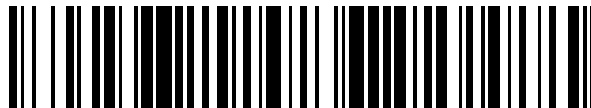


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 615**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**A61P 37/08** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2007 E 07722975 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 1996230**

54 Título: **Molécula biespecífica que se une a TLR9 y CD32 y que comprende un epítipo de célula T**

30 Prioridad:

**03.03.2006 EP 06110672**

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

**06.08.2014**

73 Titular/es:

**S-TARGET THERAPEUTICS GMBH (100.0%)  
Mooslackengasse 17  
1190 Vienna , AT**

72 Inventor/es:

**MUDE, GEERT y  
HIMMLER, GOTTFRIED**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 483 615 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

Molécula biespecífica que se une a TLR9 y CD32 y que comprende un epítipo de célula T

La presente invención se refiere a moléculas con especificidad de unión tanto a Receptor 9 semejante a Toll (TLR9) como a CD32 que contienen uno o más epítopos de antígeno de célula T.

- 5 La invención se refiere además a la producción de estas moléculas y a su uso para la preparación de medicamentos para el tratamiento de las alergias.

**Introducción:**

Se considera que la alergia es una reacción hipersensible a proteínas en el medioambiente (aire/agua/alimentos). Los alérgenos son antígenos frente a los que responden los pacientes atópicos con respuestas de anticuerpo IgE que posteriormente dan lugar a reacciones alérgicas. Los antígenos en los complejos o proteínas de fusión pueden ser alérgenos medioambientales (por ejemplo, ácaro del polvo doméstico, polen de abedul, polen de hierba, antígenos de gato, antígenos de cucaracha) o alérgenos alimentarios (por ejemplo, leche de vaca, cacahuete, gamba, soja) o una combinación de ambos. Las moléculas IgE son importantes debido a su papel en la activación de las células efectoras (mastocito, basófilos y eosinófilos). Más recientemente, se ha admitido que IgE también juega un papel importante en la fase de inducción de las enfermedades alérgicas, mediante la regulación al alza del potencial de captura de antígeno de las células B y las células dendríticas (DC), ambos a través de receptores de baja afinidad (CD23) y de alta afinidad (FcεRI) [1]. Las funciones negativas de los anticuerpos IgE pueden contrarrestarse mediante anticuerpos IgG específicos de alérgeno, por ejemplo, porque dirigen la respuesta inmune fuera de las células B a monocitos y DC [2]. Además, compiten con las moléculas IgE para los sitios de unión del alérgeno. Por lo tanto, las alergias pueden tratarse, curarse y prevenirse mediante la inducción de moléculas IgG específicas de alérgeno.

Las moléculas IgG tienen una vida media en suero de aproximadamente 3 semanas comparado con los 3 días aproximados para las moléculas IgE. Las moléculas IgE se inducen por la interacción entre células B (sin activar) y células Th2 que proporcionan la expresión de IL-4 e IL-13 junto con CD40L necesaria para inducir un cambio de clase a IgE en las células B de memoria y células plasmáticas [3]. Por el contrario, las células Th1, que producen IFN-γ e IL-2, inducen un cambio de clase hacia IgG. Por lo tanto, la inducción de las respuestas de células T auxiliares Th1, en lugar de Th2 frente a alérgenos, es beneficiosa para la prevención, tratamiento y cura de las enfermedades alérgicas.

Hasta la fecha, se usan varias formas de vacunación activa usando alérgenos. La más común es la denominada "inmunoterapia", que depende de inmunizaciones frecuentes con concentraciones relativamente altas de alérgenos. Esta técnica sólo es moderadamente eficaz en una minoría de enfermedades alérgicas tales como alergia al veneno de las abejas y en algunos casos de rinitis y conjuntivitis, y recientemente algunas publicaciones han mostrado eficacia en asma y dermatitis atópica. Más recientemente, se ha propuesto la inmunoterapia rápida ("rush"), en la que cantidades crecientes de alérgeno se inyectan en un marco de tiempo bastante corto, con resultados ligeramente mejores [4; 5]. Habitualmente, se usa la ruta subcutánea para la administración de alérgenos, pero recientemente esta ruta se ha comparado con la aplicación oral o incluso la aplicación local, los resultados son generalmente positivos pero no siempre consistentes. Una técnica diferente para inmunoterapia es la descrita por Saint-Remy (EP 0 178 085 y 0 287 361), que usa anticuerpos IgG autólogos que forman complejos in vitro con los alérgenos relevantes. Esta técnica permite aplicar cantidades mucho menores de alérgeno con menos efectos secundarios.

El mecanismo que está detrás de estas terapias no está claro. En la terapia clásica parece haber un efecto beneficioso si la terapia induce un incremento en anticuerpos IgG específicos, aunque no todos los incrementos significativos de IgG específicas se correlacionan con una inmunoterapia exitosa. Un argumento posible para que éste sea el caso es la afinidad relativamente baja de anticuerpos IgG para CD32 en células B, monocitos y mastocitos. La estrategia Saint-Remy selecciona los anticuerpos IgG específicos del paciente, que se mezclan posteriormente con alérgenos relevantes in vitro. De esta manera se aseguran de que el alérgeno no pueda reaccionar libremente con células u otros isotipos de anticuerpo en las células tales como IgE en mastocitos. Además, reivindican que se generan anticuerpos anti-idiotípicos frente a moléculas IgG específicas, que en el futuro prevendrán la alergia.

En WO 97/07218 se describen proteínas de fusión alérgeno-anti-CD32. En esta publicación, los problemas con el aislamiento de moléculas IgG específicas y la baja afinidad de estos anticuerpos IgG para CD32 se evitan y los factores de riesgo de la inmunoterapia clásica, que usa alérgenos completos de "unión a IgE", se reducen. Sin embargo, la inducción reivindicada de respuestas de memoria Th1 debidas al direccionamiento único de la vacuna que contiene anti-CD32 a las células dendríticas no puede sostenerse.

Means Terry et al. (The Journal of Clinician Investigation 2005, vol 115(2): 407-417) describen que complejos inmunes que contienen ADN con suero de lupus estimulan DC plasmacitoides para producir citoquinas mediante una interacción cooperativa entre el receptor 9 semejante a Toll y FcγRIIIa (CD32).

Incluso a la vista de la investigación intensiva para estrategias terapéuticas para tratar enfermedades alérgicas, todavía existe una gran demanda para proporcionar medicamentos para el tratamiento exitoso de las alergias.

El objeto de la invención es por lo tanto proporcionar moléculas nuevas con propiedades mejoradas para el tratamiento de enfermedades alérgicas.

5 Según la invención, este objeto se consigue por el subject matter de las reivindicaciones.

#### Descripción breve de la invención:

##### Antecedentes:

10 CD32 se expresa fuertemente en monocitos/células dendríticas y células B y así la molécula de la presente invención se diseña para dirigir la respuesta inmune a estas importantes células inmunológicas, con la intención de prevenir la presentación del alérgeno por las células B, a la vez que se estimula la presentación del alérgeno por células dendríticas (DC) especialmente, dando lugar lo último a la inducción de respuestas Th1 frente a los alérgenos en la molécula o complejo molecular que puede formularse como vacuna. El conocimiento más reciente muestra que existen dos tipos de células dendríticas (DC): células dendríticas mieloides (mDC) y plasmacitoides (pDC) [6], lo que ha dado lugar al nuevo concepto de células Dc1 y DC2 [7]. En este concepto, las células DC1 estimulan la inducción del desarrollo de las células Th1 después de la estimulación específica de antígeno y las células DC2 apoyan el desarrollo de las células Th2. Se considera generalmente que las DC derivadas de monocitos (o mDC) son del tipo DC1, mientras se considera que las pDC son del tipo DC2 [6]. Ambos tipos de DC expresan CD32a e inducirán una respuesta de célula T específica de alérgeno; sin embargo, no se garantiza que el resultado será del tipo Th1. De hecho, en donantes alérgicos las respuestas Th2 son más probables [8]. De forma importante, las pDC expresan el receptor TLR9, que se une a CpG-ODN (oligodesoxinucleótidos [ODN] que contienen restos CpG no metilados). La activación de este receptor en pDC da lugar a una producción muy fuerte de IFN- $\alpha$  e IL-12 [9], lo que estimula la inducción de Th1 y transforma así las DC2 potenciales en células DC1.

