



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 040**

51 Int. Cl.:
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C07K 16/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02766955 .5**
96 Fecha de presentación : **18.09.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1436320**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2004**

54 Título: **Epítomos de linfocitos T del alérgeno Cyn d 1 de polen de pasto bermuda.**

30 Prioridad: **18.09.2001 AU PR7754**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.06.2011

73 Titular/es: **CIRCASSIA LIMITED**
Magdalen Centre Robert Robinson
Avenue Oxford Science Park
Oxford, Oxfordshire OX4 4GA, GB

72 Inventor/es: **O'Hhehir Robyn y**
Rolland, Jennifer

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 362 040 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

Epítomos de Linfocitos T del Alérgeno Cyn d1 de Polen de Pasto Bermuda

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a moléculas tales como péptidos, polipéptidos y proteínas que interaccionan inmunológicamente con linfocitos T en sujetos que tienen alergia a pasto Bermuda y secuencias genéticas que codifican a los mismos. Estas moléculas son preferentemente inmunointeractivas con linfocitos T en sujetos que tienen alergia al polen de pasto Bermuda. Las moléculas de la presente invención son útiles en el desarrollo de agentes de diagnóstico, terapéuticos y profilácticos para afecciones caracterizadas por una respuesta inmune aberrante, inapropiada o de otro modo no deseada a polen de pasto Bermuda o derivado u homólogo del mismo.

15 **Antecedentes de la invención**

Los detalles bibliográficos de las publicaciones referidas por autor en la presente memoria descriptiva se recopilan alfabéticamente al final de la descripción.

20 La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es y no debería interpretarse como un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que la técnica anterior forma parte del conocimiento general habitual en Australia.

25 El polen de pasto Bermuda (o pasto diente de perro) (*Cynodon dactylon*) es un aeroalérgeno de temporada clínicamente importante en climas subtropicales en todo el mundo y en climas templados en los que el pasto Bermuda se usa de forma creciente en mezclas de cultivo y para evitar la erosión del suelo. En Australia, el polen de lolium generalmente se considera la fuente alérgica de temporada más importante, pero de 736 pacientes en nuestra base de datos de alergias con asma de temporada y/o rinitis, 627 (85 %) están sensibilizados tanto a BGP como a polen de lolium y sólo 100 (14 %) están sensibilizados solamente para polen de lolium. Los pacientes que tienen alergia de temporada clínica debido a lolium tienen síntomas en primavera pero con la alergia al polen de pasto Bermuda los síntomas mayores se prolongan hasta verano tardío en el hemisferio sur.

35 La farmacoterapia es el pilar del tratamiento para enfermedades alérgicas, pero para sujetos seleccionados de otra forma apropiada, la inmunoterapia específica de alérgeno (SIT) ofrece la oportunidad de modificar el transcurso natural de la enfermedad y se ha mostrado que es altamente eficaz y de larga duración en alergia al polen de pasto (Durham S.R., Walker S.M., Varga, E.M., Jacobson, M.R., O'Brien, F., Novel, W., Till S.J., Hamid, Q.A., N. Engl. J. Med, 341:468 = 475, 1999). Sin embargo, aunque la SIT es una práctica clínica aceptada para el tratamiento de rinitis de temporada, el tratamiento apenas se usa en pacientes asmáticos por miedo a inducir asma grave o incluso anafilaxis. En nuestra clínica de alergia, el 50 % de los pacientes con alergia a pasto Bermuda experimenta asma y rinitis. Por lo tanto existe una demanda de regímenes de SIT más seguros para permitir una mayor aplicación para el tratamiento de sensibilidad a polen de pasto Bermuda. Con una creciente apreciación del papel crítico de los linfocitos T en la inducción y regulación de la respuesta inmune a alérgenos, se están explorando nuevas estrategias dirigidas a linfocitos T para SIT. Las preparaciones que carecen de reactividad de unión a IgE pero contienen epítomos de linfocitos T dominantes deberían ser seguras y eficaces.

45 Estudios anteriores han identificado múltiples proteínas reactivas a IgE de polen de pasto Bermuda usando sueros de pacientes alérgicos al polen de pasto Bermuda, con reconocimiento humoral predominante de una proteína, Cyn d 1 (> 76 %), denominada por lo tanto el alérgeno principal de polen de pasto Bermuda (Orren, A. y Dowdle E.B., S. Afred. Med. J., 51:586-591, 1977; Ford, S.A. y Baldo, B.A., J. Allergy Clin. Immunol., 79:711-720, 1987; Shen, H.D., Wang, S.R., Atang, R.B., Chang, Z.N., Han, S.H., Clin. Allergy, 18:401-409, 1988; Matthiesen, F., Schumacher, M.H., Lowenstein, H., J. Allergy Clin. Immunol., 83:1124-1134, 1989). El ADNc que codifica Cyn d 1 se ha clonado y se ha deducido la secuencia de aminoácidos primaria a partir de la secuencia de nucleótidos (Smith, P.M. Suphiogl, C., Griffith, I.J., Theriault, K., Knox, R.B., Singh, M.B., J. Allergy Clin. Immunol., 98:331-343, 1996). Previamente se ha indicado un análisis de reconocimiento de linfocitos T en sangre periférica humana de polen de pasto Bermuda en sujetos no atópicos y alérgicos al polen de pasto Bermuda atópicos (Blaher, B., McCluskey, J., Puy, R., Czarny, D., Rolland, J.M., Immunol. Cell Biol., 73:17-22, 1995). Ambos grupos mostraron respuestas proliferativas de linfocitos T ante polen de pasto Bermuda pero la magnitud de la respuesta de media fue mayor en los atópicos. Los estudios con otros alérgenos indican que una respuesta de citocina tipo Th2 predominante para alérgenos distingue además a los individuos con un fenotipo alérgico (Li, Y., Simons, E.R., Jay, F.T., HayGlass, K.T., Int. Immunol., 8:897-904, 1996). Se ha indicado que la eficacia clínica de SIT está asociada con la reducción en la producción de IL-4 e IL-5 por linfocitos T estimulados con alérgenos (Rolland, J. & O'Hehir, R, Curr Opin Immunol., 10:640-645, 1998). Por lo tanto se requiere un conocimiento exhaustivo de respuestas de linfocitos T específicas de alérgeno para mejorar las preparaciones de SIT.

65 El documento US-B-6 214 3581 presenta tales epítomos de linfocitos T como deseables, pero no demuestra ninguno. Otra técnica anterior ha identificado epítomos de linfocitos B de Cyn d1 (documento WO 9310236 A; HAN S.-H. ET

AL., JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 91, N° 5, 1993, páginas. 1035-1041; CHANG Z.-N. ET AL, INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY vol. 114, N° 3, 1997, páginas. 258-264 y SUPHIOGLU C. ET AL. ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY vol. 409, 1996, páginas. 147-155).

5 No se han presentado determinantes reactivos a linfocitos T para polen de pasto Bermuda. Por lo tanto, una caracterización y elucidación detallada de la respuesta inmune a polen de pasto Bermuda o derivado del mismo tal como Cyn d 1, es crítica para el desarrollo de metodología inmunoterapéutica y de diagnóstico específica.

10 En el trabajo que conduce a la presente invención los inventores han identificado los epítomos de linfocitos T humanos del polen de pasto Bermuda, Cyn d 1. Además, para elucidar los mecanismos de SIT, se ensayaron pacientes sensibles a polen de pasto Bermuda antes y después de inmunoterapia convencional usando una preparación de depósito adaptada que contiene polen de pasto Bermuda 50 % y mezcla de 7 pastos 50 %. Esta preparación se usó debido a que existen homólogos de reactividad cruzada mínimos entre la subfamilia *Pooideae* y polen de pasto Bermuda (Marsh, D.G., Haddad, Z.H., Campbell, D.M., J. Allergy, 46:107-121, 1970; Martin, B.G., Mansfield, L.E., Nelson, H.S., Ann Allergy, 54:99-104, 1985 y Suphioglu, C., Singh, M.B., Knox, RB., Int Arch Allergy Immunol., 102:144-151, 1993). Por lo tanto, se cree que es poco probable que el extracto de mezcla de 7 pastos convencionales (centeno, dactylis, agrostis, pasto azul de Kentucky, alestas, hierba Timotea y cañuela de prados) usadas frecuentemente para inmunoterapia de alergia de polen de pastos alivie los síntomas debido a la sensibilización a polen de pasto Bermuda. Usando blastos de linfocitos T oligoclonales, se mostró que Cyn d 1 era un alérgeno principal de linfocitos T de polen de pasto Bermuda y se identificaron tres regiones altamente inmunogénicas de Cyn d 1. Después de SIT exitosa hubo una reducción notable en la respuesta proliferativa de linfocitos T específica de alérgeno acompañada por una reducción en la relación de IL-5:IFN- γ . La identificación de los epítomos de linfocitos T de polen de pasto Bermuda facilita el desarrollo de moléculas y metodología para el diagnóstico y tratamiento de afecciones caracterizadas por la respuesta inmune aberrante, inapropiada o de otro modo no deseada a polen de pasto Bermuda o derivado u homólogo del mismo.

Sumario de la invención

30 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones a continuación, a no ser que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprende" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un número entero indicado o etapa o grupo de números enteros o etapas pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

35 La memoria descriptiva objeto contiene información de secuencia de nucleótidos preparada usando el programa PatentIn Versión 3.1, presentada en este documento después de la bibliografía. Cada secuencia de aminoácidos se identifica en la lista de secuencias por el indicador numérico <201> seguido del identificador de secuencia de secuencias (por ejemplo, <210> 1, <210> 2, etc.). La longitud, tipo de secuencia (proteína, etc.) y el organismo fuente para cada secuencia de nucleótidos se indica por información proporcionada en los campos indicadores numéricos <211>, <212> y <213>, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos indicadas en la memoria descriptiva se identifican por el indicador SEC ID N° seguido del identificador de secuencia (por ejemplo SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, etc.). El identificador de secuencia indicado en la memoria descriptiva se correlaciona con la información proporcionada en el campo indicador numérico <400> en la lista de secuencias, que está seguida del identificador de secuencia (por ejemplo, <400> 1, <400> 2, etc.). Es decir SEC ID N°: 1 como se detalla en la memoria descriptiva se correlaciona con la secuencia indicada como <400> 1 en la lista de secuencias.

50 Un aspecto de la presente invención proporciona un péptido aislado de 5 a 100 restos de longitud que comprende un epítomo de linfocitos T Cyn d 1, para su uso en el tratamiento o profilaxis de una afección en un sujeto que se caracteriza por una respuesta aberrante, no deseada o de otro modo inapropiada a Cyn d 1; en el que dicha molécula peptídica es capaz de interactuar con linfocitos T y modificar la función de linfocitos T cuando se incuba con células de sujetos que tienen dicha afección; en el que dicho péptido se administra en una cantidad suficiente para reducir o eliminar la presencia o función en el sujeto de linfocitos T y/o anticuerpos dirigidos a Cyn d 1 y en el que dicho péptido:

55 a) comprende al menos 5 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos derivada o seleccionada de:

- (i) aminoácidos 91-110 (SEC ID N°: 12 como se muestra en la Figura 2).
- (ii) aminoácidos 100-119 (SEC ID N°: 13 como se muestra en la Figura 2)
- 60 (iii) aminoácidos 109-128 (SEC ID N°: 14 como se muestra en la Figura 2)
- (iv) aminoácidos 163-182 (SEC ID N°: 20 como se muestra en la Figura 2)
- (v) aminoácidos 172-191 (SEC ID N°: 21, como se muestra en la Figura 2)
- (vi) aminoácidos 181-200 (SEC ID N°: 22 como se muestra en la Figura 2)
- (vii) aminoácidos 190-209 (SEC ID N°: 23, como se muestra en la Figura 2)
- 65 (viii) aminoácidos 217-236 (SEC ID N°: 26 como se muestra en la Figura 2)
- (ix) aminoácidos 222-241 (SEC ID N°: 27, como se muestra en la Figura 2); o

b) es un péptido de (a) que comprende una sustitución de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos derivada o seleccionada de (i) a (ix).

5 En una realización particularmente preferida, el péptido anterior comprende una secuencia de al menos 5 aminoácidos derivados de una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

10 SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA (SEC ID N°: 14)
 PKDSDEFIPMKSSWGAIWRI (SEC ID N°: 22)
 MKSSWGAIWRIDPKKPLKGP (SEC ID N°: 23)
 EGG AHL VQDDVIPANWKPD T (SEC ID N°: 26)
 LVQDDVIPANWKPD TVYTSK (SEC ID N°: 27)

15 Más preferiblemente, el péptido comprende una secuencia de al menos 5 aminoácidos derivados de uno o más de <400> 14 o <400> 26.

20 Otro aspecto de la presente invención proporciona un péptido aislado como se reivindica que comprende cualquier secuencia de aminoácidos derivada de homólogos a Cyn d 1 en el que dicha molécula peptídica es capaz de interactuar con linfocitos T y modificar la función de linfocitos T cuando se incubaba con células de sujetos que tienen una afección caracterizada por una respuesta inmune aberrante, no deseada o de otro modo inapropiada a Cyn d 1 o un derivado, homólogo, análogo, mutante, equivalente químico o mimético de dicho péptido.

25 Otro aspecto adicional de la presente invención proporciona un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de 5-100 restos derivados de, homólogos a o contiguos a los aminoácidos 1-246 inclusive o derivados de los mismos de Cyn d 1 en el que dicha molécula peptídica es capaz de interactuar con linfocitos T y modificar la función de linfocitos T cuando se incubaba con células de sujetos que tienen una afección caracterizada por una respuesta inmune aberrante, no deseada o de otro modo inapropiada a Cyn d 1 o un derivado, homólogo, análogo, mutante, equivalente químico o mimético de dicho péptido.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o profilaxis de una afección en un sujeto, caracterizándose dicha afección por la respuesta inmune aberrante, no deseada o de otro modo inapropiada a Cyn d 1, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un péptido como se ha definido anteriormente en este documento durante un tiempo y en condiciones suficientes para eliminar o reducir la presencia o función en dicho sujeto de linfocitos T dirigidos a dicho Cyn d 1.

35 Otro aspecto adicional de la presente invención contempla el uso de un péptido o anticuerpo como se ha definido en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección en un mamífero, caracterizándose dicha afección por una respuesta inmune aberrante, no deseada o de otro modo inapropiada a Cyn d 1.

40 En otro aspecto adicional más, la presente invención contempla una composición farmacéutica que comprende un péptido o anticuerpo como se ha definido en este documento y uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Dichos agentes se denominan los principios activos.

45 Otro aspecto más de la presente invención se refiere a un péptido o anticuerpo como se ha definido en este documento, cuando se usa en el método de la presente invención.

50 Un aspecto adicional de la presente invención se dirige a un método para diagnosticar o controlar una afección en un mamífero cuya afección se caracteriza por una respuesta aberrante, no deseada o inapropiada a Cyn d 1, comprendiendo dicho método explorar con respecto a linfocitos T reactivos a Cyn d 1 utilizando los péptidos definidos en este documento.

55 En otro aspecto adicional la presente invención proporciona kits de diagnóstico para su uso en la metodología de diagnóstico definida en este documento.

Las abreviaturas de una y tres letras usadas a lo largo de la memoria descriptiva se definen en la Tabla 1.

TABLA 1
Abreviaturas de aminoácidos de una y tres letras

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Símbolo de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	CyS	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V
Cualquier resto	Xaa	X

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 es una representación gráfica de las puntuaciones análogas visuales de pacientes antes y después de SIT. (A), pacientes tratados con dos ciclos de SIT y (B), pacientes tratados con un ciclo de SIT.

La Figura 2 es una representación esquemática de las secuencias de aminoácidos de los péptidos solapantes (SEC ID N°: 2-28) de Cyn d 1 (SEC ID N°: 1). Los restos se indican con el código de una letra.

10 La Figura 3 es una representación gráfica de los cambios en proliferación de linfocitos T (A) y producción de citocinas (B) y (C) después de SIT en un paciente (paciente 2). Se muestra la proliferación antes de SIT ■ (fondo = 2600 cpm), después de 1-SIT (un ciclo) (fondo = 4700 cpm) y después de 2-SIT (dos ciclos) □ (fondo = 8000 cpm). La producción de IL-5 (B) e IFN- γ (C) en sobrenadantes de cultivo se evaluó por ELISA. Se midieron los niveles de citocinas para péptidos que indujeron una respuesta proliferativa $\geq 2,5$ veces el fondo antes de SIT. Los valores indican las medias de muestras duplicadas.

