni-NTA previamente preparada mediante dos lavados con agua y equilibrada con de buffer de lisis, pH 6 y se dejó en agitación a 20 r.p.m.

durante dos horas. La mezcla se centrifugó a entre 1200 y 1600 r.p.m. durante un minuto y se separó el sobrenadante que contenía la fracción no unida a la resina. Se realizaron varios lavados de la resina con solución amortiguadora de NaH_2PO_4 20 mM, Urea 8 M y NaCl 500 mM a pH 8.0, 6.0 y 5.3 (2 lavados a cada pH). Después de cada lavado, la fracción no unida a la resina se separó centrifugando entre 1200 y 1600 r.p.m. durante un minuto y descartó. La resina se cargo en una columna y se recuperó la proteína de fusión aplicando solución amortiguadora de elución (NaH_2PO_4 20 mM, Urea 8 M y NaCl 500 mM a pH 4.0) a la columna. La presencia de la banda de interés en las fracciones recolectadas se analizó mediante electroforesis en poli-acrilamida 15% en condiciones de reducción. Las fracciones se mezclaron según la intensidad de la banda de interés en el gel de electroforesis y se diluyeron con solución amortiguadora de elución.

Para eliminar la urea e inducir la renaturalización de las proteínas, se realizó renaturalización oxidativa asistida con arginina. En resumen; las fracciones obtenidas y diluidas luego de la purificación se dializaron en bolsas de diálisis con punto de corte de 6-8000 kDa, contra solución de renaturalización (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, L-Arginina 0,5 M, Cisteina 5 mM y Cistina 1 mM) en relación 1:20, bajo agitación suave y constante durante la noche a 4°C. Luego se dializaron contra solución amortiguadora de Tris-HCl 10 mM, Triton X-100 0,1% durante cuatro horas con un recambio a las dos horas, a las mismas condiciones. Los productos de la renaturalización se analizaron mediante electroforesis en poli-acrilamida 15% en condiciones de reducción y se guardaron a -20°C hasta su uso.

Características de las proteínas recombinantes:

PF3a:

Es la proteína que corresponde a la SEQ ID No. 2 y que comprende 196 aminoácidos correspondientes a diferentes fragmentos contenidos en alergenos del ácaro *Blomia tropicalis y D. petronyssinus;* Blo t 5 (No. Acceso: O96870.1, GI:14423644 y 2 JRKA GI:193506481), Der p 2 (No. Acceso:

P49278.1, GI:1352237), Blo t 10 (Acceso No. ABU97466.1, GI:156938889), Der p 8 (acceso No. P46419.1, GI:1170095), Blo t 8 (ACV04860.1, GI:256665455) Der p 1 (acceso No. ACG58378.1, GI:195933901), Der p 2 (acceso No. P49278.1, GI:1352237 y Der p 7 (acceso No. 3H4Z-A GI:292659601). Esta proteína con una secuencia de 196 aminoácidos y un peso de 22.8 KD tiene segmentos antigénicos de alergenos de los ácaros *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides pteronyssinus*.

PF14c:

Es la proteína que corresponde a la SEQ ID No. 4 y que comprende 152 aminoácidos correspondientes a diferentes fragmentos presentes en 6 alergenos del ácaro *Blomia tropicalis,* Blo t 5 (No. Acceso: ABH06352.1, GI: 111120436), Blo t 8 (ACV04860.1, GI: 256665455) Blo t 10 (Acceso No. ABU97466.1, GI: 156938889), Blo t 12 (Q17282.1, GI: 2498195) y Blo t 13 (Q17284.1, GI:14423698). Esta proteína de 152 aminoácidos y peso de 17.8 KD tiene segmentos antigénicos de alergenos del ácaro *Blomia tropicalis*.

REIVINDICACIONES:

1. Una secuencia de nucleótidos artificialmente diseñada que codifica proteínas con representación de diferentes epitopes de varios alergenos de los ácaros domésticos en donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste de la Secuencia ID No. 1 y la Secuencia ID No. 3.

2. Una secuencia de aminoácidos caracterizada porque tiene la secuencia ID No. 2 ó la Secuencia ID No. 4 y porque dicha secuencia de aminoácidos es codificada por la secuencia de nucleótidos SEQ ID 1 y SEQ ID No. 3 de la reivindicación 1, respectivamente.

3. El diseño de un vector caracterizado dicho diseño por la inserción en la secuencia del vector pET45b+ de la secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste de la Secuencia ID No. 1 y la Secuencia ID No. 3. de tal manera que se conserva un marco de lectura apropiado para la expresión de la proteína recombinante con una etiqueta de histidina 6X, en la región amino terminal.

4. Un vector caracterizado porque contiene una secuencia codificadora por una etiqueta de histidina 6X en la región N terminal seguida por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias SEQ ID No. 1 y SEQ ID. No. 3 de acuerdo con la reivindicación 1.

5. El vector de acuerdo con la reivindicación 4 caracterizado porque tiene 5.852 pares de bases incluyendo la SEQ ID No. 1, el cual al ser introducido en la bacteria *E. coli* permite la expresión de la proteína recombinante de la SEQ ID No. 2.

6. El vector de acuerdo con la reivindicación 4 caracterizado porque tiene 5.719 pares de bases incluyendo la SEQ ID No. 2, el cual al ser introducido en la bacteria E. coli permite la expresión de la proteína recombinante de la SEQ ID No. 4.

7. Un método de obtención de una proteína recombinante de fusión de la reivindicación 2 caracterizada porque comprende los siguientes pasos:

a. Transformación de las células competentes de *E. coli* con el vector mediante tratamiento químico combinado con golpe o shock térmico;
b. Seleccionar las colonias transformadas a través de confirmación de presencia del gen diseñado mediante técnica de PCR (reacción de polimerasa en cadena);
c. Expresar la proteína recombinante mediante cultivo celular con antibiótico inducido con IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido);
d. Purificar la proteína recombinante mediante resina de afinidad basada en Níquel previo tratamiento con úrea;
e. Renaturalizar la proteína recombinante mediante la técnica de renaturalizaicón oxidativa asistida con arginina y diálisis.

8. Una vacuna para inmunoterapia de alergia por ácaros domésticos caracterizada porque contiene una se secuencia de amino ácidos que se selecciona del grupo que consiste de la Secuencia ID No. 2 y la Secuencia ID No. 4.

9. Una vacuna para inmunoterapia de alergia por ácaros domésticos caracterizada porque contiene la secuencia de amino ácidos ID No. 2 y la secuencia de amino ácidos ID No. 4.