15 Por lo tanto, la molécula de la invención puede combinar la activación del receptor TLR9 en pDC con la estimulación e inducción específicas de células Th1 específicas de alérgeno y comprende, por lo tanto, una mejora significativa de los conceptos anteriores.

20 La invención comprende una preparación farmacéutica que comprende una molécula o un complejo molecular que tiene especificidad de unión para el receptor 9 semejante a Toll y CD32, en la que la molécula o complejo molecular incluye al menos un epítipo, preferiblemente al menos un epítipo de célula T, de al menos un antígeno y en la que la parte de unión a CD32 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, dominios proteicos y péptidos y la parte de unión a TLR9 es un ácido nucleico.

25 La molécula o complejo molecular de la invención también evitará la función efectora de los mastocitos, que portan IgE, para el alérgeno nativo del que se han seleccionado los epítopos de célula T para ser parte de la proteína de fusión.

Preferiblemente, la molécula o complejo molecular según la invención puede tener una o más de las características únicas siguientes:

- 35
- Activación e inducción de células Th1 específicas de alérgeno, sin activación de células B específicas de alérgeno.
  - Activación e inducción de células Th1 específicas de alérgeno, sin activación de mastocitos o cualquier otra célula efectora, que, mediante IgE o IgG específica de alérgeno, pueden activarse por los alérgenos naturales de los que están representados los epítopos de célula T seleccionados en la molécula o complejo molecular de la invención.

40 La parte de unión a CD32 de la molécula o complejo molecular de la invención selecciona las células relevantes, que internalizarán la molécula o complejo molecular completo.

Después de la internalización de la proteína de fusión según la presente invención por las células presentadoras de antígeno, la molécula de la invención se degrada y varios péptidos, incluyendo el o los epítopos de célula T incorporados, se presentan en las moléculas MHC clase II de las células presentadoras de antígeno, estimulando por lo tanto células T específicas de alérgeno.

45 La o las estructuras de unión a TLR9 incorporadas en la molécula o complejo molecular de la invención son necesarias para la inducción de un conjunto de memoria de Th1 específicas de alérgeno, mediante la unión al receptor TLR9 citoplasmático [10; 11]. La activación del receptor TLR9 da lugar a una inducción fuerte de la producción de IFN- $\alpha$  e IL12 [9].

Según la presente invención, una molécula es una única entidad compuesta por átomos y/o otras moléculas por enlaces covalentes. La molécula puede estar compuesta por una única clase de sustancias o una combinación de éstas. Las clases de sustancias son, por ejemplo, polipéptidos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, etc.

5 Un complejo molecular es un agregado de moléculas que interactúan específicamente y fuertemente entre sí. Un complejo de varias moléculas puede formarse mediante interacciones hidrofóbicas (tales como, por ejemplo, la unión de regiones variables de anticuerpo en un Fv) o mediante la unión fuerte de una molécula a otra a través de interacciones ligando/receptor tales como la unión anticuerpo-antígeno o avidina-biotina o mediante la formación de complejo a través de grupos químicos quelantes y semejantes.

10 Un antígeno puede ser una estructura que puede ser reconocida por un anticuerpo, un receptor de célula B o un receptor de célula T cuando es presentado por moléculas MHC de clase I o II.

Un epítipo es la estructura más pequeña a la que se une específicamente un anticuerpo, un receptor de célula B o un receptor de célula T cuando es presentado por moléculas MHC de clase I o II. La especificidad se define como la unión preferente a una estructura molecular determinada (en las interacciones anticuerpo/antígeno también denominada epítipo) en un determinado contexto.

15 Un dominio es una región discreta encontrada en una proteína o polipéptido. Un dominio monomérico forma una estructura tridimensional nativa en disolución en ausencia de secuencias de aminoácidos nativas flanqueantes. Los dominios de la invención se unirán específicamente a CD32 y/o TLR9 y/o epítipos expuestos o presentes. Los dominios pueden usarse como dominios únicos o dominios monoméricos o combinarse para formar dímeros y dominios multiméricos. Por ejemplo, un polipéptido que forma una estructura tridimensional que se une a una molécula diana es un dominio monomérico.

20 Según la presente invención, el término anticuerpo incluye anticuerpos o derivados de anticuerpo o fragmentos de éstos así como moléculas relacionadas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (tales como receptores de célula T solubles). Entre los fragmentos de anticuerpo están equivalentes u homólogos funcionales de anticuerpos incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión de inmunoglobulina o un dominio de inmunoglobulina pequeño mutado o péptidos que mimetizan este dominio de unión junto con una región Fc o una región homóloga a una región Fc o al menos parte de ésta. Se incluyen las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o equivalentes, fusionado a otro polipéptido.

Los alérgenos son antígenos frente a los que responden los pacientes atópicos con reacciones alérgicas.

#### **Descripción detallada de la invención**

30 La invención proporciona una preparación farmacéutica que comprende una molécula o complejo molecular capaz de unirse a TLR9 y a CD32, que comprende al menos un epítipo de al menos un antígeno, en la que la parte de unión a CD32 de la molécula o complejo molecular se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o péptidos, y la parte de unión a TLR9 es un ácido nucleico.

35 En una realización de la invención, la molécula o complejo molecular comprende al menos tres partes, siendo una parte una estructura que se une específicamente a TLR9 (de forma monovalente, bivalente o multivalente), siendo otra parte una estructura que se une específicamente a CD32 (de forma monovalente, bivalente o multivalente) y al menos otra parte siendo uno o más epítipos de célula T de un antígeno y/o alérgeno. Las partes pueden ser estructuras independientes que están unidas entre sí bien por uniones químicas o por fusión genética o por otras interacciones (no covalentes) tales como interacciones ligando-receptor o anticuerpo.

40 Las uniones entre las diferentes partes pueden ser diferentes. Por ejemplo, en una realización preferida, la unión entre las partes que se unen a TLR9 y CD32 es por fusión genética y la unión al menos a al menos uno de los epítipos de célula T es a través de una interacción receptor/ligando (por ejemplo, biotina-estreptavidina). La ventaja de dicha configuración es la flexibilidad de la producción. La parte genérica, biespecífica (anti-TLR9/anti-CD32) del complejo molecular puede producirse de la misma manera para todos los pacientes, epítipos de célula T seleccionados se unen a la parte genérica del complejo molecular según las necesidades. La selección puede basarse en la prevalencia de la enfermedad o en resultados de ensayos de especificidad individuales de pacientes (alergia específica). La formación del complejo puede realizarse centralizada o al lado de la cama o en el despacho del médico.

45 La unión química de moléculas de las diferentes moléculas de unión de la misma o una clase química diferente puede conseguirse por muchas técnicas diferentes que dan lugar bien a una proporción molecular definida de las diferentes partes de la molécula o complejo molecular de la invención. También puede dar lugar a una mezcla de moléculas con diferentes proporciones moleculares de las diferentes partes de la molécula o complejo molecular de la invención.

La proporción de las diferentes partes de la invención puede ser equimolar o no equimolar. La molécula puede ser monovalente para la unión a TLR9 y/o CD32 y/o epítipo(s) de célula T. También puede ser bi-, tri- y multivalente para al menos una de las partes de la molécula o el complejo molecular. Si la unión a TLR9 y/o CD32 es bivalente o con una valencia mayor, la especificidad de unión puede ser para uno o para más epítopos en CD32 y/o TLR9 respectivamente.

5 En otra realización de la invención, las especificidades de unión de la molécula se superponen de manera que una parte de la molécula el complejo molecular de la invención se une a ambos, TLR9 y CD32. Dicha parte podría seleccionarse mediante el cribado simultáneo de moléculas para la unión tanto a CD32 como a TLR9 o mediante la obtención por ingeniería de una molécula que se une a ambos, CD32 y TLR9. Por ejemplo, puede usarse un soporte proteico para exponer bucles para la unión a CD32 y otros bucles que se unen a TLR9.

10 En una realización adicional de la invención, puede usarse un soporte proteico para exponer estructuras que se unen a CD32, estructuras que se unen a TLR9 y para exponer epítopos de célula T.