15 La Figura 4 es una representación gráfica de los cambios en respuestas proliferativas de linfocitos T a polen de pasto Bermuda (A) y (B) y Cyn d 1 (C) y (D) en pacientes alérgicos al polen de pasto Bermuda. La máxima respuesta para cada antígeno se expresa como un índice de estimulación y se compara antes de SIT y después de SIT [un ciclo (después de 1), dos ciclos (después de 2)].

20 La Figura 5 es una representación gráfica del cambio en la frecuencia de reconocimiento de péptidos (SI $\geq 2,5$) después de SIT en pacientes alérgicos al polen de pasto Bermuda. Se compara la proliferación antes de SIT (A), después de un ciclo de SIT (B) y después se dos ciclos de SIT (C).

25 La Figura 6 es una representación gráfica de la comparación de niveles de citocinas antes y después de SIT (1 ó 2 ciclos) en pacientes alérgicos al polen de pasto Bermuda.

30 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de regiones epitópicas de linfocitos T de polen de pasto Bermuda. La identificación de los epítomos inmunodominantes del polen de pasto Bermuda y en particular Cyn d 1 ha permitido la mejora de la metodología diagnóstica y el desarrollo de composiciones terapéuticas y profilácticas y enfoques de tratamiento para afecciones tales como, pero sin limitación, alergia al polen de pasto Bermuda.

35 De acuerdo con la presente invención, los péptidos solapantes se sintetizaron basándose en la secuencia de aminoácidos de Cyn d 1 desvelada en <400> 1. La inmunorreactividad de linfocitos T de estos péptidos se identifica de acuerdo con la presente invención basándose en la interactividad de células de sangre periférica o linfocitos T obtenidos de la sangre periférica de sujetos con rinitis de temporada grave y/o asma. La identificación y generación de estas moléculas forma por lo tanto la base de una nueva serie de reactivos y procedimientos diagnósticos, terapéuticos y profilácticos.

Cyn d 1 es una proteína que se ha identificado en polen de pasto Bermuda (también conocido como pasto diente de perro o *Cynodon dactylon*). En consecuencia, la referencia a “Cyn d 1” debería entenderse como inclusiva de referencias a todas las formas de Cyn d 1 o derivados, mutantes, homólogos, análogos, equivalentes o miméticos del mismo. Esto incluye, por ejemplo, todas las formas proteicas de Cyn d 1 o su equivalente funcional o derivado incluyendo, por ejemplo, cualquier isoforma que pueda surgir de corte y empalme alternativo de ARNm de Cyn d 1. Por ejemplo, debería entenderse que “Cyn d 1” abarca las 10 isoformas de Cyn d 1 descritas por Chang *et al* (Clin. Exp. Allergy, 29:488-496, 1999) y las isoformas descritas por Smith *et al* (1996, mencionado anteriormente). Incluye referencia a mutantes, variantes polimórficas u homólogos de Cyn d 1. También incluye referencia a análogos o equivalentes de Cyn d 1 tales como los que pueden aparecer cuando se genera sintéticamente un producto que comprende de forma natural Cyn d 1 con el fin de generar un producto. La presente invención proporciona por lo tanto epitopos y métodos para su uso en el diagnóstico y tratamiento de cualquier afección caracterizada por hipersensibilidad a una molécula de Cyn d 1 o de tipo Cyn d 1 tales como asma o alergias a polen de pasto Bermuda. Preferiblemente, dicha Cyn d 1 comprende la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1 o es un derivado, homólogo, análogo, equivalente químico, mutante o mimético de dicha secuencia.

La presente invención proporciona por lo tanto un péptido aislado de 5 a 100 restos de longitud que comprende un epitopo de linfocitos T Cyn d I para su uso en el tratamiento o profilaxis de una afección en un sujeto que se caracteriza por una respuesta aberrante, no deseada o de otro modo inapropiada para Cyn d 1; siendo dicha molécula peptídica capaz de interactuar con linfocitos T y modificar la función de linfocitos T cuando se incubaba con células de sujetos que tienen dicha afección; administrándose dicho péptido en una cantidad suficiente para eliminar o reducir la presencia o función en el sujeto de linfocitos T y/o anticuerpos dirigidos a Cyn d 1; y en el que dicho péptido:

a) comprende al menos 5 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos derivada o seleccionada de:

- (i) aminoácidos 91-110 SEC ID: 12 como se muestra en la Figura 2)
- (ii) aminoácidos 100-119 SEC ID: 13 como se muestra en la Figura 2)
- (iii) aminoácidos 109-128 SEC ID: 14 como se muestra en la Figura 2)
- (iv) aminoácidos 163-182 SEC ID: 20 como se muestra en la Figura 2)
- (v) aminoácidos 172-191 SEC ID: 21 como se muestra en la Figura 2)
- (vi) aminoácidos 181-200 SEC ID: 22 como se muestra en la Figura 2)
- (vii) aminoácidos 190-209 SEC ID: 23 como se muestra en la Figura 2)
- (viii) aminoácidos 217-236 SEC ID: 26 como se muestra en la Figura 2)
- (ix) aminoácidos 222-241 SEC ID: 27 como se muestra en la Figura 2); o

b) es un péptido de (a) que comprende una sustitución de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos derivada o seleccionada de (i) a (ix).

De forma aún más particular, dicho péptido para dicho uso es cualquier secuencia de aminoácidos de 5 a 100 restos derivada de, homóloga a o contigua a los aminoácidos 91-110, 100-119, 109-128, 163-182, 172-191, 181-200, 190-209, 217-236 y/o 222-241 inclusive o derivados de los mismos de Cyn d 1.

De forma aún más particular, dicho péptido para dicho uso es cualquier secuencia de aminoácidos de 5 a 100 restos derivada de, homóloga a o contigua a los aminoácidos 109-128, 181-209 y/o 217-241 inclusive o derivados de los mismos de Cyn d 1.

De forma más particular, dicho péptido para dicho uso es cualquier secuencia de aminoácidos de 5 a 100 restos derivada de, homóloga a o contigua a los aminoácidos 109-128 inclusive o derivados de los mismos de Cyn d 1.

De forma aún más particular, dicho péptido para dicho uso es cualquier secuencia de aminoácidos de 5 a 100 restos derivada de, homóloga a o contigua a los aminoácidos 181-200 y/o 190-209 inclusive o derivados de los mismos de Cyn d 1.

De forma aún más particular, dicho péptido para dicho uso es cualquier secuencia de aminoácidos de 5 a 100 restos derivada de, homóloga a o contigua a los aminoácidos 217-236 y/o 222-241 inclusive o derivados de los mismos de Cyn d 1.

La referencia a “linfocitos T” debería entenderse como una referencia a cualquier célula que comprende un receptor de linfocitos T. A este respecto, el receptor de linfocitos T puede comprender una cualquiera o más de las cadenas α , β , γ o δ . No se pretende que la presente invención se limite a ninguna subclase funcional particular de linfocitos T aunque en una realización preferida el linfocito T sujeto es un linfocito T auxiliar y aún más preferiblemente un linfocito de tipo Th2, predominantemente. A este respecto, la referencia a “modificar la función de linfocitos T” debería entenderse como una referencia a modificar una cualquiera o más funciones que un linfocito T es capaz de realizar. Por ejemplo, la función sujeto puede ser proliferación, diferenciación u otra forma de actividad funcional celular tal como la producción de citocinas. Preferiblemente, la actividad funcional del sujeto es la proliferación.

En términos de modificar la función de linfocitos T de sujetos que tienen una afección caracterizada por una respuesta inmune aberrante, no deseada o inapropiada a Cyn d 1, debería entenderse que esta no es necesariamente una referencia a modificar la función de todos los linfocitos T en una muestra dada sino que es probable, de hecho, que refleje la modificación o funcionamiento de solamente alguno de los linfocitos T de la muestra. Por ejemplo, solamente una parte de los linfocitos T auxiliares en una muestra de linfocitos T dada puede responder funcionalmente al contacto con el péptido sujeto. Debería entenderse que una respuesta parcial tal queda dentro del alcance de la presente invención. También debería entenderse que los linfocitos T que derivan del sujeto pueden ser linfocitos T recién recogidos o pueden haber experimentado alguna forma de manipulación *in vitro* o *in vivo* antes de los ensayos. Por ejemplo, las líneas de linfocitos T pueden haberse generado a partir de la muestra celular y son estas líneas de linfocitos T las que forman después la población de linfocitos T derivados del sujeto que se ensaya de acuerdo con la presente invención. En tanto que la actividad funcional sujeto es proliferación de linfocitos T, el ensayo de proliferación de linfocitos T se realiza preferiblemente como se describe en este documento. Aún más preferiblemente, la modificación sujeto de función de linfocitos T es la inducción de un índice de proliferación de > 2,5.

La referencia a una respuesta inmune “aberrante, no deseada o de otro modo inapropiada” debería entenderse como una referencia a cualquier forma de actividad fisiológica que implique la activación y/o funcionamiento de una o más células inmunes en las que esa actividad es inapropiada en tanto que es de un tipo inapropiado o sucede en un grado inapropiado. Puede ser aberrante en tanto que de acuerdo con principios inmunológicos conocidos no debería producirse cuando lo hace o debería producirse cuando no lo hace. En otro ejemplo, la respuesta inmune puede ser inapropiada en tanto que es una respuesta fisiológicamente normal pero que es innecesaria y/o no deseada, tal como se produce con respecto a respuestas de hipersensibilidad de tipo I a alérgenos inocuos. Preferiblemente dicha respuesta inmune es hipersensibilidad a polen de pasto Bermuda.

La referencia a “hipersensibilidad a polen de pasto Bermuda” debería entenderse que significa la muestra de síntomas clínicos de hipersensibilidad a polen de pasto Bermuda mediada por IgE, por ejemplo rinitis y/o asma con confirmación de IgE específica de pasto Bermuda según se determina mediante ensayos de puntura para extracto de polen de pasto Bermuda (diámetros de granos ≥ 5 mm) y/o usando el sistema Kallestad Allercot EAST (Sanofi-Pasteur Diagnostics, Estados Unidos) \geq Clase 1 o Pharmacia UniCAP Clase ≥ 1 .

En una realización preferida, dicho péptido para dicho uso comprende no menos de aproximadamente 5 y no más de aproximadamente 50 restos aminoacídicos, más preferiblemente no menos de aproximadamente 5 y no más de aproximadamente 30 restos aminoacídicos e incluso más preferiblemente no menos de aproximadamente 5 y no más de aproximadamente 20.

En una realización particularmente preferida, dicho péptido para dicho uso comprende una secuencia de al menos 5 aminoácidos derivada de una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

40 SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA <400> 14
 PKDSDEFIPMKSSWGAIWRI <400> 22
 MKSSWGAIWRIDPKKPLKGP <400> 23
 EGG AHLVQDDVIPANWKPDT <400> 26
 LVQDDVIPANWKPDTVYTSK <400> 27

Más preferiblemente, dicho péptido para dicho uso comprende una secuencia de al menos 5 aminoácidos derivada de una o más de <400> 14 o <400> 26.

La referencia a un “péptido” incluye referencia a un péptido, polipéptido o proteína o partes de los mismos. El péptido puede estar glucosilado o no glucosilado y/o puede contener una serie de otras moléculas fusionadas, ligadas, unidas o asociadas de otro modo a la proteína tales como aminoácidos, lípidos, carbohidratos u otros péptidos, polipéptidos o proteínas. La referencia en lo sucesivo en este documento a un “péptido” incluye un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos así como un péptido asociado con otras moléculas tales como aminoácidos, lípidos, carbohidratos u otros péptidos, polipéptidos o proteínas.

Las variantes de aminoácidos sustitutivas son en las que se ha eliminado un resto en la secuencia y se ha insertado un resto diferente en su lugar. Un ejemplo de variantes de aminoácidos sustitutivas son sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones de aminoácidos conservativas típicamente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina y glutamina; serina y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Las adiciones a secuencias de aminoácidos incluyen fusiones con otros péptidos, polipéptidos o proteínas.

Los equivalentes químicos y funcionales del péptido sujeto deberían entenderse como moléculas que muestran una cualquiera o más de las actividades funcionales de estas moléculas y pueden derivar de cualquier fuente tal como sintetizarse químicamente o identificarse mediante procedimientos de exploración tales como exploración de productos naturales.

Los derivados incluyen fragmentos que tienen epítomos particulares o partes de la proteína completa fusionados con péptidos, polipéptidos u otras moléculas proteínicas o no proteínicas.

5 Los análogos contemplados en este documento incluyen, pero sin limitación, modificación a cadenas laterales, incorporación de aminoácidos no naturales y/o sus derivados durante síntesis de péptidos, polipéptidos o proteínas y el uso de entrecruzadores y otros métodos que imponen restricciones conformacionales sobre las moléculas proteínicas o sus análogos.

10 Los ejemplos de modificaciones de cadenas laterales contemplados por la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tales como por alquilación reductora por reacción con un aldehído seguido de reducción de reducción con NaBH₄; amidación con metilacetimidato; acilación con anhídrido acético; carbamitación de grupos amino con cianato; trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS); acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; y piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido de reducción con NaBH₄.

El grupo guanidina de los restos de arginina puede modificarse por la formación de productos de condensación heterocíclica con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilgloxal y glioxal.

20 El grupo carboxilo puede modificarse por activación de carbodiimida mediante formación de O-acilisourea seguido de derivación posterior, por ejemplo, a una amida correspondiente.

25 Los grupos sulfhidrilo pueden modificarse por métodos tales como carboximetilación con ácido yodoacético o yodacetamida; oxidación de ácido per fórmico a ácido cisteico; formación de un disulfuro mezclado con otros compuestos de tiol; reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; formación de derivados de mercurio usando 4-cloromercuribenzoato, ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, cloruro de fenilmercurio, 2-cloromercuri-4-nitrofenol y otros compuestos de mercurio; carbamitación con cianato a pH alcalino.

30 Los resto de triptófano pueden modificarse mediante, por ejemplo, oxidación con N-bromosuccinimida o alquilación del anillo indol con 2-hidroxi-5-nitrobencilbromuro o haluros de sulfenilo. Los restos de tirosina por otro lado, pueden alterarse por nitración con tetranitrometano para formar un derivado de 3-nitrotirosina.

La modificación del anillo de imidazol de un resto de histidina puede conseguirse mediante alquilación con derivados de ácido yodoacético o N-carboetoxilación con dietilpirocarbonato.