Las moléculas con unión específica pueden ser ligandos naturales para CD32 y TLR9 y derivados de éstas. Por ejemplo, la parte Fc de inmunoglobulina se une a CD32. CpG es un ligando natural para TLR9.

15 Las moléculas con unión específica pueden ser péptidos. Los péptidos específicos de CD32 y TLR9 según la invención pueden seleccionarse por varios métodos tales como tecnología de exposición en fagos o mediante cribado de bibliotecas de péptidos combinatorias o matrices de péptidos. Los péptidos pueden seleccionarse y usarse en varios formatos tales como péptidos lineales, constreñidos o cíclicos, los péptidos pueden modificarse químicamente para estabilidad y/o especificidad.

20 Un péptido que se une específicamente también puede obtenerse a partir del análisis de la interacción de un ligando proteico natural a TLR9 y CD32 por aislamiento del sitio de unión mínimo del ligando.

Los péptidos con unión específica pueden usarse como tales en la molécula o el complejo molecular de la invención o usarse para ser incorporados en otras estructuras tales como por injerto en soportes proteicos, anticuerpos y dominios proteicos o acoplarse químicamente a moléculas transportadoras que podrían formar parte de la molécula o complejo molecular de la invención.

25 La parte de unión a CD32 de las moléculas o complejo molecular de la invención puede estar comprendida por proteínas tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (tales como Fab, Fv, scFv, dAb, F(ab)<sub>2</sub>, minicuerpo, dominios pequeños mutados de inmunoglobulina, receptor de célula T soluble, etc). Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo y derivados pueden generarse y seleccionarse para la unión a CD32 según métodos conocidos tales como la tecnología de hibridoma, clonación de células B, exposición en fagos, exposición en ribosomas o exposición en la superficie celular de bibliotecas de anticuerpos, cribado en matrices de anticuerpos variantes.

30 Las partes de unión de las moléculas o complejos moleculares de la invención pueden ser dominios proteicos que aparecen naturalmente o dominios que se modifican artificialmente. Los dominios proteicos o derivados de dominios, por ejemplo, dominios con mutaciones tales como sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos o dominios modificados químicamente pueden seleccionarse para la unión a CD32 según métodos conocidos (por ejemplo, exposición en fagos y en la superficie celular de bibliotecas de dominios o variantes de dominios y cribado, matrices de moléculas variantes y cribado).

35 En una realización preferida, la parte de unión de una molécula o complejo molecular de la invención comprende un dominio pequeño mutado de inmunoglobulina (SMID) como se describe en PCT/EP2006/050059.

40 La parte de unión de la molécula o complejo molecular de la invención puede ser ácidos nucleicos tales como ARN o ADN que pueden seleccionarse para la unión específica a TLR9 según métodos conocidos tales como cribado de aptámeros y técnicas de evolución in vitro.

45 Una realización preferida de la invención es una proteína de fusión recombinante que consiste en al menos un epítipo de al menos un antígeno, al menos un sitio de unión que interacciona con TLR9 y al menos un sitio de unión que interacciona con CD32. El antígeno puede ser tan pequeño como un epítipo de célula T de un antígeno o puede ser una combinación o una mezcla de uno o más epítopos de célula T de uno o más antígenos diferentes fusionados o unidos entre sí de manera tal que permita el procesamiento y presentación apropiados por las moléculas MHC. El orden de los epítopos puede seleccionarse según diferentes criterios tales como estabilidad del producto, procesamiento eficaz, (no)reconocimiento por anticuerpos preformados en las personas tratadas. Generalmente, se seleccionará una molécula estable que pueda ser presentada eficazmente por MHC y que dará lugar a un reconocimiento mínimo por los anticuerpos preformados.

50

La invención comprende además el acoplamiento físico de al menos una molécula que interacciona con TLR9, al menos una molécula que interacciona con CD32 y uno o más epítomos de célula T de uno o más antígenos unidos entre sí de una forma aleatoria.

5 Además, la invención proporciona la preparación de un medicamento que contiene la proteína de fusión según la invención y su uso para el tratamiento de las alergias. El medicamento puede ser una formulación de vacuna que contiene la molécula o complejo molecular según la invención, útil esp. para inmunoterapia activa.

La producción recombinante de estructuras de unión biespecíficas de la molécula o el complejo molecular de la invención (es decir, que se unen a CD32 y a TLR9) puede conseguirse de diferentes maneras, por ejemplo, por:

- Tecnología de cuadroma (hibridomas fusionados) [12;13]
- 10 • scFv biespecíficos, bien como "fragmentos divalentes" o simplemente por fusión genética de diferentes scFv [14]
- anticuerpos de dominio único en los que VH reconoce un antígeno y VL otro
- chi-bAb (como se describe en EP0640130)
- dominios pequeños mutados de inmunoglobulina, mediante la inclusión de dominios de inmunoglobulina preparados por ingeniería, que se unen específicamente a CD32 y/o a TLR9 en construcciones que codifican bien anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpo tal como Fab (según PCT/EP2006/050059)
- 15 • en el contexto de esta invención, la unión a CD32 también puede conseguirse por región o regiones Fc de inmunoglobulina monoméricas o multiméricas o una parte de éstas especialmente cuando la afinidad para CD32 de las partes Fc está aumentada, mientras la unión a TLR9 se consigue a través del sitio de unión normal (VH/VL) del anticuerpo
- 20 • región o regiones Fc de una inmunoglobulina o partes de éstas, que se unen a CD32, fusionadas con cualquier otro resto con unión específico de TLR9
- la parte Fc del anticuerpo mencionado anteriormente puede prepararse por "glico-ingeniería" para incrementar la afinidad para Fc $\gamma$ R humanos [15]

25 pueden usarse soportes preparados por ingeniería, que se unen específicamente a TLR9 y/o CD32 de cualquier clase y unirse entre sí según se necesite. Estos soportes de unión pueden ser dominios proteicos, fibronectina III, lipocalinas, Proteína A o inhibidor de  $\alpha$ -amilasa, proteínas con repeticiones anquirina, un dominio C2, un dominio A, un dominio semejante a EGFR, un dab, un chi-bAb, CTLA-4, cristalina gamma o cualquier otra proteína, dominio proteico o parte de éstos.

30 La molécula o complejo molecular de la invención consiste en uno o más epítomos y una o más estructuras de unión, que interaccionan con TLR9, preferiblemente TLR9 humano y una o más estructuras de unión, que interaccionan con CD32, preferiblemente CD32 humano. Para facilitar el ensayo in vivo de la proteína inventiva, las estructuras de unión que reconocen TLR9 humano y CD32 humano pueden reaccionar de manera cruzada con TLR9 de mono o de ratón y CD32 de mono o de ratón. Los antígenos/alergenos seleccionados pueden ser proteínas naturales/nativas completas o partes de éstas, siempre que los epítomos que pueden presentarse en moléculas MHC de clase II y que pueden ser reconocidos por las células T estén presentes en las secuencias presentes en la molécula o complejo molecular. La parte o partes de la molécula o complejo molecular, que interacciona con TLR9 y CD32 pueden ser anticuerpos completos o incompletos (modificados) o fragmentos o derivados de éstos, siempre que se retenga la unión a TLR9 y CD32.

40 Alternativamente, pueden usarse anticuerpos anti-TLR9 y anti-CD32 o derivados o fragmentos de éstos, que todavía reconocen y se unen específicamente a TLR9 y CD32 humanos tales como los expresados por las células B y células dendríticas.

Alternativamente, los anticuerpos que interaccionan con TLR9 o CD32 son anticuerpos mejorados con mayor afinidad que los anticuerpos originales.

45 Las moléculas de anticuerpo ejemplares son moléculas de inmunoglobulina intactas y aquellas partes de una molécula de inmunoglobulina que contiene el paratopo, incluyendo aquellas partes conocidas como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc y F(v), dAb.

Los anticuerpos pueden ser IgG, IgM, IgE, IgA o IgD. Las moléculas que interactúan con TLR9 o CD32 pueden tener cualquier origen, preferiblemente origen de mamífero, preferiblemente origen humano, de ratón, camello, perro o gato o humanizado. Preferiblemente, las moléculas son anticuerpos, preferiblemente anticuerpos humanos o humanizados.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, si la molécula o complejo molecular de la invención es una proteína de fusión, ésta puede expresarse en células huésped que abarcan cualquier clase de sistema celular que puede modificarse para expresar la proteína de fusión. En el alcance de la invención, el término "células" significa células individuales, tejidos, órganos, células de insecto, células aviares, células de mamífero, células de hibridoma, células primarias, líneas celulares continuas, células madre y/o células preparadas por ingeniería genética, tales como células recombinantes que expresan un anticuerpo según la invención.

10 Las células pueden ser células bacterianas, células fúngicas, células de levadura, células de insecto, células de peces y células de plantas.

Preferiblemente, las células son células animales, más preferiblemente células de mamíferos. Éstas pueden ser, por ejemplo, células BSC-1, células LLC-MK, células CV-1, células CHO, células COS, células PerC6, células murinas, células humanas, células HeLa, células 293, células VERO, células MDBK, células MDCK, células MDOK, células CRFK, células RAF, células TCMK, células LLC-PK, células PK15, células WI-38, células MRC-5, células T-FLY, células BHK, SP2/0, células NS0 o derivados de éstas.

Preferiblemente, las estructuras de unión de la molécula o el complejo molecular de la invención que reconocen CD32 son dominios pequeños mutados de inmunoglobulina, siendo por ejemplo un anticuerpo completo en el que un sitio de unión está formado por VH/L y está combinado con un segundo sitio de unión que puede ser un dominio CL, CH1, CH2, CH3, CH4, VL o VH preparado por ingeniería según PCT/EP2006/050059.

20 Según la invención, la molécula o complejo molecular contiene al menos una estructura que se une específicamente a CD32.

Un anticuerpo anti-CD32 puede obtenerse por métodos conocidos (tales como tecnología de hibridoma, clonación de células B y cribado de bibliotecas de anticuerpos). Para la selección, pueden usarse células que exponen CD32 en un formato natural o puede usarse una parte extracelular recombinante de CD32 o pueden usarse péptidos sintéticos seleccionados de la secuencia de aminoácidos de CD32. Los criterios de selección son que la estructura de unión reconoce CD32a. En el caso en el que también sea reconocido CD32b, se prefiere que la afinidad para CD32a  $\geq$  CD32b.

Como un ejemplo, puede usarse el fragmento Fab del anticuerpo anti-CD32 IV.3 obtenido de la línea celular HB-217. Usando el método descrito, por ejemplo, por Orlandi et al<sup>16</sup>, el fragmento Fab se clona a partir de la línea celular HB-217. Alternativamente, pueden construirse otros formatos tales como scFv de las secuencias del gen V conocidas. Sin embargo, para la combinación óptima con un anticuerpo anti-TLR9 o fragmento Fab o fragmento Fv se prefiere seleccionar ligantes específicos usando una o más de las bibliotecas de dominios pequeños mutados de inmunoglobulina de CH1, CH2, CH3, CH4, CL, VL o VH. Los dominios CH1, CH2, CH3, CH4, CL, VL o VH seleccionados pueden clonarse entonces en la secuencia existente de un anticuerpo anti-TLR9 o un fragmento Fab o Fv de éstos generando así un anticuerpo biespecífico o fragmento Fab.

Las entidades de unión a CD32 seleccionadas deberían tener preferiblemente las características siguientes:

1. La interacción con CD32a da lugar a la internalización del complejo receptor-estructura de unión, activación de la célula presentadora de antígeno a través del resto ITAM en la cola citoplásmica del receptor y la presentación del antígeno de los epítomos de célula T unidos/fusionados
2. La interacción con CD32b da lugar a una señalización negativa del receptor a través del resto ITIM
3. La interacción debería mostrar reactividad cruzada entre CD32 humano y de mono (para ensayar la eficacia en un modelo in vivo relevante)
4. La interacción debería mostrar reactividad cruzada con CD32 de ratón (para ensayar en un modelo in vivo establecido para alergia)

45 Para obtener una estructura de unión que se une específicamente a TLR9, pueden usarse varios procedimientos (tales como tecnología de hibridoma, clonación de células B y cribado de bibliotecas de anticuerpos). Para la selección, pueden usarse células que expresan TLR9 en un formato natural para aislar TLR9 natural o puede usarse un TLR9 recombinante o péptidos sintéticos seleccionados de la secuencia de aminoácidos de TLR9. Alternativamente, puede usarse TLR9 purificado o TLR9 expresado por líneas celulares. Los genes de anticuerpo que codifican VL y VH respectivamente pueden extraerse después de la selección para unión a TLR9 y usarse para diseñar un anticuerpo recombinante o fragmento Fab específico para TLR9 humano. Alternativamente, también puede prepararse un Fv de

cadena única y fusionarse con el scFv anti-CD32 mencionado anteriormente. Sin embargo, para la combinación óptima con el anticuerpo anti-CD32 o fragmento scFv o Fab se prefiere seleccionar ligantes específicos usando una o más de las bibliotecas de dominios pequeños mutados de inmunoglobulina de CH1, CH2, CH3, CH4, CL, VL o VH. Los dominios CH1, CH2, CH3, CH4, CL, VL o VH seleccionados pueden clonarse entonces en el anticuerpo existente o fragmento Fab o scFv de anticuerpo anti-CD32 generando así un fragmento Fab biespecífico. Las entidades de unión a TLR9 seleccionadas deberían tener preferiblemente las características siguientes:

1. La interacción con TLR9 da lugar a la transducción de la señal y la producción de citoquinas
2. La interacción puede mostrar reactividad cruzada entre TLR9 humano y de mono (para ensayar la eficacia en un modelo in vivo relevante)
3. La interacción puede mostrar reactividad cruzada con TLR9 (para ensayar en un modelo in vivo establecido para alergia) y CD32 de ratón

Por supuesto, la proteína de fusión puede prepararse de manera similar usando la parte Fab de un anticuerpo monoclonal aTLR9 existente. Usando el método descrito, por ejemplo, por Orlandi et al<sup>16</sup>, el fragmento Fab se clona a partir, por ejemplo, del clon 26C593 disponible en Imgenex Corp., como se ha descrito anteriormente para el fragmento fab del aCD32 Ab IV.3. De nuevo, para la combinación óptima con el fragmento Fab anti-TLR9 es mejor seleccionar ligantes específicos para CD32 usando una o más de las bibliotecas de dominios pequeños mutados de inmunoglobulina de CH1, CH2, CH3, CH4, CL, VL o VH. Los dominios CH1, CH2, CH3, CH4, CL, VL o VH seleccionados pueden clonarse entonces en el fragmento Fab existente del anticuerpo anti-TLR9 generando así una molécula biespecífica.

Finalmente, por ejemplo, en ausencia de Ab adecuados existentes disponibles tanto para CD32 como TLR9, también es posible construir una molécula biespecífica usando las bibliotecas de dominios pequeños mutados de inmunoglobulina de CH1, CH2, CH3 o CL para seleccionar ligantes específicos tanto para CD32 como TLR9 que se combinan posteriormente para formar nuevas estructuras existentes de al menos 1 estructura de unión específica para CD32 y 1 estructura de unión específica para TLR9 derivadas de cualquiera de las posibles bibliotecas en cualquiera de las posibles combinaciones (CH1-CH1 o CH1-CH2 o CH1-CH3 o CH2-CH4 o CH3-CH4 o CH1-CH4 o CH2-CH3 etc).

Alternativamente, puede seleccionarse un único dominio variable de la superfamilia de inmunoglobulinas para unión a TLR9 o CD32 con bucles CDR. El ligante seleccionado se aleatoriza entonces en posiciones de bucle no estructurales para generar una biblioteca de dominios variables que se selecciona para el otro antígeno respectivo, es decir, en el caso de un dominio variable que se une con bucles CDR a TLR9, la selección es para unión a CD32 y viceversa. También es posible seleccionar una biblioteca de un dominio V que contiene variaciones en los bucles CDR al mismo tiempo que variaciones en los bucles no CDR para unión a TLR9 y CD32 secuencialmente o simultáneamente.

Dichos dominios V biespecíficos también forman parte de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo tales como Fv de cadena única, Fab o anticuerpos completos.