35 Los ejemplos de incorporación de aminoácidos no naturales y derivados durante la síntesis proteica incluyen, pero sin limitación, uso de norleucina, ácido 4-amino butírico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 6-aminohexanoico, t-butilglicina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, 2-tienil alanina y/o isómeros D de aminoácidos. Una lista de aminoácidos no naturales contemplados en este documento se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2

Aminoácido no-convencional	Código	Aminoácido no-convencional	Código
ácido α -aminobutírico	Abu	L-N-metilalanina	Nmala
α -amino- α -metilbutirato	Mgabu	L-N-metilarginina	Nmarg
aminociclopropano-carboxilato	Cpro	L-N-metilasparagina	Nmasn
ácido aminoisobutírico	Aib	L-N-ácido metilaspártico	Nmasp
aminonorbomil-carboxilato	Norb	L-N-metilcisteína	Nmcys
ciclohexilalanina	Chexa	L-N-metilglutamina	Nmgln
ciclopentilalanina	Cpen	L-N-ácido metilglutámico	Nmglu
D-alanina	Dal	L-N-metilhistidina	Nmhis
D-arginina	Darg	L-N-metilisoleucina	Nmile
D-ácido aspártico	Dasp	L-N-metilleucina	Nmleu
D-cisteína	Dcys	L-N-metil lisina	Nmlys
D-glutamina	Dgln	L-N-metilmetionina	Nmmet
D-ácido glutámico	Dglu	L-N-metilorleucina	Nmnle
D-histidina	Dhis	L-N-metilnorvalina	Nmnva
D-isoleucina	Dile	L-N-metilornitina	Nmorn
D-leucina	Dleu	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
D-lisina	Dlys	L-N-metilprolina	Nmpro
D-metionina	Dmet	L-N-metilserina	Nmser
D-ornitina	Dorn	L-N-metilreonina	Nmthr
D-fenilalanina	Dphe	L-N-metiltryptófano	Nmtrp
		L-N-metil tirosina	Nmtyr
		L-N-metilvalina	Nmval

Aminoácido no-convencional	Código	Aminoácido no-convencional	Código
D-prolina	Dpro	L-N-metiletilglicina	Nmetg
D-serina	Dser	L-N-metil-t-butilglicina	Nmtbug
D-treonina	Dthr	L-norleucina	Nle
D-triptófano	Dtrp	L-norvalina	Nva
D-tirosina	Dtyr	α -metil-aminoisobutirato	Maib
D-valina	Dval	α -metil-aminobutirato	Mgab
D- α -metilalanina	Dmala	α -metilciclohexilalanina	Mchexa
D- α -metilarginina	Dmarg	α -metilciclopentilalanina	Mcpen
D- α -metilasparagina	Dmasn	α -metil- α -naptilalanina	Manap
D- α -metilaspartato	Dmasp	α -metilpenicilamina	Mpen
D- α -metilcisteína	Dmcys	N-(4-aminobutil)glicina	Nglu
D- α -metilglutamina	Dmgln	N-(2-aminoetil)glicina	Naeg
D- α -metilhistidina	Dmhis	N-(3-aminopropil)glicina	Nom
D- α -metilisoleucina	Dmile	N-amino- α -metilbudirato	Nmaabu
D- α -metil leucina	Dmleu	α -naptilalanina	Anap
D- α -metil lisina	Dmlys	N-bencilglicina	Nphe
D- α -metilmetionina	Dmmet	N-(2-carbamiletil)glicina	Ngln
D- α -metilornitina	Dmorn	N-(carbamiletil)glicina	Nasn
D- α -metilfenilalanina	Dmphe	N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
D- α -metilprolina	Dmpro	N-(carboximetil)glicina	Nasp
D- α -metilserina	Dmser	N-ciclobutilglicina	Ncbut
D- α -metiltreonina	Dmthr	N-cicloheptilglicina	Nchep
D- α -metiltriptófano	Dmtrp	N-ciclohexilglicina	Nchex
D- α -metiltirosina	Dmtyr	N-ciclododecilglicina	Ncdec
D- α -metilvalina	Dmval	N-cilododecilglicina	Ncdod
D-N-metilalanina	Dnmala	N-ciclooctilglicina	Ncoct
D-N-metilarginina	Dnmarg	N-ciclopropilglicina	Ncpro
D-N-metilasparagina	Dnmasn	N-cicoundecilglicina	Ncund
D-N-metilaspartato	Dnmasp	N-(2,2-difeniletil)glicina	Nbhm
D-N-metilcisteína	Dnmcys	N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe
D-N-metilglutamina	Dnmgln	N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
D-N-metilglutamato	Dnmglu	N-(1-hidroxietil)glicina	Nthr
D-N-metilhistidina	Dnmhis	N-(hidroxietil)glicina	Nser
D-N-metilisoleucina	Dnmile	N-(imidazoliletil)glicina	Nhis
D-N-metil leucina	Dnmleu	N-(3-indoliletil)glicina	Nhtrp
D-N-	Dnmlys	N-metil- γ -aminobutirato	Nmgabu
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	D-N-metilmetionina	Dnmmet
D-N-metilornitina	Dnmorn	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
N-metilglicina	Nala	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	D-N-metilprolina	Dnmpro
N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmtr
D-N-metiltriptófano	Dmtrp	N-(1-metiletil)glicina	Nval
D-N-metiltirosina	Dnmtyr	N-metila-naptilalanina	Nmanap
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicilamina	Nmpen
ácido γ -aminobutírico	Gabu	N-(p-hidroxifenil)glicina	Nhtyr
L-t-butilglicina	Tbug	N-(tiometil)glicina	Ncis
L-etilglicina	Etg	penicilamina	Pen
L-homofenilalanina	Hphe	L- α -metilalanina	Mala
L- α -metilarginina	Marg	L- α -metilasparagina	Masn
L- α -metilaspartato	Masp	L- α -metil-t-butilglicina	Mtbug
L- α -metilcisteína	Mcys	L-metiletilglicina	Metg
L- α -metilglutamina	Mgln	L- α -metilglutamato	Mglu
L- α -metilhistidina	Mhis	L- α -metilhomofenilalanina	Mhphe
L- α -metilisoleucina	Mile	N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
L- α -metil leucina	Mleu	L- α -metil lisina	Mlis
L- α -metilmetionina	Mmet	L- α -metilnorleucina	Mnle
L- α -metilnorvalina	Mnva	L- α -metilornitina	Morn
L- α -metilfenilalanina	Mphe	L- α -metilprolina	Mpro
L- α -metilserina	Mser	L- α -metiltreonina	Mthr
L- α -metiltriptófano	Mtrp	L- α -metiltirosina	Mtir

Aminoácido no-convencional	Código	Aminoácido no-convencional	Código
L- α -metilvalina	Mval	L-N-metilhomofenilalanina	Nmhphe
N-(N-(2,2-difeniletíl) carbamilmetil)glicina	Nnbhm	N-(N-(3,3-difenilpropil) carbamilmetil)glicina	Nnbhe
1-carboxi-1-(2,2-difenil-Nmbc etilamino)ciclopropano			

5 Los entrecruzadores pueden usarse, por ejemplo, para estabilizar conformaciones en tres dimensiones, usando entrecruzadores homobifuncionales tales como los imido ésteres bifuncionales que tienen grupos espaciadores (CH₂)_n con n=1 a n=6, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida y reactivos hetero-bifuncionales que habitualmente contienen un resto amino-reactivo tal como N-hidroxisuccinimida y otro resto reactivo específico de grupo.

10 Es posible modificar la estructura de un péptido de acuerdo con la invención para diversos fines tales como aumentar la solubilidad, mejorar la eficacia terapéutica o preventiva, mejorar la estabilidad o aumentar la resistencia a degradación proteolítica. Se puede producir un péptido modificado en el que la secuencia de aminoácidos se haya alterado, tal como por sustitución, delección o adición de aminoácidos, para modificar la inmunogenicidad y/o reducir la alergenicidad. De forma similar pueden añadirse componentes a péptidos a la invención para producir el mismo resultado.

15 Por ejemplo, un péptido puede modificarse de modo que muestre la capacidad de inducir anergia de linfocitos T. En este caso, los restos de unión críticos para el receptor de linfocitos T puede determinarse usando técnicas conocidas (por ejemplo sustitución de cada resto y determinación de la presencia o ausencia de reactividad de linfocitos T). En un ejemplo, los restos que se muestra que son esenciales para interactuar con el receptor de linfocitos T pueden modificarse reemplazando el aminoácido esencial con otro resto aminoacídico preferiblemente similar (una sustitución conservativa) cuya presencia se muestra que altera la reactividad de linfocitos T o el funcionamiento de linfocitos T. Además, los restos aminoacídicos que no son esenciales para la interacción del receptor de linfocitos T puede modificarse reemplazándolos con otro aminoácido cuya incorporación pueda después alterar la reactividad de linfocitos T o el funcionamiento de linfocitos T pero no, por ejemplo, eliminar la unión a proteínas del CMH relevantes.

20 Tales modificaciones da como resultado la producción de moléculas que quedan dentro del alcance de los "mutantes" del péptido sujeto como se define en este documento. "Mutantes" debería entenderse como una referencia a péptidos que muestran una o más características estructurales o actividades funcionales que son distintas de las mostradas por el homólogo peptídico no mutado.

30 Los péptidos de la invención también puede modificarse para incorporar uno o más polimorfismos resultantes de variación alélicas natural y aminoácidos D, aminoácidos no naturales o análogos de aminoácidos pueden sustituirse en los péptidos para producir péptidos modificados que quedan dentro del alcance de la invención. Los péptidos también pueden modificarse por conjugación con polietilenglicol (PEG) por técnicas conocidas. También puede añadirse grupos indicadores para facilitar la purificación y potencialmente aumentar la solubilidad de los péptidos de acuerdo con la invención. Otros tipos de modificación bien conocidos que incluyen inserción de sitios de escisión de endoproteasas específicos, adición de grupos funcionales o reemplazo de restos hidrófobos con restos menos hidrófobos así como mutagénesis dirigida de ADN que codifica los péptidos de la invención también pueden usarse para introducir modificaciones que podrían ser útiles para una amplia serie de fines. Las diversas modificaciones a péptidos de acuerdo con la invención que se han mencionado anteriormente se mencionan como ejemplos solamente y se pretende exclusivamente que sean indicativos de la amplia serie de modificaciones que pueden efectuarse.

45 Otro aspecto de la presente invención proporciona un péptido aislado de 5 a 20 restos de longitud que comprende un epítipo de linfocitos T Cyn d 1, en el que dicha molécula peptídica es capaz de interactuar con linfocitos T y modificar la función de linfocitos T cuando se incuba con células de sujetos que tienen dicha afección; y en el que dicho péptido:

50 a) Comprende al menos 5 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos derivada o seleccionada de

- 55 (i) aminoácidos 100-119 (SEC ID N°: 13 como se muestra en la figura 2)
(ii) aminoácidos 109-128 (SEC ID N°: 14 como se muestra en la figura 2)
(iii) aminoácidos 163-182 (SEC ID N°: 20 como se muestra en la figura 2)
(iv) aminoácidos 172-191 (SEC ID N°: 21 como se muestra en la figura 2)
(v) aminoácidos 181-200 (SEC ID N°: 22 como se muestra en la figura 2); o
(vi) aminoácidos 190-209 (SEC ID N°: 23 como se muestra en la figura 2)

b) es un péptido de (a) que comprende una sustitución de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos derivada o seleccionada (i) a (vii).

5 En otro aspecto dicha secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de al menos 5 aminoácidos derivada de una o más de la siguiente secuencias de aminoácidos:

10 SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA <400> 14
 PKDSDEFIPMKSSWGAIWRI <400> 22
 MKSSWGAIWRIDPKKPLKGP <400> 23
 EGG AHLVQDDVIPANWKPDT <400> 26
 LVQDDVIPANWKPDTVYTSK <400> 27

15 De acuerdo con este aspecto, dicha secuencia de aminoácidos preferiblemente comprende una secuencia de al menos 5 aminoácidos derivados de uno o más de <400> 14 o <400> 26.

Los péptidos de la presente invención pueden prepararse por medios sintéticos químicos o recombinantes. De acuerdo con un aspecto preferido de la presente invención, se proporciona un péptido recombinante que es preferentemente inmunológicamente reactivo con linfocitos T de individuos con hipersensibilidad a polen de Pasto Bermuda, que se expresa por la expresión de una célula hospedadora transformada con un vector que codifica la secuencia peptídica de la presente invención. El péptido puede fusionarse con otro péptido, polipéptido o proteína. Como alternativa, el péptido puede prepararse por técnicas sintéticas químicas, tales como por el procedimiento de síntesis de fase sólida de Merrifield. Además, aunque los péptidos sintéticos de la fórmula proporcionada anteriormente representan una realización preferida, la presente invención también se extiende a preparaciones biológicamente puras de los péptidos de origen natural o fragmentos de los mismos. Por "biológicamente pura" se entiende una preparación que comprende al menos aproximadamente 60 %, preferiblemente al menos aproximadamente 70 % o preferiblemente al menos aproximadamente 80 % y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 90 % o más según se determina por peso, actividad u otros medios adecuados.

30 En otro aspecto puede ser particularmente útil generar un péptido mutante que comprende regiones epitópicas de linfocitos T pero careciendo dichos péptidos de epítomos de linfocitos B capaces de interactuar con IgE. Tales péptidos pueden generarse por síntesis de péptidos que comprenden solamente epítomos de linfocitos T o por mutación de moléculas de origen natural de modo que los epítomos de linfocitos T sigan siendo funcionales mientras que los epítomos de linfocitos B se alteran para evitar la unión de anticuerpos.

35 Debería por lo tanto entenderse que la presente invención abarca péptidos que comprenden al menos un epítomo de linfocitos T o B de Cyn d 1 junto con otros aminoácidos (que pueden o no ser de origen natural como análogos de aminoácidos) u otras especies químicas. En un aspecto preferido de la invención tales péptidos pueden comprender uno o más epítomos de Cyn d 1, pudiendo dichos epítomos ser epítomos de linfocitos T o B. Los péptidos con uno o más epítomos de linfocitos T de Cyn d 1 son deseables para un aumento de la eficacia terapéutica.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o complementaria a una secuencia que codifica los péptidos como se han definido anteriormente en este documento o un derivado, homólogo o análogos de la misma. Debería entenderse que la referencia a "péptidos" incluye referencias a péptidos que comprenden uno o más epítomos de linfocitos T. Una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido sujeto es preferiblemente una secuencia de ácidos desoxirribonucleicos tales como ADNc o una secuencia genómica. Una secuencia genómica puede comprender exones e intrones. Una secuencia genómica también puede incluir una región promotora u otras regiones reguladoras.

50 La molécula de ácido nucleico puede estar ligada a un vector de expresión capaz de expresarse en una célula procariota (por ejemplo *E. coli*) o una célula eucariota (por ejemplo, células de levadura, células fúngicas, células de insecto, células de mamífero o células vegetales). La molécula de ácido nucleico puede ligarse o fusionarse o asociarse de otro modo con una molécula de ácido nucleico que codifica otra entidad tal como, por ejemplo, un péptido señal. También puede comprender información de secuencias de nucleótidos adicionales fusionadas, ligadas o asociadas de otro modo con las partes 3' o 5' terminales o en ambas partes 3' y 5' terminales. La molécula de ácido nucleico puede también ser parte de un vector, tal como un vector de expresión. La última realización facilita la producción de formas recombinantes del péptido sujeto abarcándose dichas formas por la presente invención.

60 Tales ácidos nucleicos pueden ser útiles para producción recombinante de epítomos de linfocitos T de Cyn d 1 o proteínas que los comprenden por inserción en un vector apropiado y transfección en una línea celular adecuada. Tales vectores de expresión y líneas celulares hospedadoras también forman un aspecto de la invención.

65 Al producir péptidos por técnicas recombinantes, las células hospedadoras transformadas con un ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica un péptido de acuerdo con la invención o un equivalente funcional de la secuencia

de ácido nucleico se cultivan en un medio adecuado para las células particulares implicadas. Los péptidos pueden después purificarse a partir de medio de cultivo celular, las células hospedadoras o ambos usando técnicas bien conocidas en la materia tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis o inmunopurificación con anticuerpos específicos para el péptido.

Los ácidos nucleicos que codifican Cyn d 1 o péptidos que comprenden epítomos de linfocitos T y/o B de Cyn d 1 pueden expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto o células de levadura o de mamífero tales como células de ovario de hámster Chino (CHO). Los vectores de expresión, promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión adecuados se indican en Sambrock (Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989). Otros vectores de expresión, promotores, potenciadores y otros elementos de expresión adecuados se conocen bien por los expertos en la materia. Los ejemplos de vectores de expresión adecuados en levadura incluyen Yep Sec 1 (Balderi *et al.*, 1987, *Embo. J.*, 6:229-234); pMFa (Kurjan y Herskowitz, *Cell*, 30:933-943, 1982); JRY88 (Schultz *et al.*, *Gene*, 54:113-123, 1987) y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Estos vectores están libremente disponibles como lo están sistemas de expresión de baculovirus y mamíferos. Por ejemplo, un sistema de baculovirus está disponible en el mercado (ParMingon, San Diego, CA) para expresión en células de insecto mientras que el vector pMsg está disponible en el mercado (Pharmacia, Piscataway, NJ) para expresión en células de mamífero.

Para expresión en *E. coli* los vectores de expresión adecuados incluyen entre otros, pTrc (Amann *et al.*, *Gene*, 69:301-315, 1988) pGex (Amrad Corporation, Melbourne, Australia); pMal (N.E. Biolabs, Beverley, MA); pRit5 (Pharmacia, Piscataway, NJ); pEt-11d (Novagen, Maddison, WI) (Jameel *et al.*, *J. Virol.*, 64:3963-3966 1990) y pSem (Knapp *et al.*, *Bio Techniques*, 8:280-281, 1990). El uso de pTRC y pEt-11d, por ejemplo, conducirá a la expresión de proteína no fusionada. El uso de pMal, pRit5, pSem y pGex conducirá a la expresión de alérgeno fusionado con proteína de unión a maltosa E (pMal), proteína A (pRit5), galactosidasa truncada (PSEM) o glutatión S-transferasa (pGex). Cuando un epítomo de linfocitos T de Cyn d 1 o un péptido que lo comprende se expresa como una proteína de fusión, es particularmente ventajoso introducir un sitio de escisión enzimática en el punto de fusión entre la proteína vehículo y el péptido implicado. El péptido de la invención puede después recuperarse de la proteína de fusión a través de escisión enzimática en el sitio enzimático y purificación bioquímica usando técnicas convencionales para la purificación de proteínas y péptidos. Los ejemplos de sitios de escisión enzimática incluyen los de factor de coagulación sanguínea Xa o trombina para los que las enzimas y protocolos apropiados para escisión están disponibles en el mercado. Los diferentes vectores también tienen diferentes regiones promotoras que permiten la expresión constitutiva o inducible o inducción por temperatura. Adicionalmente puede ser apropiado expresar péptidos recombinantes en diferentes hospedadores *E. coli* que tienen una capacidad alterada para degradar las proteínas expresadas recombinantemente. Como alternativa, pueden ser ventajoso alterar la secuencia de ácido nucleico para usar codones preferentemente utilizados por *E. coli*, en los que dicha alteración de ácido nucleico no afectaría a la secuencia de aminoácidos de las proteínas expresadas.