Selección de un epítipo TLR9 adecuado:

La secuencia 244-256 (SEQ ID No 1) de la proteína TLR9 madura en código de aminoácidos de 1 letra:

```
CPRHFP QLHPDTFS
244    250    257
```

cumplirá el criterio 1 y 2 pero no 3, mientras

La secuencia 176-191 (SEQ ID No 2) de la proteína TLR9 madura en código de aminoácidos de 1 letra:

```
LTHL SLKYNNLTVV PR
176 180      191
```

y

La secuencia 216-240 de la proteína TLR9 madura (SEQ ID No 3) en código de aminoácidos de 1 letra:

```
ANLT ALRVLDVGGN CRRCDHAPNF C
216 220      230      240
```



cumplirán los tres criterios y se prefieren así para usarse en esta invención.

El proceso para producir la molécula o complejo molecular se lleva a cabo según métodos conocidos, por ejemplo, usando técnicas de clonación recombinante o por entrecruzamiento químico.

Un producto como se describe en esta invención puede producirse de la manera siguiente:

- 5 Los VH y VL obtenidos del anticuerpo anti-CD32 se fusionan con CH1 y CL respectivamente. El CL se ha preparado previamente por ingeniería usando tecnología SMID (PCT/EP2006/050059) y seleccionado usando exposición en fago para unirse a TLR9 como se describe más adelante. CH1 se fusiona en su extremo C terminal con una secuencia que codifica los epítomos de célula T seleccionados. Estos dos genes que codifican proteína de fusión se clonan en un vector de expresión que permite la expresión de dos genes independientes (o en dos vectores de expresión independientes) y se co-expresan en células bacterianas, de levaduras o animales o cualquier otro sistema de expresión adecuado. Así, se produce un Fab con las características deseadas, es decir, unión a CD32, unión a TLR9 y que porta los epítomos de célula T relevantes.
- 10

Ejemplos alternativos aplicando tecnología SMID:

- 15 • Se obtiene un scFv frente a TLR9 a partir de una biblioteca de exposición en fago o a partir de un hibridoma existente, y se obtiene una molécula de unión a CD32 a partir de un CH2-CH4 o CH3-CH4 o CH1-CH4 o biblioteca de dominios pequeños mutados de inmunoglobulina. Estas dos secuencias codificadoras se ligan entre sí y se une una secuencia que codifica epítomos de célula T. La proteína de fusión se expresa en células bacterianas, de levadura o animales o cualquier otro sistema de expresión adecuado
- 20 • Alternativamente, se intercambia la especificidad para TLR9 y la especificidad para CD32: Se obtiene un scFv frente a CD32 a partir, por ejemplo, de una biblioteca de exposición en fago o a partir de un hibridoma existente, y se obtiene una molécula de unión a TLR9 a partir de un CH2-CH4 o CH3-CH4 o CH1-CH4 o biblioteca de dominios pequeños mutados de inmunoglobulina. Estas dos secuencias codificadoras se ligan entre sí y se une una secuencia que codifica epítomos de célula T. La proteína de fusión se expresa en células bacterianas, de levadura o animales o cualquier otro sistema de expresión adecuado
- 25 • VH y VL de un anticuerpo anti-TLR9 se fusionan con CH1 y CL respectivamente. El CL se ha preparado previamente por ingeniería y seleccionado usando exposición en fago para unirse a CD32 (SMID). CH1 se fusiona en su extremo C terminal con una secuencia que codifica los epítomos de célula T. Estos dos genes que codifican proteína de fusión se clonan en un vector de expresión que permite la expresión de dos genes independientes (o en dos vectores de expresión independientes) y se co-expresan en células bacterianas, de levaduras o animales o cualquier otro sistema de expresión adecuado. (de nuevo, anti-TLR9 y anti-CD32 pueden intercambiarse. CH1 y CL también pueden intercambiarse)
- 30
- 35 • Los genes de cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-TLR9 se toman como un conjunto. En el gen de cadena pesada, la región CH2 (o CH1 o CH3 o CH4) se reemplaza por una región CH2 (o CH1 o CH3 o CH4 o CL o VH o VL) que se ha preparado previamente por ingeniería y seleccionado usando exposición en fago para unirse a CD32 (dominio pequeño mutado de inmunoglobulina). CH1, CH2, CH3 o CH4 se fusiona en su extremo C terminal con una secuencia que codifica los epítomos de célula T. Estos dos genes se clonan, de nuevo, en vectores de expresión y se expresan en células animales.
- 40 • 2 dominios pequeños mutados de inmunoglobulina, uno específico para TLR9, el otro específico para CD32, se fusionan y combinan con epítomos de célula T
- 1 dominio pequeño mutado de inmunoglobulina con 2 especificidades diferentes (TLR9 y CD32) se combina con epítomos de célula T

#### Antígenos y epítomos

Los antígenos que forman parte de la molécula o complejo molecular según la invención pueden ser alérgenos completos, alérgenos desnaturalizados o cualesquiera antígenos que se tratan de cualquier forma posible para prevenir la unión a IgE. Dicho tratamiento puede consistir en proteger los epítomos de la proteína antigénica usando anticuerpos IgM, IgD, IgA o IgG de alta afinidad dirigidos a los mismos epítomos que los anticuerpos IgE del paciente como describe Leroy et al [20]. Dichos anticuerpos también pueden unirse cerca de los epítomos específicos IgE previniendo así la unión de los anticuerpos IgE por impedimento estérico.

45

Los alérgenos se definen generalmente como antígenos a los que responden pacientes atópicos con respuestas de anticuerpo IgE dando lugar posteriormente a reacciones alérgicas. Los antígenos usados en la molécula o el complejo

50

5 molecular de la invención pueden ser alérgenos medioambientales (por ejemplo, ácaro del polvo doméstico, polen de abedul, polen de hierba, antígenos de gato, antígenos de cucaracha) o alérgenos alimentarios (por ejemplo, leche de vaca, cacahuete, gamba, soja) o una combinación de ambos. Los antígenos no relevantes tales como HSA también pueden formar parte de la molécula o complejo molecular según la invención. El antígeno puede ser un alérgeno completo, ejemplarmente un alérgeno frente al que son alérgicos los pacientes con dermatitis atópica, asma alérgico, rinitis alérgica o conjuntivitis alérgica. Preferiblemente, el alérgeno usado en la molécula o complejo molecular según la invención no se une a IgE del paciente que necesita tratamiento.

10 Los antígenos y/o epítomos usados en la invención pueden ser de fuentes naturales o pueden producirse por tecnología recombinante o pueden producirse sintéticamente. Los antígenos y/o epítomos de la invención pueden contener estructuras de ligando que facilitan la incorporación de antígenos y/o epítomos en complejos moleculares de la invención a través de interacciones ligando/receptor o unión de anticuerpo. Los antígenos y/o epítomos de la invención pueden contener grupos químicos que facilitan la unión covalente de los antígenos y/o epítomos a las estructuras de unión de CD32 y/o TLR9 de la molécula de la invención.

15 En una realización de la invención, los antígenos y epítomos de la molécula o complejo molecular de la invención pueden unirse covalentemente a la estructura de unión de CD32 y/o a la estructura de unión de TLR9.

20 En una realización, los antígenos y/o epítomos también pueden unirse por una interacción ligando/receptor tal como biotina y avidina a la molécula o complejo molecular de la invención. Por ejemplo, los antígenos o epítomos que se van a usar en la molécula de la invención pueden producirse con biotina o un mimético de biotina unido a ella. La estructura de unión de CD32 y/o la estructura de unión de TLR9 puede producirse con avidina u otro ligando específico de biotina unido a ella. Después de mezclar estas moléculas con los diferentes grupos, se forma un complejo molecular estable según la invención. Alternativamente, puede usarse una unión anticuerpo/antígeno para formar un complejo molecular de la invención. En estas realizaciones se prefieren las interacciones de alta afinidad (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxigenina de alta afinidad y antígenos y/o epítomos marcados con digoxigenina).

25 En una realización de la invención, los antígenos y/o epítomos se fusionan genéticamente a la estructura de unión de CD32 y/o a la estructura de unión de TLR9.

Si la molécula de la invención es una proteína de fusión, el antígeno se produce preferiblemente a partir de al menos una subsecuencia de ADN que contiene un epítomo de célula T de un alérgeno. Los epítomos de célula T pueden ser alternativamente de uno o más alérgenos relacionados y/o no relacionados.

30 Preferiblemente, los epítomos de célula T comprenden una nueva proteína, que no es tal como una proteína que existe naturalmente y por lo tanto no es reconocida por anticuerpos IgE o IgG existentes en el paciente. Por lo tanto, en lugar de seleccionar epítomos de célula T cortos que son cortados y fusionados entre sí de nuevo en un orden diferente, se podría también seleccionar una cadena mayor de epítomos de célula T (> 28 AA) que están en su orden natural pero que se han seleccionado previamente para no unirse a IgE específica de alérgeno [21].

35 En principio, todos los antígenos conocidos pueden usarse para incorporarse en la molécula o complejo molecular de la invención a la que responden los pacientes alérgicos con reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE. Los alérgenos medioambientales más comunes en los países desarrollados son: ácaro de polvo doméstico, polen de abedul, polen de hierba, gato y cucaracha. Cada uno de estos alérgenos tiene uno o más "alérgenos principales" (por ejemplo, ácaro de polvo doméstico: alérgeno principal = Der P1; Der F1, polen de abedul: alérgeno principal = Bet V1). Sin embargo, los antígenos completos, aunque es posible, no son necesarios, porque la molécula o complejo molecular sólo debe inducir respuestas de célula T y las células T responden a péptidos pequeños (con una longitud de aproximadamente 12-28 aminoácidos) presentados en moléculas MHC de Clase II. La selección de epítomos de célula T debería diseñarse de manera tal que se garantice la expresión en moléculas HLA de clase II de posiblemente todos los pacientes. Algunas moléculas HLA de clase II se expresan más frecuentemente que otras. Un buen ejemplo de dicha molécula HLA de clase II con expresión amplia es HLA DPw4, que se expresa en aproximadamente 78% de la población caucásica [22]. Por lo tanto, una selección de epítomos de célula T podría incluirse en la molécula o complejo molecular para cada alérgeno, reduciendo así el tamaño y peso molecular del complejo. Se prefiere que estén presentes epítomos superpuestos con reacción cruzada entre alérgenos de diferentes organismos genéticamente relacionados, tales como Dermatophagoides pteronyssinus (Der P1) y Dermatophagoides farinae (Der F1).

50 Para permitir el procesamiento correcto del antígeno, debe incluirse en la molécula o complejo molecular ADN que codifica cadenas ligeramente más largas que el epítomo de célula T actual y/o los epítomos pueden separarse entre sí introduciendo cadenas de ADN espaciador que contienen preferiblemente epítomos (hidrofóbicos) reconocidos por enzimas de procesamiento de proteínas principales en las células presentadoras de antígeno tales como endopeptidasa específica de asparagina (AEP) o catepsina S, catepsina D o catepsina L [23].

5 Para la fusión con genes que codifican las estructuras de unión específicas para TLR9 y CD32, se usan preferiblemente secuencias cortas de ADN de alergen principales tales como alergen principal I de ácaro del polvo doméstico (Der P1, Der F1), alergen principal II de ácaro del polvo doméstico (Der P2, Der F2) o alergen de polen de abedul (Bet V1). Estas secuencias cortas de ADN contienen el código genético para uno o más epítopos de célula T, que después del procesamiento, aparecen en la superficie de las células presentadoras de antígeno y por lo tanto inducen una respuesta inmune en las células T de respuesta específicas de alergen. No sólo pueden usarse los epítopos de célula T de Der P1 y Der P2 sino también Der P3, Der P4, Der P5, Der P6, Der P7 etc. y Der F3, Der F4, Der F5, Der F6, Der F7 etc en una molécula o complejo molecular de la invención. Los epítopos de célula T de estos alergen pueden seleccionarse por mapeo de epítopos clásico usando clones de células T [24] o usando software moderno de predicción de HLA Clase II tal como el programa Tepitope [25; 26]. Para la molécula o complejo molecular, que puede formularse como vacuna, no es necesario combinar epítopos de célula T sólo de una única fuente de alergen; al contrario, se prefiere incluir más epítopos de célula T obtenidos de diferentes fuentes de alergen producidos por una o muchas especies diferentes, por ejemplo, una combinación de alergen de ácaros del polvo doméstico y de alergen de polen de hierba, gatos y/o polen de abedul.

15 Como un ejemplo para Der P1, la mayoría de los epítopos de célula T puede encontrarse en las secuencias siguientes 101-143 de la proteína madura en el código de aminoácidos de 1 letra (SEQ ID No 4):

**QSCRRPNAQ RFGISNYCQI YPPNANKIRE ALAQPQRYCR HYWT**  
 101            110            120            130            140 143

Especialmente, la secuencia de aminoácidos 101-131 contiene al menos 3 epítopos de célula T<sup>24</sup>, que se unen a varias moléculas HLA clase II en el código de aminoácidos de 1 letra (SEQ ID No 5):

**QSCRRPNAQ RFGISNYCQI YPPNANKIRE AL**  
 101            110            120            131

20 La secuencia 107-119 contiene un epítipo de célula T importante que se une a HLA DPw4 así como HLA DPw5<sup>24</sup>. Estas moléculas HLA Clase II son expresadas por la mayor parte de la población. El epítipo en el código de aminoácidos de 1 letra (SEQ ID No 6):

**NAQ RFGISNYCQI**  
 107 110            119

25 Otros epítopos de célula T importantes que además se comparten entre Der P1 y Der F1 se encuentran en las secuencias 20-44 y 203-226 de la proteína madura en el código de aminoácidos de 1 letra:

**RTVTPIRMQG GCGSCWAFSG VAATE** (SEQ ID No 7)  
 20            30            40 44

y

**YDGRTHI QRDNGYQPNY HAVNIVGY** (SEQ ID No 8)  
 203            210            220            227

30 Los ejemplos de epítopos de célula T compartidos entre Der P2 y Der F2 se encuentran en la secuencia 26-44, 89-107 y 102-123

**PCII HRGKPFQLEA VFEAN** (SEQ ID No 9)  
 26 30            40 44

**K YTNVVPKIAP KSENVVVT** (SEQ ID No 10)  
 89            100            107

**ENVVVTVK VMGDDGVLAC AIAT (SEQ ID No 11)**

102 110 123 127

A partir de los epítomos de célula T mencionados anteriormente de Der P1/F1 y Der P2/F2, se pueden diseñar varias moléculas o complejos moleculares funcionales, por ejemplo:

Tomando a partir de Der P1 las secuencias siguientes:

**QSCRPNQAQ RFGISNYCQI YPP (Secuencia A, SEQ ID No 12)**

101 110 120

**CQI YPPNANKIRE AL (Secuencia B, SEQ ID No 13)**

117 120 130

**IRE ALAQPQRYCR HYWT (Secuencia C, SEQ ID No 14)**

127 130 140 143

**RTVTPIRMQG GCGSCWAFSG VAATE (Secuencia D, SEQ ID No 7)**

20 30 40 44

**YDGRTHI QRDNGYQPNY HAVNIVGY (Secuencia E, SEQ ID No 8)**

203 210 220 227

10 Y a partir de Der P2

**PCII HRGKPFQLEA VFEAN (Secuencia F, SEQ ID No 9)**

26 30 40 44

**K YTNVNPKIAP KSENVVVT (Secuencia G, SEQ ID No 10)**

89 100 107

**ENVVVTVK VMGDDGVLAC AIAT (Secuencia H, SEQ ID No 11)**

102 110 120 123

15 Se puede diseñar un ADNc con el orden B, A, E, H, G, C, F, D o H, A, D, C, F, G, E, B, pero será posible cualquier combinación posible de las secuencias seleccionadas. El orden preferido de los epítomos se determinará principalmente tomando como base la eficacia de la expresión de la molécula recombinante completa. También se permiten duplicaciones de secuencias, por ejemplo, B, B, A, E, E, G, C, G, F, A, D etc. La parte del epítomo de célula T puede contener también por supuesto los códigos genéticos para péptidos más cortos o péptidos más largos para más y para menos péptidos, siempre que se incluyan uno o más epítomos de célula T de uno o más diferentes alérgenos/antígenos.

20 Los epítomos de otros alérgenos tales como Bet V1, Lol P1, Fel d1 con características similares se preferirán para la inclusión en la molécula o complejo molecular según la invención.