Las células hospedadoras pueden transformarse para expresar los ácidos nucleicos de la invención usando técnicas convencionales tales como co-precipitación con fosfato cálcico o cloruro cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano o electroporación. Los métodos adecuados para transformar las células hospedadoras pueden encontrarse en (Sambrock *et al.*, 1989) y otros libros de texto de laboratorio. La secuencia de ácido nucleico de la invención también puede sintetizarse químicamente usando técnicas convencionales.

Además de la producción recombinante de péptidos de acuerdo con la invención, los ácidos nucleicos puede utilizarse como sondas para fines de purificación o experimentales.

La identificación de regiones epitópicas de linfocitos T facilita la identificación y/o diseño racional de una serie de moléculas peptídicas mutantes. Como se ha detallado anteriormente en este documento, estos péptidos mutantes pueden comprender uno o más epítomos de linfocitos B mutados. Sin embargo se proporciona alcance para la generación de péptidos mutantes que comprenden epítomos de linfocitos B mutados o combinaciones de epítomos de linfocitos B y T intactos frente a mutados. Las aplicaciones de estas moléculas se describen en más detalle posteriormente pero en una realización preferida se refieren a modulación de la respuesta inmune de hipersensibilidad a Cyn d 1 en términos de un tratamiento profiláctico o terapéutico.

La identificación y síntesis de los epítomos de linfocitos T Cyn d 1 como se describe en este documento facilita ahora el desarrollo de una serie de protocolos de tratamiento terapéutico/profiláctico y de diagnóstico para su uso con respecto a afecciones inmunes relacionadas con Cyn d 1. También se facilita el desarrollo de reactivos para su uso en los mismos. En consecuencia, debería entenderse que la presente invención se extiende al uso de los péptidos y anticuerpos monoclonales o derivados, homólogos, análogos, mutantes, equivalentes químicos o miméticos de los mismos en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de los pacientes. Tales métodos de tratamiento incluyen, pero sin limitación:

- (i) Administración de los péptidos sujeto a un paciente como un medio de desensibilizar o inducir tolerancia inmunológica a Cyn d 1 o moléculas de tipo Cyn d 1. Esto puede conseguirse, por ejemplo, induciendo anergia de Th2 dirigida a Cyn d 1 o apoptosis. Dicho resultado puede conseguirse por uno cualquiera de varias técnicas incluyendo el uso de péptidos que mantiene la reactividad de epítomos de linfocitos T pero que de forma natural

o como resultado de mutación son incapaces de experimentar unión a IgE. Como alternativa, pueden utilizarse protocolos de desensibilización/tratamiento que están basados en la administración de concentraciones específicas de un péptido dado de acuerdo con un régimen específico para inducir tolerancia. Dicha metodología puede eliminar hipersensibilidad a Cyn d 1 o puede reducir la gravedad de hipersensibilidad a Cyn d 1. Preferiblemente tales regímenes de tratamiento son capaces de modificar la respuesta a linfocitos T o la respuesta tanto a linfocitos B como T del individuo implicado. Como se usa en este documento, la modificación de la respuesta alérgica del individuo que padece hipersensibilidad a Cyn d 1 puede definirse como inducir no respuesta o disminución en los síntomas ante la molécula de Cyn d 1 según se determina por procedimientos clínicos convencionales (Varney *et. al.*, British Medical Journal, 302:265-269, 1990). La disminución en los síntomas incluye cualquier reducción de una respuesta alérgica en un individuo ante Cyn d 1 después de que se haya completado un régimen de tratamiento. Esta disminución puede determinarse de forma subjetiva o clínica, por ejemplo usando ensayos de piel convencionales conocidos en la técnica.

(ii)

La exposición de un individuo a los péptidos de la presente invención, comprendiendo dichos péptidos al menos un epítipo de linfocitos T, puede hacer tolerantes o anergizar subpoblaciones de linfocitos T apropiadas de modo que se vuelvan insensibles a Cyn d 1 y no participen en la estimulación de una respuesta inmune tras dicha exposición. Preferiblemente los péptidos de acuerdo con la invención conservarán epítopos de linfocitos T inmunodominantes pero poseen unión a IgE anulada.

La administración de un péptido de la invención puede modificar el perfil de secreción de citocinas en comparación con exposición a alérgeno Cyn d 1 de origen natural. Esta exposición también puede influir en las subpoblaciones de linfocitos T que normalmente participan en la respuesta alérgica para migrar lejos del sitio o sitios de exposición normal al alérgeno y hacia el sitio o sitios de administración terapéutica. Esta redistribución de subpoblaciones de linfocitos T puede aliviar o reducir la capacidad del sistema inmune de un individuo para estimular la respuesta inmune habitual en el sitio de exposición normal al alérgeno, dando como resultado la disminución de los síntomas alérgicos. La modificación de la respuesta de linfocitos B puede conseguirse, por ejemplo, mediante modulación del perfil de citocinas producido por linfocitos T, como se ha detallado anteriormente. Específicamente, reducir la producción de IL-4 e IL-13 derivado de linfocitos T reduciendo de este modo la síntesis de IgE.

(iii) Los péptidos de la presente invención pueden usarse en la capacidad de un adsorbente para retirar linfocitos T dirigidos a Cyn d 1 de una muestra biológica o de un paciente.

En consecuencia, en otro aspecto la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o profilaxis de una afección en un sujeto, caracterizándose dicha afección por la respuesta inmune aberrante, no deseada o de otro modo inapropiada a Cyn d 1, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un péptido como se ha definido anteriormente en este documento para un tiempo y en condiciones suficientes para retirar o reducir la presencia o función de dicho sujeto de linfocitos T dirigidos a dicho Cyn d 1.

Preferiblemente dicha afección es hipersensibilidad a polen de pasto Bermuda.

Una "cantidad eficaz" significa una cantidad necesaria al menos parcialmente para conseguir la respuesta inmune deseada o retardar la aparición o inhibir la progresión o detener completamente, la aparición o progresión de una afección particular que se trata. La cantidad varía dependiendo de la condición de salud y física del individuo a tratar, el grupo taxonómico del individuo a tratar, el grado de protección deseado, la formulación de la composición, la evaluación de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad quede en un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse a través de ensayos rutinarios.

El sujeto del tratamiento o profilaxis generalmente es un mamífero tal como pero sin limitación un ser humano, primate, animal de granja (por ejemplo, oveja, vaca, caballo, asno, cerdo), animal de compañía (por ejemplo perro, gato), animal de ensayo de laboratorio (por ejemplo ratón, conejo, rata, cobaya, hámster), animal salvaje capturado (por ejemplo zorro, ciervo). Preferiblemente el mamífero es un ser humano o primate. Más preferiblemente el mamífero es un ser humano.

La referencia en este documento a "tratamiento" y "profilaxis" debe considerarse en su contexto más amplio. El término "tratamiento" no implica necesariamente que se trate a un sujeto hasta la recuperación total. De forma similar, "profilaxis" no significa necesariamente que el sujeto no contraiga con el tiempo una enfermedad. En consecuencia, el tratamiento y profilaxis incluyen alivio de los síntomas de una afección particular o prevención o reducción de otro modo del riesgo de desarrollar una afección particular. El término "profilaxis" debe considerarse como reducir la gravedad o aparición de una afección particular. "Tratamiento" también puede reducir la gravedad de una afección existente.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a anticuerpos para Cyn d 1 incluyendo anticuerpos catalíticos o derivados, homólogos, análogos, mutantes, equivalentes químicos o miméticos de dichos anticuerpos. Tales anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden seleccionarse de anticuerpos de origen natural para Cyn d 1 o pueden inducirse específicamente para Cyn d 1. El caso de los últimos, Cyn d 1 puede asociarse primero

con una molécula vehículo. Los anticuerpos y/o Cyn d 1 recombinantes de la presente invención son particularmente útiles como agentes terapéuticos o de diagnóstico. Como alternativa, pueden usarse fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab o fragmentos Fab₂. Además, la presente invención se extiende a anticuerpos recombinantes y sintéticos y a híbridos de anticuerpos. Un "anticuerpo sintético" se considera en este documento que incluye fragmentos e híbridos de anticuerpos. Cyn d 1 también puede usarse para explorar con respecto a anticuerpos de origen natural para Cyn d 1.

Los anticuerpos tanto policlonales como monoclonales pueden obtenerse por inmunización con Cyn d 1 o derivado, homólogo, análogo, mutante, equivalente químico o mimético del mismo y ambos tipos son utilizables para inmunoensayos. Los métodos para obtener ambos tipos de sueros se conocen bien en la técnica. Los sueros policlonales se prefieren menos pero se preparan de forma relativamente fácil por inyección a un animal de laboratorio adecuado de una cantidad eficaz de Cyn d 1 o partes antigénicas del mismo, recoger suero del animal y aislar sueros específicos por cualquiera de las técnicas inmunoabsorbentes conocidas. Aunque los anticuerpos producidos por este método pueden utilizarse en prácticamente cualquier tipo de inmunoensayo, generalmente se utilizan menos debido a la heterogeneidad potencial del producto.

El uso de anticuerpos monoclonales en un inmunoensayo se prefiere particularmente debido a la capacidad para producirlos en grandes cantidades y la homogeneidad del producto. La preparación de líneas celulares de hibridoma para producción de anticuerpo monoclonal derivado por fusión de una línea celular inmortal y linfocitos sensibilizados frente a la preparación inmunogénica puede realizarse por técnicas que se conocen bien para los expertos en la materia. (Véase, por ejemplo Douillard y Hoffman, Basic Facts about Hybridomas, en Compendium of Immunology Vol II, ed. por Schwartz, 1981; Kohler y Milstein, Nature 256: 495-499, 1975; European Journal of Immunology 6: 511-519, 1976).

Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención específicamente se une a Cyn d 1 o derivado, homólogo, análogo, mutante, equivalente químico o mimético del mismo. Por "se une específicamente" se entiende unión de alta afinidad y/o alta avidéz de un anticuerpo con un antígeno específico. La unión de anticuerpo a su epítipo en este antígeno específico es más fuerte que la unión del mismo anticuerpo a cualquier otro epítipo, particularmente los que pueden estar presentes en moléculas en asociación con, o en la misma muestra que, el antígeno específico de interés. Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de interés pueden ser capaces de unirse a otros polipéptidos a un nivel débil, pero detectable, (por ejemplo, 10 % o menos de la unión mostrada para el polipéptido de interés). Dicha unión débil, o unión de fondo, se puede diferenciar fácilmente de la unión de anticuerpo específica para el polipéptido de interés, por ejemplo mediante el uso de controles apropiados.

La administración de un péptido o anticuerpo de la presente invención (denominado en este documento "agente") en forma de una composición farmacéutica, puede realizarse por cualquier medio conveniente. Se contempla que el agente de la composición farmacéutica muestra actividad terapéutica cuando se administra en una cantidad que depende del caso particular. La variación depende, por ejemplo, del ser humano o animal y el agente seleccionados. Puede aplicarse una amplia serie de dosis. Considerando a un paciente, por ejemplo, puede administrarse de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 mg de un agente por kilogramo de peso corporal por día. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas diariamente, semanalmente, mensualmente u otros intervalos de tiempo adecuados o puede reducirse proporcionalmente la dosis según se indica por las exigencias de la situación.

El agente puede administrarse de una manera conveniente tal como por las vías oral, intravenosa (cuando sea soluble en agua), intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intranasal, sublingual o supositoria o implantarse (por ejemplo, usando moléculas de liberación lenta). El agente puede administrarse en forma de sales farmacéuticamente aceptables no tóxicas tales como sales de adición de ácidos o complejos metálicos, por ejemplo con zinc, hierro o similares (que se consideran como sales para los fines de la presente solicitud). Son ilustrativas de dichas sales de adición de ácidos clorhidrato, bromhidrato, sulfato, fosfato, maleato, acetato, citrato, benzoato, succinato, malato, ascorbato, tartrato y similares. Si el principio activo debe administrarse en forma de comprimido, el comprimido puede contener un aglutinante tal como goma de tragacanto, almidón de maíz o gelatina; un agente disgregante, tal como ácido algínico; y un lubricante, tal como estearato de magnesio.

De acuerdo con estos métodos, el agente definido de acuerdo con la presente invención puede co-administrarse con uno o más compuestos o moléculas distintos. Por "co-administrarse" se entiende administración simultánea en la misma formulación o en dos formulaciones diferentes mediante la misma o diferentes vías o administración secuencial por la misma o diferentes vías. Por administración "secuencial" se entiende una diferencia temporal de segundos, minutos, horas o días entre la administración de los dos tipos de moléculas. Estas moléculas pueden administrarse en cualquier orden.

Otro aspecto de la presente invención contempla el uso de un agente como se ha definido anteriormente en este documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección en un mamífero, caracterizándose dicha afección por una respuesta inmune aberrante, no deseada o de otro modo inapropiada a Cyn d 1.

Preferiblemente dicha afección es hipersensibilidad a polen de pasto Bermuda.

En otro aspecto adicional más, la presente invención contempla una composición farmacéutica que comprende un agente como se ha definido anteriormente en este documento y uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Dichos agentes se denominan los principios activos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles o pueden estar en forma de una crema u otra forma adecuada para aplicación tópica. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. Las prevenciones de la acción de microorganismos pueden proporcionarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede proporcionarse por el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes listados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtrado. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado por vacío y la técnica de liofilizado que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de la solución esterilizada por filtración previamente del mismo.

Cuando los principios activos están protegidos de forma adecuada pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable o puede incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda o pueden comprimirse en comprimidos o puede incorporarse directamente con el alimento de la dieta. Para administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deberían contener al menos 1 % en peso de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 80 % del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Las composiciones o preparaciones preferidas de acuerdo con la presente invención se preparan de modo que una forma de unitaria de dosificación oral contiene entre aproximadamente 0,1 µg y 2000 mg de compuestos activos.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener los componentes como se enumeran posteriormente en este documento: un aglutinante tal como goma, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y puede añadirse un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente saporífero tal como un saporífero de menta, aceite de Gaultheria o cereza. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Otros diversos materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y saporífero de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debería ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto o compuestos activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de liberación prolongada. La composición farmacéutica también puede comprender moléculas genéticas tales como un vector capaz de transfectar células diana en las que el vector porta una molécula de ácido nucleico que codifica un agente modulador. El vector puede, por ejemplo, ser un vector viral.

Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a agentes, como se han definido anteriormente en este documento, cuando se usan en el método de la presente invención.

En otro aspecto adicional, debería entenderse que la presente invención se extiende al uso de los péptidos de la presente invención en aplicaciones de diagnóstico. Dichas aplicaciones de diagnóstico incluyen, pero sin limitación:

(i) medir la reactividad de las células de un sujeto a Cyn d 1. Esto es útil, por ejemplo, con respecto al diagnóstico y/o control de las afecciones caracterizadas por una respuesta inmune aberrante, no deseada o

de otro modo inapropiada a Cyn d 1. Los péptidos pueden añadirse en una solución o unirse a un soporte sólido junto con células derivadas de sangre periférica o de biopsias tisulares no fraccionadas, fraccionadas o derivadas como una línea celular continua. La reactividad al péptido sujeto puede medirse después por ensayos de proliferación convencionales tales como incorporación de H³-timidina, medición de moléculas expresadas o secretadas tales como marcadores de superficie, citocinas u otros ensayos convencionales de actividad celular que se conocen bien en la técnica.

(ii) el uso de péptidos que comprenden epítomos de linfocitos T junto con un ensayo de proliferación de linfocitos T que utiliza una muestra de linfocitos T derivada del sujeto facilitará, por ejemplo, la identificación de una población sensible a linfocitos T.

Pueden utilizarse métodos de detección de Cyn d 1, por ejemplo, para detectar cualitativa o cuantitativamente niveles de Cyn d 1. Sin embargo, estos métodos también pueden utilizarse para explorar con respecto a mutaciones o polimorfismos de Cyn d 1 dando como resultado dichas mutaciones, por ejemplo, la pérdida de reactividad de los linfocitos T a Cyn d 1. Estos métodos pueden utilizarse con el fin de explorar con respecto a moléculas peptídicas adecuadas para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de un individuo que padece hipersensibilidad relacionada con Cyn d 1.

En consecuencia, otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para diagnosticar o controlar una afección en un mamífero, caracterizándose dicha afección por una respuesta aberrante, no deseada o inapropiada a Cyn d 1, comprendiendo dicho método la exploración con respecto a linfocitos T reactivos a Cyn d 1 utilizando los péptidos definidos anteriormente en este documento.

Preferiblemente dicha afección es hipersensibilidad a polen de pasto Bermuda.

En otra realización la presente invención proporciona kits de diagnóstico para su uso en la metodología de diagnóstico definida anteriormente en este documento.

La presente invención se describirá adicionalmente a continuación con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

ANÁLISIS OLIGOCLONAL DE LA RESPUESTA DE LINFOCITOS T ATÓPICA AL ALÉRGENO DE GRUPO 1 DE CYNODON DACTYLON. MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y protocolo de inmunoterapia

Se estudiaron catorce pacientes (8 F y 6 M de edad media 33,4 años) de la clínica de asma y alergia, Hospital Alfred, Melbourne, Australia (Tabla 3). Todos los pacientes padecían rinitis de temporada grave y/o asma con síntomas que se extendían hasta verano avanzado correspondientes al máximo de la temporada de BPG. IgE específica para polen de pasto Bermuda estaba presente en todos los sujetos según se determinó por ensayos de puntura positivos para extracto de polen de pasto Bermuda (diámetros de grano ≥ 5 mm) así como ensayo alergoabsorbente de enzimas positivo (EAST, Kallestad Allercoat Sanofi-Pasteur Diagnostics; Tabla 3).

Se administró a los pacientes inmunoterapia de alérgeno subcutánea con dos inyecciones semanales en una preparación de liberación prolongada precipitada con alumbre que contenía 50 % de polen de pasto Bermuda + 50 % de mezcla de 7 pastos (Allpyral^R específicamente preparada y proporcionada generosamente por Bayer Australia Ltd.) durante veinte semanas fuera de la temporada de polen, de acuerdo con el régimen convencional del Hospital Alfred (dosis de antígeno acumulativa 15.570 PNU por año). Se obtuvo sangre periférica heparinizada de todos los pacientes durante la temporada de polen antes del inicio de la desensibilización (n = 14), siguiendo un año de tratamiento (n = 14) y después de dos años de tratamiento (n = 7). Los cambios en sintomatología clínica se documentaron usando puntuaciones análogas visuales completadas por los pacientes (100 % equivale a síntomas más graves y 0 % equivale a sin síntomas; Figura 1) y por cambio indicado por los pacientes en el uso de la medicación. Se obtuvo aprobación del Comité de ética del Hospital Alfred con consentimiento informado escrito de cada paciente. Los contenidos de polen diario se proporcionaron amablemente por la Escuela de Botánica, Universidad de Melbourne.

Tipificación de CMH de clase II

Se realizó la tipificación de alelos HLA-DRB1, DQB1 y DPB1 usando los métodos convencionales descritos en 11th International Histocompatibility Workshop (Kimura, A. Sasazula, T., Oxford University Press, 1991). Brevemente, se determinaron dos polimorfismos de exones usando una serie de sondas oligonucleotídicas biotiniladas que se hibridaron con ADN amplificado por PCR inmovilizado en membranas de nylon. Se detectaron sondas complementarias usando un conjugado de fosfatasa alcalina-estreptavidina y el sustrato quimioluminiscente CDP-Star (Roche Diagnostics Pty Ltd). La hibridación de DPB1 se precedió por una estimulación específica de secuencia

(SSP) para dividir los alelos de DPB1 en seis grupos basándose en polimorfismo en las posiciones de aminoácidos 8-9 y 84-85 (Varney, M.D., Tait, B.D., Eur. J. Immunogenetics, 25:371-374, 1998). Para cada locus se añadieron nuevas sondas y cebadores para cubrir el polimorfismo de secuencia no descrito en el protocolo original.

5 Antígenos

(i) Polen de pasto Bermuda.

10 El pasto Bermuda se obtuvo de Greer Laboratories Inc. (Lenoir, N.C., Estados Unidos) como polen seco, no desgrasado. Se extrajo un gramo de polen en 5 ml de NH_4HCO_3 1 mM durante una noche a 4 °C en una rueda rotatoria. Después de la centrifugación, el sobrenadante se dializó frente a PBS durante una noche. El extracto se filtró a través de un filtro de 0,2 μm . El contenido de proteína del extracto se determinó usando el microensayo Bio-Rad (Bio-Rad, Estados Unidos).

15 (ii) Cyn d 1.

Se generó Cyn d 1 por el extracto de polen de pasto Bermuda sometiéndolo primero a una precipitación con sulfato de amonio 80 %. El sobrenadante de la precipitación se pasó después a través de una columna de gel de Sephadex G-75 (Pharmacia, Suecia). Las fracciones que contenían Cyn d 1 se agruparon después del análisis en SDS-PAGE e inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal específico de Cyn d 1 (3A2) (Smith *et al.*, 1994). El contenido de proteína se determinó usando el microensayo Bio-Rad.

(iii) Péptidos.

25 Se obtuvieron péptidos sintéticos (20-mers solapantes por 11 o, para los dos péptidos N-terminal, 15 restos) que abarcaban la longitud completa de la molécula Cyn d 1 de Mimotopes (Clayton, Australia; Figura 2) (isoforma CD1, Smith *et al.*, 1996, mencionado anteriormente).

(iv) Mitogenicidad y Toxicidad.

30 La mitogenicidad del polen de pasto Bermuda, Cyn d 1 y péptidos de Cyn d 1 se excluyó cultivando con linfocitos T CD4^+ reactivos a ácaros del polvo oligoclonales en presencia de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se excluyó la toxicidad por co-cultivo de antígenos con las células T reactivas a HDM en presencia de IL-2 (datos no mostrados).

35

Generación de líneas de linfocitos T específicos para polen de pasto Bermuda

Se aislaron líneas de linfocitos T específicas para polen de pasto Bermuda con el uso de los métodos de los inventores bien establecidos para la generación de poblaciones de linfocitos T específicas de alérgenos (O'Hehir, RE, Young, D.B., Kay, A.B., Lamb, J.R, Immunology, 62:635-640, 1987; O'Hehir, R.E., Askonas, B.A., Lamb, J.R, Vol 3, Heidelberg: Springer-Verlag, páginas 42-138, 1993). Brevemente, se separaron PBMC de sangre venosa heparinizada por centrifugación en un gradiente de densidad sobre Ficoll Paque (Pharmacia, Suecia). Las PBMC se estimularon inicialmente durante una semana en placas de 24 pocillos (Costar, Estados Unidos; $2,5 \times 10^6$ PBMC/pocillo) con una concentración óptima determinada previamente de extracto de polen de pasto Bermuda (50 $\mu\text{g/ml}$) durante 7 días en medio completo (medio RPMI-1640 Gibco Life Technologies, complementado con L-glutamina 2 mmol/l, penicilina/estreptomicina 100 UI/ml y suero AB^+ humano inactivado por calor explorado al 5 %, Sigma Chemical Company, Estados Unidos) a 37 °C, CO_2 al 5 %. Se estableció una línea de dos semanas reestimulando los blastos de linfocitos T con extracto de polen de pasto Bermuda en presencia de PBMC autólogas irradiadas (3000 rad) cada 7 días, con la adición de interleucina-2 (5 % vol/vol; Lymphocult-TLF, Biotest Folex, Frankfurt, Alemania) cada 3-4 días. En todos los experimentos se dejó reposar a los linfocitos T durante 7 días después de la última adición de antígeno y las células presentadoras de antígeno (APC) antes de su uso en ensayos de proliferación. Los inventores han mostrado previamente que los linfocitos T CD4^+ se expanden preferentemente en estos cultivos.

55 Ensayos de proliferación de linfocitos T oligoclonales

Se estimularon blastos de linfocitos T oligoclonales (5×10^4 /pocillo) de las líneas de linfocitos T específicas de polen de pasto Bermuda por triplicado con extracto de polen de pasto Bermuda (25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$), Cyn d 1 purificado (2,5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$) y los péptidos de Cyn d 1 (1,10 $\mu\text{g/ml}$) en presencia de un número igual de PBMC autólogas irradiadas como APC durante 72 horas en placas de fondo redondo de 96 pocillos (ICN Biomedicals, Estados Unidos). Se incluyeron cultivos de linfocitos T y APC en ausencia de antígeno o con IL-2 añadida como controles negativo y positivo respectivamente. Después de 72 horas, se sometió a pulsos a los cultivos con 1 μCi /pocillo de metil timidina tritiada ($^3\text{HTdR}$; Amersham, Estados Unidos) y se recogieron 16 horas después en filtros de fibra de vidrio. Se midió la proliferación correlacionada con incorporación de $^3\text{HTdR}$ por espectroscopía de centelleo líquida. Los resultados se expresan como cambio en cuentas medias por minuto por encima del fondo (Δcpm) o como un

65

índice de estimulación (SI, cpm de linfocitos T estimulados por antígeno dividido entre cpm de linfocitos T no estimulados) para permitir una comparación más fácil entre sujetos con diferente incorporación de fondo. Los valores de índice de estimulación $\geq 2,5$ se consideran significativos.

5 Producción de IL-5 e IFN- γ por linfocitos T oligoclonales específicos de polen de pasto Bermuda

La producción de IL-5 e IFN- γ por linfocitos T oligoclonales cultivados se evaluó recogiendo sobrenadantes de ensayos de proliferación a las 48 horas después de la estimulación, con reemplazo por un volumen igual de medio completo y medición de niveles de citocinas por ELISA de tipo sándwich. Se recubrieron placas de ELISA Maxisorp de 96 pocillos blancas (Nalgene NUNC, Dinamarca) con IL-5 anti ratón/humano de rata (PharMingen, Estados Unidos) o IFN- γ antihumano de ratón (Endogen, Estados Unidos) a 2 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron con PBS/Tween 20 al 0,5 % y se bloquearon con PBS/BSA al 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo y los sobrenadantes del cultivo de ensayos agrupados por triplicado se añadieron por duplicado a los pocillos. Se estableció una curva patrón usando concentraciones conocidas de IL-5 (PharMingen, Estados Unidos) e IFN- γ (Endogen, Estados Unidos) recombinantes humanos. Las placas se incubaron con IL-5 antihumana de rata biotinilada 1 $\mu\text{g/ml}$ (PharMingen, Estados Unidos) o IFN- γ antihumano de ratón biotinilado 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Endogen, Estados Unidos) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas, se añadió peroxidasa de rábano rusticano biotinilada con estreptavidina (Amersham, Estados Unidos) a una dilución de 1:2000, a cada pocillo y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo y se añadieron 100 μl del reactivo de quimioluminiscencia ECL (NEN Life Science Products, Estados Unidos), compuesto mezclando una parte de reactivo luminol potenciado con una parte de reactivo oxidante, a cada pocillo. Las placas se leyeron en un luminómetro de brillo de microplacas LumiCount (Packard Instrument Company, Estados Unidos). Se realizó una construcción de curva patrón y determinación de niveles de citocina usando software Packard-Smart. El límite inferior de detección de los ensayos de IL-5 e IFN- γ fue de 10 pg/ml.

Estadística

La significación estadística de las diferencias entre los resultados obtenidos en diversos puntos temporales de SIT se analizó por un ensayo de Wilcoxon Signed Rank. Los ensayos con p valores menores de 0,05 se consideran significativos.

Ejemplo 2

35 EFICACIA CLÍNICA DE LA INMUNOTERAPIA

Los catorce pacientes demostraron una mejora notable en sus síntomas según se evaluó por las puntuaciones de análogo visual indicadas por los pacientes durante la temporada del polen (Figura 1). Esto se acompañó por un uso de la medicación reducido en todos los pacientes. A pesar de la eficacia clínica, según se anticipa a partir de estudios publicados (Lichtenstein, L.M., Ishizaka, K., Norman, P.S., Sobotka, A.K., Hill, B.M., J. Clin Invest., 52:472-482m 1973; Gleich, G.J., Zimmerman, E.M., Henderson L.L. y Yunginger, J.W., J. Allergy Clin. Immunol., 70:261-271, 1982; Creticos, P.S., Van Metre T.E., Mardiney, M.R, J. Allergy Clin Immunol., 73:94-104, 1984; Djurup, R, Malling, H., Sondergaard, I., Weeke, B., J. Allergy. Clin. Immunol., 76:46-55, 1985), las mediciones de IgE específicas de polen de pasto Bermuda no mostraron cambios consistentes durante el tiempo del estudio (Tabla 2). Las cuentas de polen de temporada diarias fueron comparables durante las tres temporadas.

Ejemplo 3

50 RESPUESTAS DE LINFOCITOS T OLIGOCLONALES A ALÉRGENOS DE POLEN DE PASTO BERMUDA

Las líneas de linfocitos T específicas de polen de pasto Bermuda de 2 semanas a partir de los 14 pacientes alérgicos a polen de pasto Bermuda mostraron respuestas de linfocitos T proliferativas fuertes a la pre-inmunoterapia con extracto de polen de pasto Bermuda en bruto respondiendo 13/14 pacientes también a Cyn d 1. Un ensayo de proliferación representativo expresado como Δcpm para un paciente se muestra en detalle en la Figura 3A. Después de SIT, hubo una reducción notable en las respuestas proliferativas a polen de pasto Bermuda y Cyn d 1. La proliferación ante polen de pasto Bermuda después de un año de SIT se redujo en 12/14 pacientes (Figura 4A, B). El paciente 5 mostró una ligera reducción en la proliferación después de un año de SIT pero resulta interesante que la reactividad de linfocitos T a polen de pasto Bermuda aumentó después de dos años. El paciente 11 mostró un aumento similar en el reconocimiento de linfocitos T de polen de pasto Bermuda en un año. Se observó una reducción en la proliferación ante Cyn d 1 en 11/13 pacientes reactivos a Cyn d 1 después de un año de SIT (Figura 4 C, D). Después de dos años de SIT, sólo se observó una proliferación de linfocitos T específica de antígeno mínima. Esto no se debió a la inducción de citolisis, puesto que en los tres puntos temporales se observó fuerte proliferación ante IL-2 (Figura 3A).

Ejemplo 4**MAPEO DE EPÍTOPOS DE CYN d 1**

- 5 Para identificar las regiones altamente inmunogénicas de Cyn d 1, se examinaron respuestas proliferativas de linfocitos T oligoclonales a los péptidos de Cyn d 1 sintéticos antes de la inmunoterapia. La reactividad de los linfocitos T a uno o más péptidos de Cyn d 1 se identificó en los 13 pacientes reactivos a Cyn 1 d, pero el patrón de reconocimiento de linfocitos T varió entre individuos. No existió reconocimiento de péptidos por el paciente no reactivo a Cyn d 1. Cuatro péptidos [Cyn d 1(1,0-29), (46-65), (55-74) y (199-218)] no indujeron proliferación en ningún sujeto. Se detectaron regiones de alta inmunogenicidad en las que cinco péptidos indujeron proliferación en 6 o más pacientes; los péptidos Cyn d 1(109-128) y (217-236) indujeron cada uno respuestas en 8 pacientes y los péptidos Cyn d 1 (181-200), (190-209) y (222-241) indujeron cada uno respuestas de linfocitos T en 6 pacientes (Figura 5A).
- 10
- 15 Las frecuencias de los alelos HLA DRB1, DQB1 y DPB1 en 13/14 pacientes se compararon con las observadas en una población de control sana y para asociaciones con una respuesta a una o más secuencias peptídicas particulares. No se observaron asociaciones de HLA inequívocas.

20 Como se observó con extracto de polen de pasto Bermuda no fraccionado y Cyn d 1, después de SIT, el reconocimiento de los péptidos de Cyn d 1 se redujo notablemente (Figura 5), con una expansión determinante insignificante. Para los 7 pacientes que tuvieron 2 años de SIT, sólo 2 péptidos indujeron una respuesta proliferativa, cada uno en dos pacientes (Figura 5 C).