25 La invención también se refiere a un método para tratar enfermedades, especialmente alergias, que comprende administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de una molécula o complejo molecular según la invención para uso como un producto farmacéutico, especialmente como un agente frente a alergias.

30 La molécula o complejo molecular puede mezclarse con diluyentes y vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros excipientes y administrarse parenteralmente intravenosamente o entéricamente, por ejemplo, intramuscularmente y subcutáneamente. Las concentraciones de la molécula o complejo molecular variarán, por supuesto, dependiendo, entre otros, del compuesto empleado, del tratamiento deseado y de la naturaleza de la forma.

5 Para diferentes indicaciones, las dosis apropiadas variarán, por supuesto, dependiendo, por ejemplo, de la molécula o complejo molecular usado, del huésped, del modo de aplicación y de la indicación pretendida. Sin embargo, en general, se indica que se obtienen resultados satisfactorios con 1 a 4 vacunaciones en 1-2 años, pero si es necesario puede hacerse una vacunación adicional repetida. Se indica que para estos tratamientos, la molécula o complejo molecular de la invención puede administrarse en 2-4 dosis y con un esquema de aplicación similar al empleado convencionalmente.

Se refiere además a una molécula o complejo molecular según la invención para uso como un producto farmacéutico, particularmente para uso en el tratamiento y profilaxis de las alergias.

10 La composición farmacéutica preparada según la presente invención para uso como formulación de vacuna puede (pero no tiene por qué) contener al menos un adyuvante usado comúnmente en la formulación de vacunas además de la molécula o complejo molecular. Es posible aumentar la respuesta inmune por dichos adyuvantes. Como ejemplos de adyuvantes, sin embargo sin estar limitados a éstos, pueden listarse los siguientes: hidróxido de aluminio (gel Alu), QS-21, Enhanzina, derivados de lipopolisacáridos, Bacillus Calmette Guerin (BCG), preparaciones de liposomas, formulaciones con antígenos adicionales frente a los que el sistema inmune ya ha producido una respuesta inmune fuerte, tal como por ejemplo toxoide del tétanos, exotoxina de Pseudomonas, o constituyentes de los virus influenza, 15 opcionalmente en una preparación de liposoma, adyuvantes biológicos tales como Factor Estimulante de Macrófagos Granulocitos (GM-CSF), interleuquina 2 (IL-2) o interferón gamma (IFN $\gamma$ ). El hidróxido de aluminio es el adyuvante de vacuna más preferido.

Resumen de un modo de acción posible de la proteína de fusión según la invención:

20 La proteína de fusión según la presente invención, puede formularse en cualquiera de las formulaciones farmacéuticas aceptables disponibles, pero se formula preferiblemente como una vacuna. La parte de unión a aCD32 de la proteína de fusión según la invención selecciona las células relevantes. El tomar como diana CD32 en estas células inducirá activamente la internalización del receptor más la proteína de fusión unida y haciendo esto se facilita la interacción de la parte de unión a TLR9 de la proteína de fusión con el TLR9, que se expresa en el citoplasma de las células presentadoras de antígeno relevantes [10; 11].

25 Como consecuencia de la internalización mediada por CD32, el procesamiento y presentación posteriores de los epítomos de célula T seleccionados en las moléculas MHC Clase II, combinado con la activación específica de TLR9 citoplásmico en las células presentadoras de antígeno, las células T específicas de alérgeno se (re-)programarán para convertirse en células de memoria Th1. Estas células de memoria Th1 específicas de alérgeno inducirán posteriormente la producción de IgG específica de alérgeno cuando encuentren los mismos epítomos derivados de los alérgenos naturales presentados por células B específicas de alérgeno expuestas de forma natural. Estas células Th1 son así 30 necesarias para reequilibrar el sistema inmune de la producción de anticuerpo dominada por IgE a IgG.

#### Ejemplos:

Los ejemplos siguientes explicarán la presente invención con más detalle, sin embargo, sin restringirla.

#### Ejemplo 1:

35 Reconocimiento y selección de la biblioteca CL humano-fago sobre un péptido TLR-9, por ejemplo, la secuencia 216-240 de la proteína TLR9 madura (SEQ ID No 3) en el código de aminoácidos de 1 letra

```
ANLT ALRVLDVGGN CRRCDHAPNP C
216 220      230      240
```

40 Se realizarán 3 rondas de reconocimiento y selección según protocolos estándar. Brevemente, puede aplicarse el método siguiente. Se recubren placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) con el péptido (sintético) que representa parte de la secuencia del TLR-9. Para el recubrimiento de los péptidos en los pocillos, se añaden 200  $\mu$ l de la disolución siguiente por pocillo: 0,1M tampón Na-carbonato, pH 9,6, con las concentraciones siguientes del péptido disuelto:

1ª ronda de reconocimiento y selección: 1 mg/ml péptido TLR-9

2ª ronda de reconocimiento y selección: 500  $\mu$ g/ml péptido TLR-9

3ª ronda de reconocimiento y selección: 100  $\mu$ g/ml péptido TLR-9

45 La incubación es durante 1 hora a 37°C, seguido de bloqueo con 2% leche seca (M-PBS) con 200  $\mu$ l por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se deja que la biblioteca de exposición en superficie de fago reaccione con el péptido

unido añadiendo 100  $\mu$ l de suspensión de fago y 100  $\mu$ l de 4% leche seca (M-PBS), seguido de incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente. Las partículas de fago no unidas se eliminan por lavado como sigue. Después de la 1ª ronda de reconocimiento y selección: 10 x 300  $\mu$ l T-PBS, 5 x 300  $\mu$ l PBS; después de la 2ª ronda de reconocimiento y selección: 15 x 300  $\mu$ l T-PBS, 10 x 300  $\mu$ l PBS; después de la 3ª ronda de reconocimiento y selección: 20 x 300  $\mu$ l T-PBS, 20 x 300  $\mu$ l PBS. La elución de las partículas de fago unidas se realiza añadiendo 200  $\mu$ l por pocillo de 0,1 M glicina, pH 2,2, e incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión de fagos se neutraliza por adición de 60  $\mu$ l 2M Tris-Base, seguido de infección en células TG1 de E. coli por mezclado de 10 ml de cultivo en crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias infectadas se plaquean en medio TYE con 1% glucosa y 100  $\mu$ g/ml Ampicilina, y se incuban a 30°C toda la noche.

### Ejemplo 2:

Clonación de los clones seleccionados de mutantes CL humanos seleccionados frente a TLR-9 para expresión soluble

El ADN de fagémido del fago seleccionado a través de las 3 rondas de reconocimiento y selección se aísla con una midiprep. El ADN que codifica las regiones CL mutadas se amplifica por lotes por PCR y se clona NcoI-NotI en el vector pNOTBAD/Myc-His, que es el vector de expresión de E. coli pBAD/Myc-His (Invitrogen) con un sitio de restricción NotI insertado para facilitar la clonación. Las construcciones ligadas se transforman en células LMG194 de E. coli (Invitrogen) con electroporación, y se crecen a 30°C en medio TYE con 1% glucosa y ampicilina toda la noche. Los clones seleccionados se inoculan en 200  $\mu$ l de medio 2xYT con ampicilina, se crecen toda la noche a 30°C y se inducen añadiendo L-arabinosa hasta una concentración final de 0,1%. Después de la expresión a 16°C toda la noche, las células se recogen por centrifugación y se tratan con 100  $\mu$ l de tampón Na-borato, pH 8,0 a 4°C toda la noche para la preparación de extractos periplásmicos. Se usaron 50  $\mu$ l de extractos periplásmicos en ELISA (véase más adelante).

### Ejemplo 3: ELISA de mutantes CL humanos seleccionados frente a TLR-9

Se ensayan clones seleccionados para unión específica al péptido TLR-9 por ELISA.