Ejemplo 5**PERFIL DE CITOCINAS DE LINFOCITOS T REACTIVOS**

25 Se secretaron IL-5 e IFN- γ por las líneas de linfocitos T específicas de polen de pasto Bermuda en respuesta a estimulación con polen de pasto Bermuda, Cyn d 1 y péptidos de Cyn d 1 seleccionados que provocaron proliferación de linfocitos T (por ejemplo Figura 3). Se produjeron altos niveles de ambas citocinas antes de SIT, pero después de SIT hubo una reducción notable en la producción de IL-5 en 13/14 pacientes después de uno o dos ciclos de SIT (Figura 3B y datos no mostrados). Los niveles de IFN- γ también se redujeron después de SIT en 10/14 pacientes, sin embargo, en un menor grado en comparación con IL-5 (Figura 3 C y datos no mostrados). La secreción de IFN- γ se potenció en 4 pacientes (8, 9, 11, 13), cada uno de los cuales sólo se había sometido a un ciclo de SIT cuando se estudió. El paciente 13 mostró secreción de IL-5 aumentada después de 1 año de SIT pero la secreción de IFN- γ se potenció en un mayor grado (Figura 6B, D). Después de dos años de SIT hubo una secreción insignificante de cualquiera de las citocinas por cualquier paciente, coherente con el bajo nivel de proliferación de linfocitos T observado en este punto temporal.

40 Hubo un desplazamiento notable en la relación de IL-5:IFN- γ durante SIT. Usando una relación arbitraria de 1 como un punto de comparación, 11/14 pacientes mostraron un desplazamiento en la relación IL-5:IFN- γ de ≤ 1 en 1 año después de SIT para linfocitos T estimulados con tanto polen de pasto Bermuda como Cyn d 1 (Figura 6). A pesar de la respuesta proliferativa de linfocitos T aumentada observada después de estimulación con polen de pasto Bermuda después de SIT en los pacientes 5 y 11, la relación IL-5:IFN- γ se redujo en ambos de estos pacientes y los síntomas clínicos también se redujeron. Después de dos años de SIT, la relación se mantuvo constante a un nivel bajo o continuó reduciéndose.

50 El perfil de la relación EL-5:IFN- γ inducido por estimulación de péptidos reflejó la proliferación de linfocitos T (datos no mostrados). Después de un año de SIT, sólo siete péptidos indujeron una relación de ≥ 1 en al menos un paciente y después de dos años de SIT, esta prácticamente se anuló incluyendo solamente un péptido una relación de > 1 en dos pacientes.

TABLA 3: Características clínicas de los pacientes alérgicos a polen de pasto Bermuda e IgE específico de polen de pasto Bermuda antes y después de uno y dos (pacientes 1-7) ciclos de SIT

Paciente	Sexo	Edad	Rinitis de temporada	Asma	Reactividad de ensayo cutáneo de polen de pasto Bermuda			Puntuación de EAST de polen de pasto Bermuda (AEU/ml)		
					Pre-SIT	Después de 1 ciclo de SIT	Después de 2 ciclos de SIT	Pre-SIT	Después de 1 ciclo de SIT	Después de 2 ciclos de SIT
1	M	22	+++	++	12	10	7	NR	3 (5,33)	3 (14,54)
2	F	47	+++	+	10	8	8	2 (1,86)	3 (10,84)	NR
3	F	33	+++	+	11	11	11	NR	3 (16,08)	3 (16,55)
4	F	36	+++	-	7	4	3	3 (6,44)	3 (5,72)	NR
5	F	24	+++	++	6	5	8	3 (4,84)	3 (11,83)	NR
6	F	45	+++	-	14	11	11	1 (0,45)	2(0,87)	3 (7,12)
7	F	30	+++	+	NR	NR	8	2 (1,64)	NR	2 (2,40)
8	F	22	+++	++	7	6		2 (2,70)	3 (3,823)	
9	M	22	+++	+	11	5		3 (7,03)	3 (11,05)	
10	M	27	+++	-	NR	13		3 (11,82)	3 (13,68)	
11	M	30	+++	++	5	11		3 (5,15)	4 (> 17,5)	
12	F	47	+++	-	7	7		3 (5,29)	3 (9,28)	
13	M	27	+++	++	10	15		3 (7,06)	NR	
14	M	55	+++	-	10	5		0 (< 0,18)	2 (0,78)	

NR = No realizado

5 **Bibliografía**

- Amann *et al.*, 1988, Gene., 69:301-315
- Balderi *et al.*, 1987, Embo J., 6:229-234
- 10 Blaher B, McCluskey J, Puy R, Czarny D, Rolland JM., Immunol Cell Biol., 1995; 73:17-22
- Chang *et al.*, 1999, Clin Exp Allergy., 29:488-496
- 15 Creticos PS, Van Metre TE, Mardiney MR, J Allergy Clin Immunol., 73:94-104 (1984)
- Djurup R, Malling H, Sondergaard I, Weeke B., J Allergy Clin Immunol., 76:46-55 (1985)
- 20 Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W, Till SJ, Hamid QA., N Engl J Med, 1999; 341:468-475
- Ford SA, Baldo BA., J Allergy Clin Immunol., 1987; 79:711-720
- 25 Gleich GJ, Zimmerman EM, Henderson LL, Yunginger JW., J Allergy Clin Immunol., 70:261-271 (1982)
- Jameel *et al.*, 1990, J Virol., 64:3963-3966
- 30 Kimura A, Sasazuki T., Eleventh International Histocompatibility workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki, editors. HLA 1991, Proceedings of the 11th International Histocompatibility Workshop and Conference. vol 1. Oxford University Press. 1992

Knapp *et al.*, 1990, *Bio Techniques.*, 8:280-281

5 Kurjan y Herskowitz., 1982, *Cell.*, 30:933-943

Lichtenstein LM, Ishizaka K, Norman PS, Sobotka AK, Hill BM., *J Clin Invest.*, 52:472-482 (1973)

Li Y, Simons ER, Jay FT, HayGlass KT., *Int Immunol.*, 1996; 8:897-904

10 Marsh DG, Haddad ZH, Campbell DM., *J Allergy.*, 1970; 46:107-121

Martin BG, Mansfield LE, Nelson HS., *Ann Allergy.*, 1985; 54:99-104

15 Matthiesen F, Schumacher MJ, Løwenstein H., *J Allergy Clin Immunol.*, 1989; 83:1124-1134

O'Hehir RE, Young DB, Kay AB, Lamb JR, *Immunology.*, 62:635-640 (1987)

O'Hehir RE, Askonas BA, Lamb JR., *Cell culture: lymphocyte clones.* In: Albert WHW, Staines NA, editores. *Methods of immunological analysis.* Vol 3. Heidelberg: Springer-Verlag; 1993. p 120-138

20 Orren A, Dowdle EB., *S Afr Med J.*, 1977;51:586-591

Rolland J, O'Hehir R., *Curr Opin Immunol.*, 1998;10:640-645

25 Sambruck *et al.*, 1989, "Molecular Cloning: a laboratory manual, segunda edición"; Cold Spring Harbour Laboratory Press; Cold Spring Harbour, Nueva York

Schultz *et al.*, 1987, *Gene.*, 54:113-123

30 Shen HD, Wang SR, Atang RB, Chang ZN, Han SH., *Clin Allergy.*, 1989; 18:401-409

Smith PM, Suphiogl C, Griffith U, Theriault K, Knox RB, Singh MB., *J Allergy Clin Immunol.*, 1996; 98:331-343

Suphioglu C, Singh MB, Knox RB., *Int Arch Allergy Immunol.*, 1993; 102:144-151

35 Varney *et al.*, 1990, *British Medical Journal.*, 302:265-269

Varney MD, Tait BD., *Eur. J. Immunogenetics.*, 25:371-374 (1998)

40 LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Monash University
- 45 <120> EPÍTOPOS NUEVOS Y USOS DE LOS MISMOS
- <130>2572570/TDO
- <150> PR7754/01
- 50 <151> 18-09-2001
- <160> 28
- <170> Patent In versión 3.1
- 55 <210>1
- <211> 246
- <212> PRT
- <213> humano
- 60 <400> 1

Asp Asp Val Ile Pro Ala Asn Trp Lys Pro Asp Thr Val Tyr Thr Ser
 225 230 235 240

Lys Leu Gln Phe Gly Ala
 245

5
 <210> 2
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 2

Ala Ile Gly Asp Lys Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asn
 1 5 10 15

10
 Lys Trp Leu Glu
 20

15
 <210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 3

Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asn Lys Trp Leu Glu Ala Lys Ala Thr Phe
 1 5 10 15

20
 Tyr Gly Ser Asn
 20

25
 <210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 4

Leu Glu Ala Lys Ala Thr Phe Tyr Gly Ser Asn Pro Arg Gly Ala Ala
 1 5 10 15

30
 Pro Asp Asp His
 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

<400> 5

Ser Asn Pro Arg Gly Ala Ala Pro Asp Asp His Gly Gly Ala Cys Gly
1 5 10 15

Tyr Lys Asp Val
20

5

<210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

10

<400> 6

Asp His Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe
1 5 10 15

Asp Gly Met Thr
20

15

<210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

20

<400> 7

Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Asp Gly Met Thr Ala Cys Gly Asn Glu
1 5 10 15

Pro Ile Phe Lys
20

25

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

30

<400> 8

Met Thr Ala Cys Gly Asn Glu Pro Ile Phe Lys Asp Gly Leu Gly Cys
1 5 10 15

Gly Ala Cys Tyr
20

<210> 9
 <211> 20

<212> PRT
<213> humano

<400> 9

5

Phe Lys Asp Gly Leu Gly Cys Gly Ala Cys Tyr Glu Ile Lys Cys Lys
1 5 10 15

Glu Pro Val Glu
20

<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> humano

10

<400> 10

Cys Tyr Glu Ile Lys Cys Lys Glu Pro Val Glu Cys Ser Gly Glu Pro
1 5 10 15

Val Leu Val Lys
20

15

<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> humano

20

<400> 11

Val Glu Cys Ser Gly Glu Pro Val Leu Val Lys Ile Thr Asp Lys Asn
1 5 10 15

Tyr Glu His Ile
20

25

<210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> humano

30

<400> 12

Val Lys Ile Thr Asp Lys Asn Tyr Glu His Ile Ala Ala Tyr His Phe
1 5 10 15

Asp Leu Ser Gly
20

Lys Ala Gly Glu Leu Thr Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr

1 5 10 15

Pro Ser Gly Thr

20

<210> 17
<211> 20
<212>PRT
<213> humano

5

<400> 17

Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Ser Gly Thr Lys Ile Thr Phe His

1 5 10 15

Ile Glu Lys Gly

20

<210> 18
<211> 20
<212>PRT
<213> humano

10

15

<400> 18

Gly Thr Lys Ile Thr Phe His Ile Glu Lys Gly Ser Asn Asp His Tyr

1 5 10 15

Leu Ala Leu Leu

20

<210> 19
<211> 20
<212> PRT
<213> humano

20

25

<400> 19

Met Lys Ser Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Pro Lys Lys Pro
 1 5 10 15

Leu Lys Gly Pro
 20

5
 <210>24
 <211> 20
 <212>PRT
 <213> humano

10
 <400> 24

Arg Ile Asp Pro Lys Lys Pro Leu Lys Gly Pro Phe Ser Ile Arg Leu
 1 5 10 15

Thr Ser Glu Gly
 20

15
 <210>25
 <211> 20
 <212>PRT
 <213> humano

<400> 25

Gly Pro Phe Ser Ile Arg Leu Thr Ser Glu Gly Gly Ala His Leu Val
 1 5 10 15

Gln Asp Asp Val
 20

25
 <210>26
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

<400> 26

Glu Gly Gly Ala His Leu Val Gln Asp Asp Val Ile Pro Ala Asn Trp
 1 5 10 15

Lys Pro Asp Thr
 20

30
 <210>27
 <211> 20

<212> PRT
<213> humano

<400> 27

5

Leu Val Gln Asp Asp Val Ile Pro Ala Asn Trp Lys Pro Asp Thr Val
1 5 10 15

Tyr Thr Ser Lys
20

<210> 28
<211> 20
<212> PRT
<213> humano

10

<400> 28

Val Ile Pro Ala Asn Trp Lys Pro Asp Thr Val Tyr Thr Ser Lys Leu
1 5 10 15

Gln Phe Gly Ala
20

15

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Monash University

20

<120> MOLÉCULAS INMUNOINTERACTIVAS Y USOS DE LAS MISMAS

<130>59.63.83969.rkg

25

<140> EP02766955.5
<141> 18 de septiembre 2002

<150> PR7754
<151> 18 de septiembre 2001

30

<160>28

<170> Patent In versión 3.1

35

<210>1
<211> 246
<212>PRT
<213> humano

40

<400> 1

Ala Ile Gly Asp Lys Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asn
 1 5 10 15

Lys Trp Leu Glu Ala Lys Ala Thr Phe Tyr Gly Ser Asn Pro Arg Gly
 20 25 30

Ala Ala Pro Asp Asp His Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp
 35 40 45

Lys Pro Pro Phe Asp Gly Met Thr Ala Cys Gly Asn Glu Pro Ile Phe
 50 55 60

Lys Asp Gly Leu Gly Cys Gly Ala Cys Tyr Glu Ile Lys Cys Lys Glu
 65 70 75 80

Pro Val Glu Cys Ser Gly Glu Pro Val Leu Val Lys Ile Thr Asp Lys
 85 90 95

Asn Tyr Glu His Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Lys Ala
 100 105 110

Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Gln Glu Asp Lys Leu Arg Lys Ala
 115 120 125

Gly Glu Leu Thr Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Ser

130 135 140

Gly Thr Lys Ile Thr Phe His Ile Glu Lys Gly Ser Asn Asp His Tyr
 145 150 155 160

Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Ala Ala Gly Asp Gly Asn Ile Val Ala
 165 170 175

Val Asp Ile Lys Pro Lys Asp Ser Asp Glu Phe Ile Pro Met Lys Ser
 180 185 190

Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Pro Lys Lys Pro Leu Lys Gly
 195 200 205

Pro Phe Ser Ile Arg Leu Thr Ser Glu Gly Gly Ala His Leu Val Gln
 210 215 220

Asp Asp Val Ile Pro Ala Asn Trp Lys Pro Asp Thr Val Tyr Thr Ser
 225 230 235 240

Lys Leu Gln Phe Gly Ala
 245

<210>2
 <211>20
 <212>PRT
 <213> humano

5

<400> 2

Ala Ile Gly Asp Lys Pro Gly Pro Asn Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asn
 1 5 10 15

Lys Trp Leu Glu
 20

5 <210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

10 <400> 3

Ile Thr Ala Thr Tyr Gly Asn Lys Trp Leu Glu Ala Lys Ala Thr Phe
 1 5 10 15

Tyr Gly Ser Asn
 20

15 <210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

<400> 4

Leu Glu Ala Lys Ala Thr Phe Tyr Gly Ser Asn Pro Arg Gly Ala Ala
 1 5 10 15

Pro Asp Asp His
 20

25 <210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

<400> 5

Ser Asn Pro Arg Gly Ala Ala Pro Asp Asp His Gly Gly Ala Cys Gly
 1 5 10 15

Tyr Lys Asp Val
 20

30 <210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

35 <400> 6

Asp His Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Lys Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe
 1 5 10 15

Asp Gly Met Thr
 20

40 <210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

<400> 7

Asp Val Asp Lys Pro Pro Phe Asp Gly Met Thr Ala Cys Gly Asn Glu
1 5 10 15

Pro Ile Phe Lys
20

5
<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> humano

10 <400> 8

Met Thr Ala Cys Gly Asn Glu Pro Ile Phe Lys Asp Gly Leu Gly Cys
1 5 10 15

Gly Ala Cys Tyr
20

15
<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> humano

20 <400> 9

Phe Lys Asp Gly Leu Gly Cys Gly Ala Cys Tyr Glu Ile Lys Cys Lys
1 5 10 15

Glu Pro Val Glu
20

25
<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> humano

<400> 10

Cys Tyr Glu Ile Lys Cys Lys Glu Pro Val Glu Cys Ser Gly Glu Pro
1 5 10 15

Val Leu Val Lys
20

30
<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> humano

35 <400> 11

Val Glu Cys Ser Gly Glu Pro Val Leu Val Lys Ile Thr Asp Lys Asn
1 5 10 15

Tyr Glu His Ile
20

40
<210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> humano

<400>12

Val Lys Ile Thr Asp Lys Asn Tyr Glu His Ile Ala Ala Tyr His Phe
1 5 10 15

Asp Leu Ser Gly
20

5

<210> 13
<211> 20
<212>PRT
<213> humano

10

<400>13

His Ile Ala Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Lys Ala Phe Gly Ala
1 5 10 15

Met Ala Lys Lys
20

15

<210> 14
<211> 20
<212> PRT
<213> humano

20

<400>14

Ser Gly Lys Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Gln Glu Asp Lys
1 5 10 15

Leu Arg Lys Ala
20

25

<210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> humano

<400>15

30

Lys Lys Gly Gln Glu Asp Lys Leu Arg Lys Ala Gly Glu Leu Thr Leu
1 5 10 15

Gln Phe Arg Arg
20

35

<210> 16
<211> 20
<212> PRT
<213> humano

<400> 16

Lys Ala Gly Glu Leu Thr Leu Gln Phe Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr
1 5 10 15

40

Pro Ser Gly Thr
20

<210> 17

<211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

5 <400> 17

Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr Pro Ser Gly Thr Lys Ile Thr Phe His
 1 5 10 15
 Ile Glu Lys Gly
 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

10

<400> 18

15

Gly Thr Lys Ile Thr Phe His Ile Glu Lys Gly Ser Asn Asp His Tyr
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Leu
 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

20

<400> 19

Lys Gly Ser Asn Asp His Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10 15
 Gly Asp Gly Asn
 20

25

<210> 20
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

30

<400> 20

Leu Leu Val Lys Tyr Ala Ala Gly Asp Gly Asn Ile Val Ala Val Asp
 1 5 10 15
 Ile Lys Pro Lys
 20

35

<210> 21
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano

40

<400> 21

Gly Asn Ile Val Ala Val Asp Ile Lys Pro Lys Asp Ser Asp Glu Phe
 1 5 10 15
 Ile Pro Met Lys
 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano
 5
 <400> 22
 Pro Lys Asp Ser Asp Glu Phe Ile Pro Met Lys Ser Ser Trp Gly Ala
 1 5 10 15
 Ile Trp Arg Ile
 20
 10
 <210> 23
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano
 15
 <400> 23
 Met Lys Ser Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Pro Lys Lys Pro
 1 5 10 15
 Leu Lys Gly Pro
 20
 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano
 25
 <400> 24
 Arg Ile Asp Pro Lys Lys Pro Leu Lys Gly Pro Phe Ser Ile Arg Leu
 1 5 10 15
 Thr Ser Glu Gly
 20
 30
 <210> 25
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 25
 Gly Pro Phe Ser Ile Arg Leu Thr Ser Glu Gly Gly Ala His Leu Val
 1 5 10 15
 Gln Asp Asp Val
 20
 35
 <210> 26
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> humano
 40
 <400> 26

ES 2 362 040 T3

Glu Gly Gly Ala His Leu Val Gln Asp Asp Val Ile Pro Ala Asn Trp
1 5 10 15

Lys Pro Asp Thr
20

5

<210> 27
<211> 20
<212> PRT
<213> humano
<400> 27

Leu Val Gln Asp Asp Val Ile Pro Ala Asn Trp Lys Pro Asp Thr Val
1 5 10 15

10

Tyr Thr Ser Lys
20

15

<210> 28
<211> 20
<212> PRT
<213> humano
<400> 28

Val Ile Pro Ala Asn Trp Lys Pro Asp Thr Val Tyr Thr Ser Lys Leu
1 5 10 15

20

Gln Phe Gly Ala
20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado de 5 a 100 restos de longitud que comprende un epítipo de linfocitos T de Cyn d 1, para su uso en el tratamiento de profilaxis de una afección en un sujeto que se caracteriza por una respuesta aberrante, no deseada o de otro modo inapropiada a Cyn d 1; en el que dicha molécula peptídica es capaz de interactuar con linfocitos T y modificar la función de linfocitos T cuando se incuba con células de sujetos que tienen dicha afección; en el que dicho péptido se administra en una cantidad suficiente para eliminar o reducir la presencia o función en el sujeto de linfocitos T y/o anticuerpos dirigidos a Cyn d 1; y en el que dicho péptido:
- 5 a) comprende al menos 5 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos derivada o seleccionada de:
- 15 (i) VKITDKNYEHIAAYHFDLSG (SEC ID N°: 12 como se muestra en la Figura 2);
(ii) HIAAYHFDLSGKAFGAMAKK (SEC ID N°: 13 como se muestra en la Figura 2);
(iii) SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA (SEC ID N°: 14 como se muestra en la Figura 2);
(iv) LLVKYAAGDGNIVAVDIKPK (SEC ID N°: 20 como se muestra en la Figura 2);
(v) GNIVAVDIKPKDSDEFIPMK (SEC ID N°: 21, como se muestra en la Figura 2);
(vi) PKDSDEFIPMKSSWGAIWRI (SEC ID N°: 22 como se muestra en la Figura 2);
(vii) MKSSWGAIWRIDPKKPLKGP (SEC ID N°: 23, como se muestra en la Figura 2);
(viii) EGGAHLVQDDVIPANWKPD (SEC ID N°: 26 como se muestra en la Figura 2); o
20 (ix) LVQDDVIPANWKPDVYTSK (SEC ID N°: 27, como se muestra en la Figura 2); o
- b) es un péptido de (a) que comprende una sustitución de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos derivada o seleccionada de (i) a (ix).
- 25 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicha secuencia de aminoácidos es de 5 a 20 restos en longitud.
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos es
- 30 (i) VKITDKNYEHIAAYHFDLSG (SEC ID N°: 12 como se muestra en la Figura 2);
(ii) HIAAYHFDLSGKAFGAMAKK (SEC ID N°: 13 como se muestra en la Figura 2);
(iii) SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA (SEC ID N°: 14 como se muestra en la Figura 2);
(iv) LLVKYAAGDGNIVAVDIKPK (SEC ID N°: 20 como se muestra en la Figura 2);
(v) GNIVAVDIKPKDSDEFIPMK (SEC ID N°: 21, como se muestra en la Figura 2);
(vi) PKDSDEFIPMKSSWGAIWRI (SEC ID N°: 22 como se muestra en la Figura 2);
(vii) MKSSWGAIWRIDPKKPLKGP (SEC ID N°: 23, como se muestra en la Figura 2);
(viii) EGGAHLVQDDVIPANWKPD (SEC ID N°: 26 como se muestra en la Figura 2); o
35 (ix) LVQDDVIPANWKPDVYTSK (SEC ID N°: 27, como se muestra en la Figura 2).
4. El péptido de acuerdo con la reivindicación 2 en el que dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos 5 aminoácidos derivados de una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:
- 40 SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA (SEC ID N°: 14 como se muestra en la Figura 2)
PKDSDEFIPMKSSWGAIWRI (SEC ID N°: 22 como se muestra en la Figura 2)
MKSSWGAIWRIDPKKPLKGP (SEC ID N°: 23, como se muestra en la Figura 2)
EGGAHLVQDDVIPANWKPD (SEC ID N°: 26 como se muestra en la Figura 2)
LVQDDVIPANWKPDVYTSK (SEC ID N°: 27, como se muestra en la Figura 2).
5. El péptido de acuerdo con la reivindicación 4 en el que dicha secuencia de aminoácidos derivada de una o más de SEC ID N°: 14 SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA o SEC ID N°: 26 EGGAHLVQDDVIPANWKPD como se muestra en la Figura 2.
6. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 mostrando dicho péptido unión a IgE anulada.
7. Uso de un péptido como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una afección en un sujeto cuya afección se caracteriza por una respuesta inmune aberrante, no deseada o de otro modo inapropiada a Cyn d 1.
8. Un péptido aislado de 5 a 20 restos de longitud que comprende un epítipo de linfocitos T Cyn d 1, siendo dicha molécula peptídica capaz de interactuar con linfocitos T y modificar la función de linfocitos T cuando se incuba con células de sujetos que tienen dicha afección; y en el que dicho péptido:
- a) comprende al menos 5 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos derivada o seleccionada de

- (i) HIAAYHFDLSGKAFGAMAKK (SEC ID N°: 13 como se muestra en la Figura 2);
 (ii) SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA (SEC ID N°: 14 como se muestra en la Figura 2);
 (iii) LLVKYAAGDGNIVAVDIKPK (SEC ID N°: 20 como se muestra en la Figura 2);
 (iv) GNIVAVDIKPKDSDEFIPMK (SEC ID N°: 21, como se muestra en la Figura 2);
 (v) PKDSDEFIPMKSSWGAIWRI (SEC ID N°: 22 como se muestra en la Figura 2); o
 (vi) MKSSWGAIWRIDPKKPLKGP (SEC ID N°: 23, como se muestra en la Figura 2) o

b) es un péptido de (a) que comprende una sustitución de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos derivada o seleccionada de (i) a (vi).

9. El péptido de acuerdo con la reivindicación 8 en el que dicha secuencia de aminoácidos es

- (i) HIAAYHFDLSGKAFGAMAKK (SEC ID N°: 13 como se muestra en la Figura 2);
 (ii) SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA (SEC ID N°: 14 como se muestra en la Figura 2);
 (iii) LLVKYAAGDGNIVAVDIKPK (SEC ID N°: 20 como se muestra en la Figura 2);
 (iv) GNIVAVDIKPKDSDEFIPMK (SEC ID N°: 21, como se muestra en la Figura 2);
 (v) PKDSDEFIPMKSSWGAIWRI (SEC ID N°: 22 como se muestra en la Figura 2); o
 (vi) MKSSWGAIWRIDPKKPLKGP (SEC ID N°: 23, como se muestra en la Figura 2).

10. El péptido de acuerdo con la reivindicación 8 en el que dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos 5 aminoácidos derivados de una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA (SEC ID N°: 14 como se muestra en la Figura 2)
 PKDSDEFIPMKSSWGAIWRI (SEC ID N°: 22 como se muestra en la Figura 2)
 MKSSWGAIWRIDPKKPLKGP (SEC ID N°: 23, como se muestra en la Figura 2)
 EGGAHLVQDDVIPANWKPDT (SEC ID N°: 26 como se muestra en la Figura 2)

11. El péptido de acuerdo con la reivindicación 8 en el que dicha secuencia de aminoácidos deriva de una o más de SEC ID N°: 14 SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA o SEC ID N°: 26 EGGAHLVQDDVIPANWKPDT como se muestra en la Figura 2.

12. El péptido de acuerdo con la reivindicación 8 mostrando dicho péptido unión a IgE anulada.

13. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica o complementaria a una secuencia que codifica un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.

14. Un anticuerpo aislado dirigido a un péptido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.

15. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 14 siendo dicho anticuerpo un anticuerpo policlonal.

16. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 14 siendo dicho anticuerpo un anticuerpo monoclonal.

17. Una composición farmacéutica que comprende un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 o un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 junto con uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

18. Un método *in vitro* para diagnosticar o controlar una afección en un mamífero, cuya afección se caracteriza por una respuesta aberrante, no deseada o inapropiada a Cyn d 1, comprendiendo dicho método explorar una muestra derivada del mamífero con respecto a anticuerpos y/o linfocitos T reactivos a Cyn d 1 utilizando los péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 o los anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17.

19. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 para su uso en el tratamiento o profilaxis de una afección en un sujeto, cuya afección se caracteriza por una respuesta inmune aberrante, no deseada o de otro modo inapropiada a Cyn d 1.

20. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, el uso de la reivindicación 7, el método de la reivindicación 18 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 19 en el que dicha afección es hipersensibilidad a polen de pasto Bermuda.

21. Un kit de diagnóstico para su uso en el método de la reivindicación 18 ó 20 comprendiendo dicho kit un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 o un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.

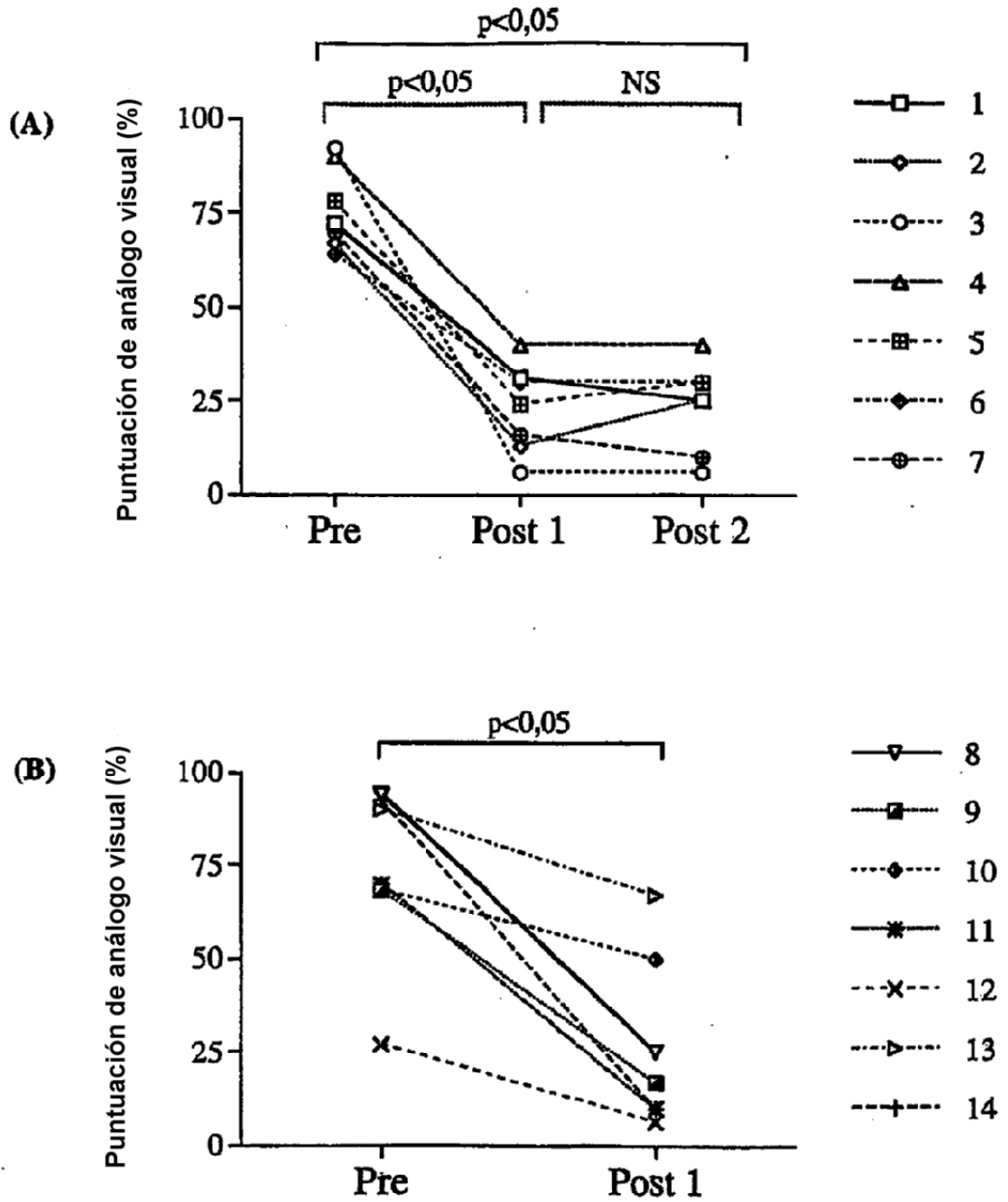


Figura 1

(SEC ID N°:2) (1-20) AIGDKPGPNITATYGNKWLE
 (SEC ID N°:3) (10-29) ITATYGNKWLEAKATFYGSN
 (SEC ID N°:4) (19-38) LEAKATFYGSNPRGAAPDDH
 (SEC ID N°:5) (28-47) SNPRGAAPDDHGGACGYKDV

(SEC ID N°:6) (37-56) DHGGACGYKDVDKPPFDGMT
 (SEC ID N°:7) (46-65) DVDKPPFDGMTACGNEPIFK
 (SEC ID N°:8) (55-74) MTACGNEPIFKDGLGCGACY
 (SEC ID N°:9) (64-83) FKDGLGCGACEIKCKEPEVE

(SEC ID N°:10) (73-92) CYEIKCKEPEVECSGEPVLVK
 (SEC ID N°:11) (82-101) VECSGEPVLVKITDKNYEHI
 (SEC ID N°:12) (91-110) VKITDKNYEHIAAYHFDLSG
 (SEC ID N°:13) (100-119) HIAAYHFDLSGKAFGAMAKK

(SEC ID N°:14) (109-128)SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA
 (SEC ID N°:15) (118-137) KKGQEDKLRKAGELTLQFRR
 (SEC ID N°:16) (127-146) KAGELTLQFRRVKCKYPSGT
 (SEC ID N°:17) (136-155) RRVKCKYPSGTKITFHIEK

(SEC ID N°:18) (145-164)GTKITFHIEKGSNDHYLALL
 (SEC ID N°:19) (154-173) KGSNDHYLALLVKYAAGDGN
 (SEC ID N°:20) (163-182) LLVKYAAGDGNIVAVDIKPK
 (SEC ID N°:21) (172-191) GNIVAVDIKPKDSDEFIPMK

(SEC ID N°:22) (181-200)PKDSDEFIPMKSSWGAIWRI
 (SEC ID N°:23) (190-209) MKSSWGAIWRIDPKKPLKGP
 (SEC ID N°:24) (199-218) RIDPKKPLKGPFSIRLTSEG
 (SEC ID N°:25) (208-227) GPFSIRLTSEGG AHLVQDD

(SEC ID N°:26) (217-236)EGGAHLVQDDVIPANWKPD
 (SEC ID N°:27) (222-241) LVQDDVIPANWKPDVYTSK
 (SEC ID N°:28) (227-246) VIPANWKPDVYTSK LQFGA

Figura 2

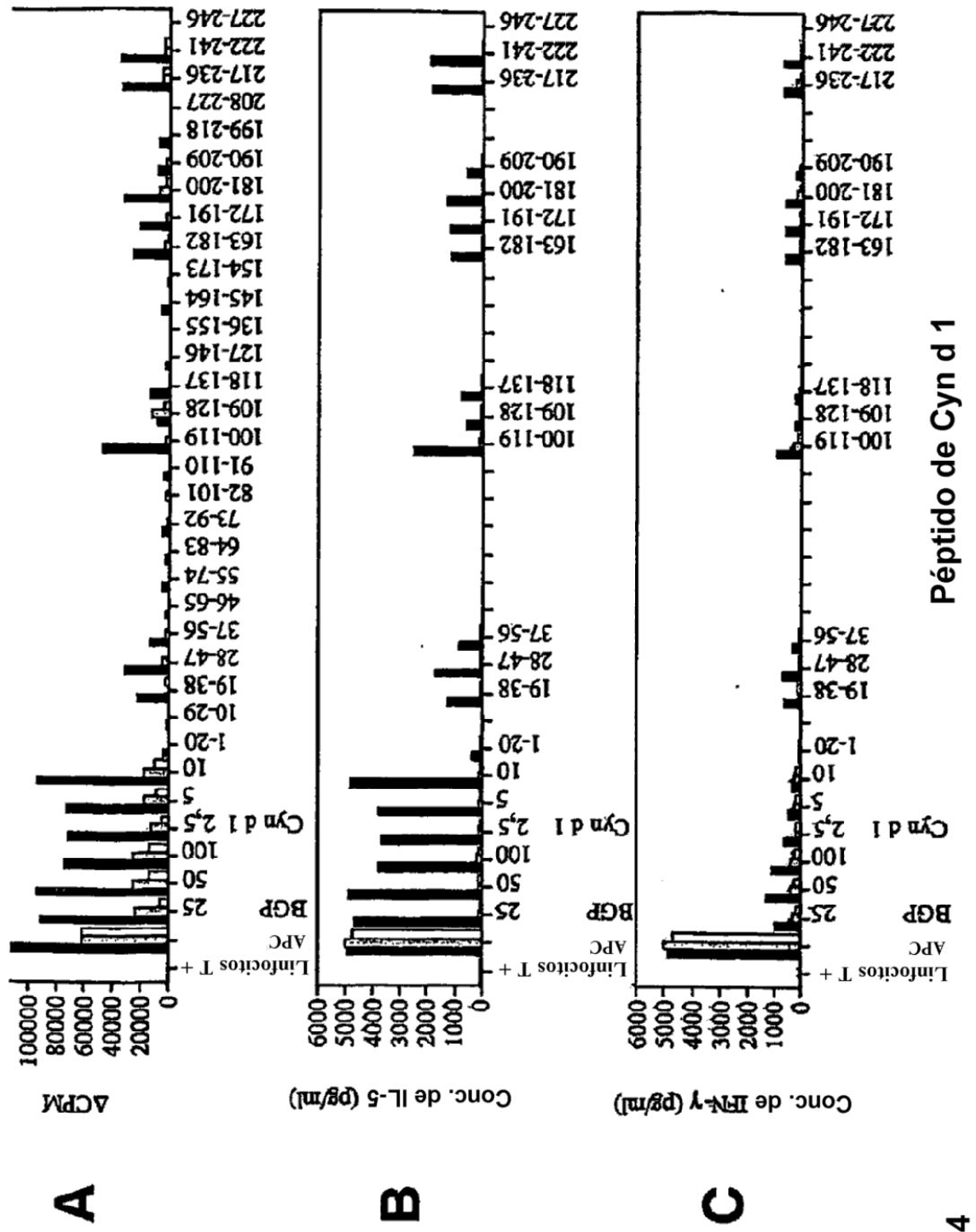


Figura 4

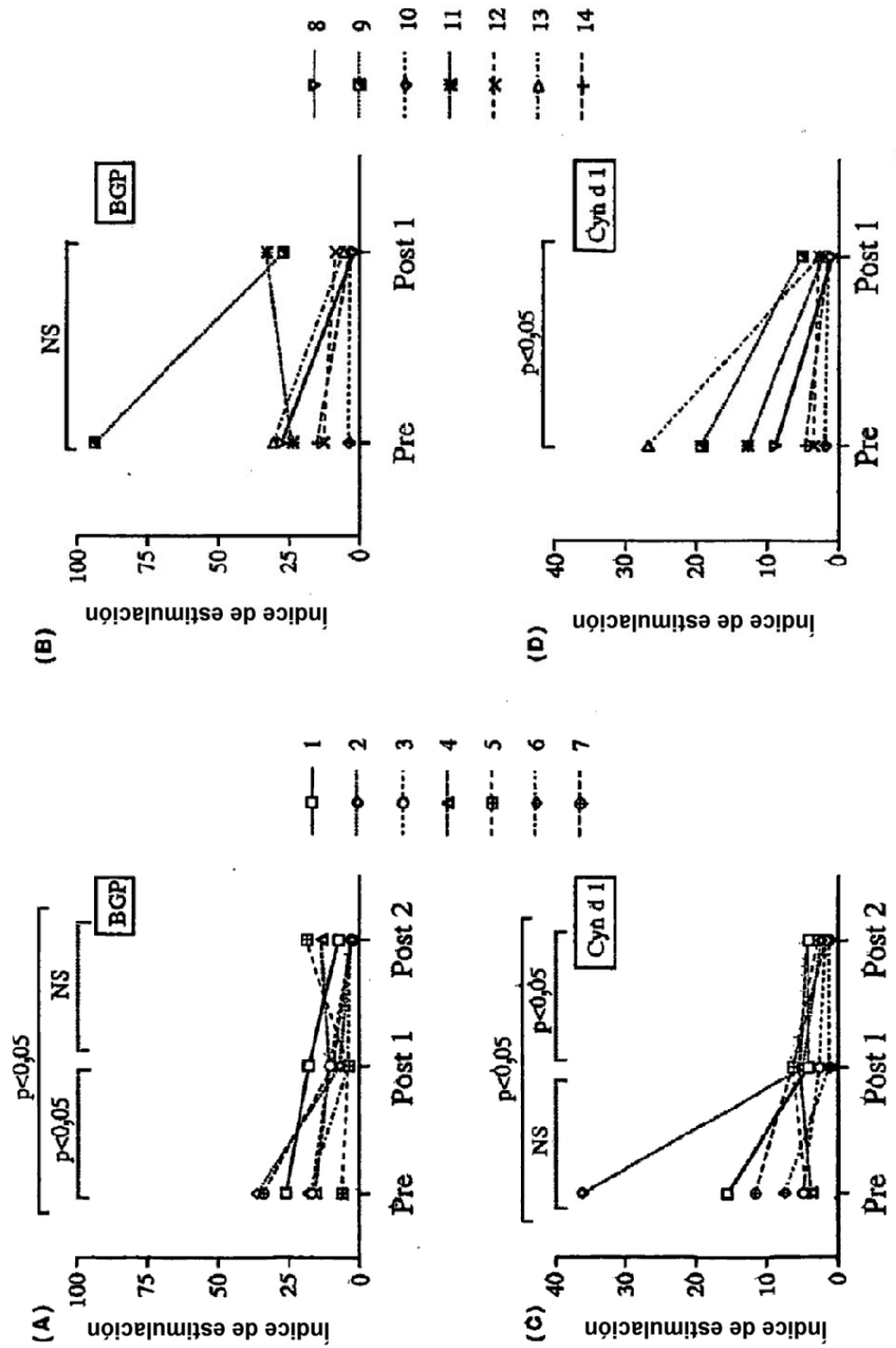


Figura 4

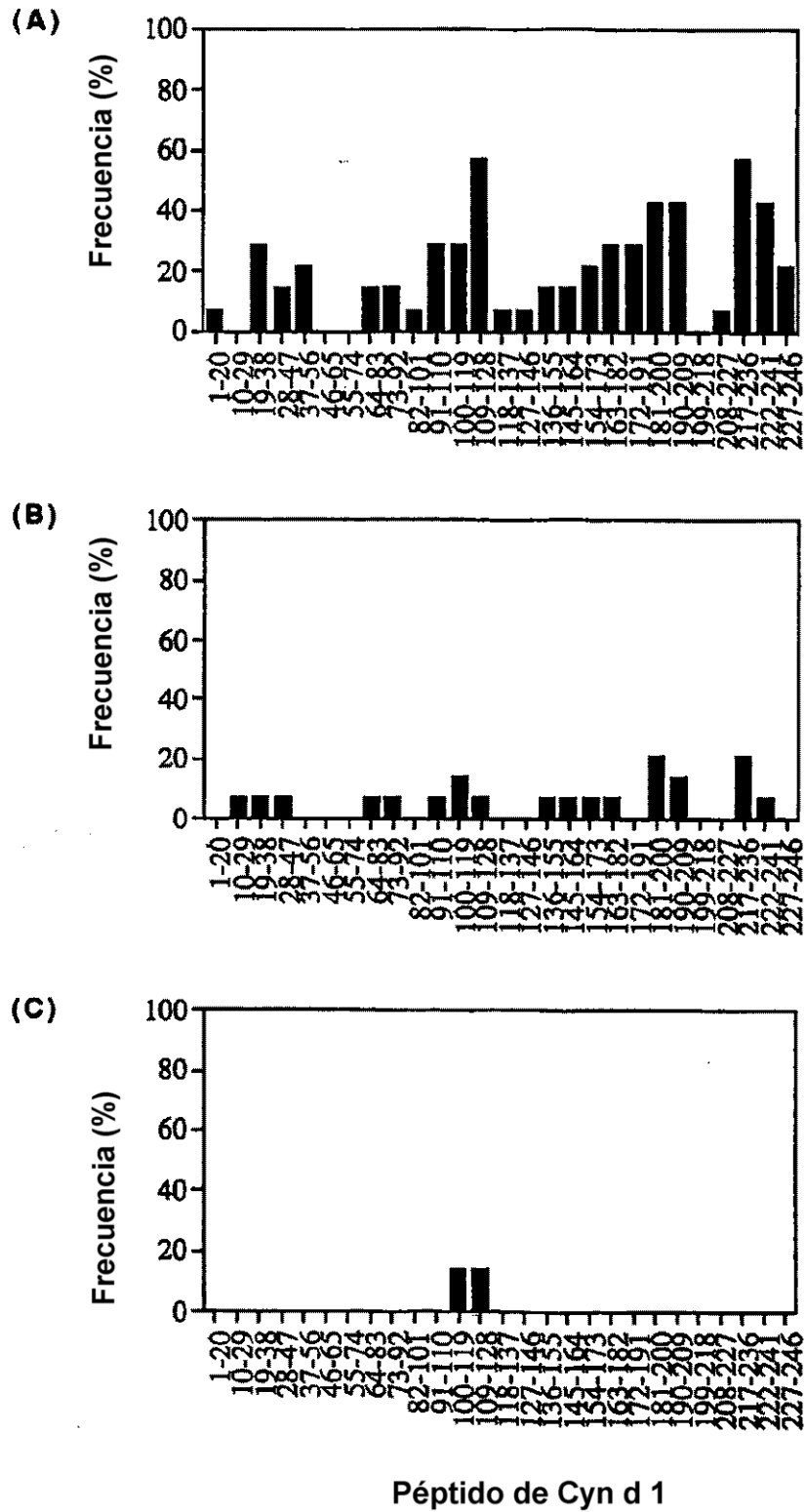


Figura 5

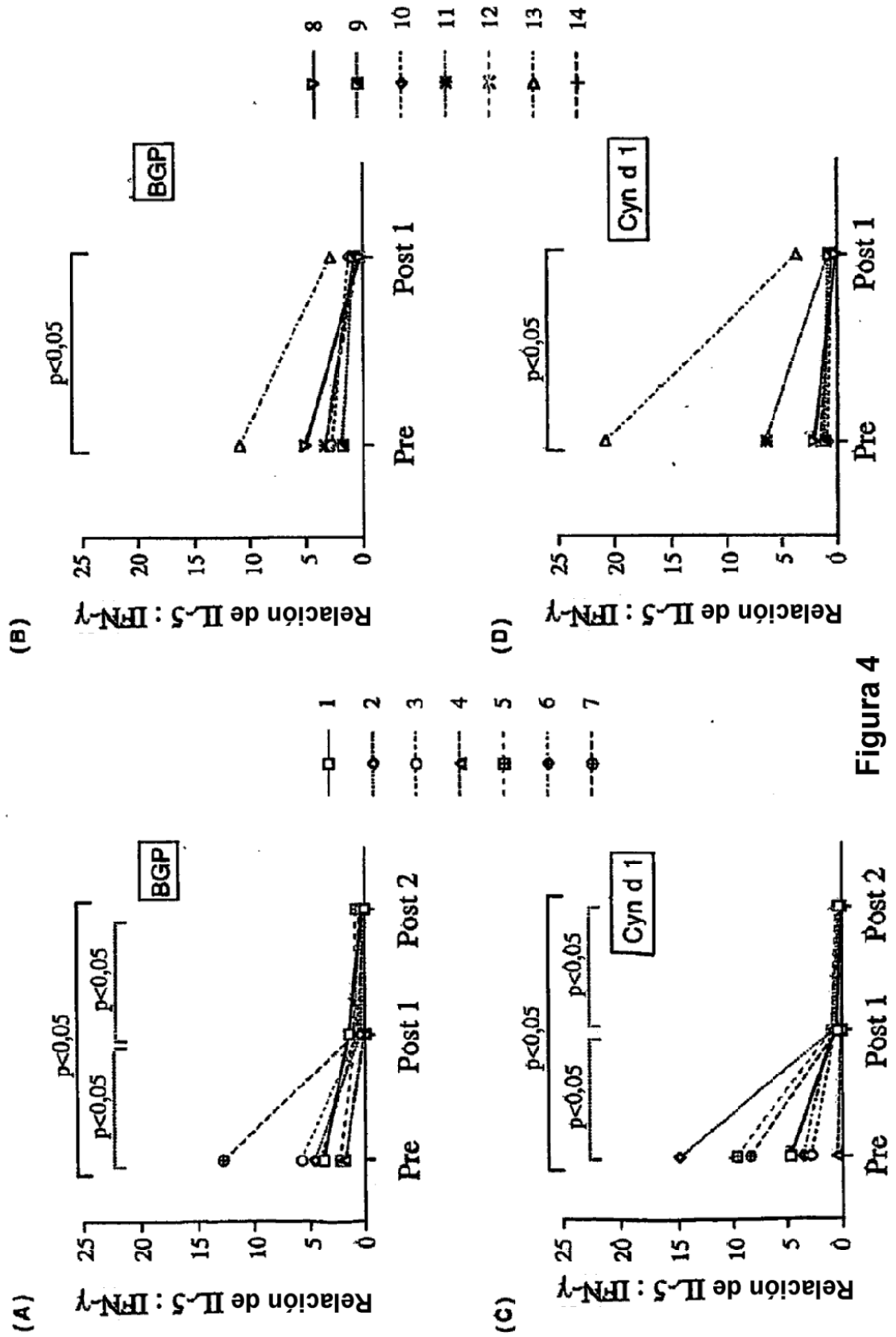


Figura 4