Recubrimiento: Placa de microtitulación (NUNC, Maxisorp), 100  $\mu$ l por pocillo, 20  $\mu$ g péptido TLR-9/ml 0,1 M tampón Na-carbonato, pH 9,6, 1h a 37°C

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l PBS

Bloqueo: 1% BSA-PBS, 1h a RT

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l PBS

Unión extracto periplásmico: 50  $\mu$ l extracto periplásmico

50  $\mu$ l 2% BSA-PBS, a temperatura ambiente toda la noche

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l PBS

1<sup>er</sup> anticuerpo: anti-His4 (Qiagen), 1:1.000 en 1% BSA-PBS, 90 min a RT, 100  $\mu$ l por pocillo

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l PBS

2<sup>o</sup> anticuerpo: antiratón de cabra\*HRP (SIGMA), 1:1.000 en 1% BSA-PBS, 90 min a RT, 100  $\mu$ l por pocillo

35 Lavado: 3 x 200  $\mu$ l PBS

Detección: 3 mg/ml OPD en tampón Na-citrato/fosfato, pH 4,5, 0,4  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Parada: 100 ml 3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Lectura de absorbancia: 492/620 nm

40 Los clones que proporcionan una señal alta en este primer ELISA preliminar se cultivan en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aíslan en 1/20 del volumen de cultivo como se ha descrito anteriormente y se ensayan con ELISA (como se ha descrito anteriormente) para confirmación.

**Ejemplo 4:** Clonación de los dominios variables anti-CD32 a partir de HB-217

El ARNm se aísla de la línea celular HB-217 (ATCC, anticuerpo antiCD32 IV.3) y se usa para preparar ADNc según los protocolos rutinarios establecidos. El ADNc se usa adicionalmente como un molde para amplificar las regiones de los genes que codifican la cadena ligera y pesada del fragmento Fab del anticuerpo IV.3 respectivamente. Los cebadores de PCR aguas arriba, que ceban desde del extremo 5' de las regiones variables, usados para esta amplificación, se obtienen de las secuencias publicadas de regiones variables de ratón (IMGT, el sistema de información internacional ImMunoGeneTics® <http://imgt.cines.fr>). Como cebadores aguas arriba se usan cebadores degenerados y/o mezclas de diferentes cebadores. Los cebadores aguas abajo se diseñan de manera que ceban desde el extremo 3' de los dominios CL o CH1 respectivamente.

- 10 En una etapa siguiente, el dominio CL del anticuerpo IV.3 se retira y se reemplaza por un dominio CL seleccionado modificado por tecnología SMID que tiene afinidad de unión para TLR9, y que se selecciona como se ha descrito anteriormente en los ejemplos 1-3. Para este reemplazo, puede usarse PCR superpuesta según protocolos estándar. Alternativamente, para unir VL al CL modificado por SMID, puede usarse un único sitio de corte de restricción que bien es natural en la secuencia o se introduce artificialmente por mutagénesis dirigida a sitio (como una mutación silenciosa que no cambia la secuencia de aminoácidos). Por ejemplo, puede generarse un sitio BstAPI en la región bisagra entre VL y CL cambiando la secuencia de:

K R A D A A P T V S I F (SEQ ID No 65)  
AAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC (SEQ ID No 66)

a

K R A D A A P T V S I F (SEQ ID No 65)  
AAACGGGCAGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC (SEQ ID No 15)

- 20 el sitio BstAPI creado de nuevas está resaltado en la secuencia anterior. La nueva secuencia se introduce en las regiones codificadoras amplificando la parte VL y la parte CL respectivamente con cebadores de PCR diseñados de manera apropiada, cortando los productos de PCR con BstAPI, ligándolos y amplificando el producto completo de ligación resultante con cebadores de PCR como se usaron inicialmente para amplificar la parte de cadena ligera original del fragmento Fab.
- 25 Para la expresión del fragmento Fab modificado, los genes que codifican las cadenas pesada y ligera se clonan posteriormente en vectores de expresión apropiados, o conjuntamente en un vector de expresión que permite la expresión de los dos genes independientes. Como un sistema de expresión, pueden usarse células bacterianas, de levadura, animales o cualquier otro sistema de expresión adecuado. Para este ejemplo aquí, se mostrará la expresión de un vector en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*:
- 30 La parte de cadena ligera del fragmento de PCR modificado se clona EcoRI/KpnI en el vector de expresión de *Pichia pastoris* pPICZalphaA en el marco de lectura correcto de manera que se fusiona funcionalmente con la secuencia señal de secreción del factor alfa proporcionada por el vector. De manera similar, la parte de cadena pesada del fragmento Fab se clona en pPICZalphaA. Con el fin de preparar los insertos para este procedimiento de clonación, se usan cebadores de PCR diseñados de manera apropiada que unen los sitios de restricción necesarios a los genes. En los extremos 3' de ambas regiones codificadoras, tiene que insertarse un codón de parada y proporcionado también por los cebadores de PCR. El casete de expresión de la cadena ligera se corta del vector con las enzimas de restricción BgIII y BamHI y los extremos del ADN se hacen romos por tratamiento con fragmento Klenow de ADN polimerasa. El vector que contiene la parte de cadena pesada del Fab insertada se abre por una digestión parcial con la enzima de restricción BgIII, el ADN se hace romo por tratamiento con fragmento Klenow de ADN polimerasa y se inserta el casete de expresión que codifica la parte de cadena ligera. La digestión parcial del vector de cadena pesada es necesaria ya que el gen de cadena pesada insertado contiene un sitio BgIII. Para el cribado de la construcción final, debe tenerse cuidado de que este sitio BgIII interno haya permanecido intacto. La construcción final tiene un sitio PmeI que se usa para linearizar la construcción antes de la transformación en *Pichia pastoris*. Esta linearización es ventajosa para la integración eficaz del vector de expresión en el genoma del huésped por recombinación homóloga. *Pichia pastoris* se transforma con el vector de expresión linearizado usando electroporación, los clones transformados se seleccionan con el antibiótico Zeocina para el que el vector confiere resistencia y los sobrenadantes de los clones tomados al azar se criban para expresión de la construcción Fab después de inducir la expresión con metanol. Para el cribado, por ejemplo, puede usarse un ELISA específico de Fab. La producción de la proteína recombinante se consigue cultivando el clon de *Pichia* transformado seleccionado en una escala mayor, preferiblemente en matraces agitados o en un fermentador, induciendo

la expresión por adición de metanol y purificando la proteína recombinante por un método cromatográfico. Para estas últimas etapas, se usan protocolos rutinarios.

**Ejemplo 5:** Clonación de los epítomos de célula T derivados de DerP11/F1 y Der P2/F2:

5 La combinación de los epítomos de célula T seleccionados formados por las secuencias B, A, E, H, G, C, F, D es como sigue (SEQ ID No 16):

CQIYPPNANKIREAL QSCRRPNAQRFGISNYCQIYPP YDGRITIIQRDNGYQPNYHAVNI  
 (Seq. B) (Seq. A) (Seq. E)  
VGY ENVVVTVKVMGDDGVLACAIAT KYTWNVPKIAPKSENVVVT IREALAQPQRYCRH  
 (Seq. H) (Seq. G) (Seq. C)  
YWT PCIIHRGKPFQLEAVFEAN RTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATE  
 (Seq. F) (Seq. D)

10 Con el fin de construir un gen sintético que codifica esta secuencia de aminoácidos, puede usarse traducción inversa in silico. Existen programas informáticos disponibles para este propósito, tales como por ejemplo, DNAWORKS (<http://molbio.info.nih.gov/dnaworks/>). Con el fin de clonar el gen sintético que codifica los epítomos en marco con el gen que codifica la parte de cadena pesada del marco, se seleccionan dos sitios de restricción que no cortan en esta región codificadora ni en el vector pPICZalphaA. Por ejemplo, para este propósito pueden usarse AccIII y SpeI. Estos dos sitios de restricción se unen al gen que codifica la parte de cadena pesada del Fab usando cebadores de PCR diseñados de manera apropiada para el procedimiento de clonación como se ha descrito anteriormente. Además, debe tenerse cuidado de no tener un codón de parada al final de la región codificadora de la parte de cadena pesada del Fab, ya que  
 15 el codón de parada será proporcionado en el extremo 3' del gen sintético que codifica los epítomos. De nuevo, esta construcción con los dos sitios de restricción adicionales localizados en su extremo 3' se clona EcoRI/KpnI en el vector de expresión de *Pichia pastoris* pPICZalphaA. La construcción se abre con las enzimas de restricción AccIII y SpeI y se inserta el inserto que codifica los epítomos. Este inserto se genera como sigue:

La secuencia de aminoácidos elegida

CQIYPPNANKIREAL QSCRRPNAQRFGISNYCQIYPP YDGRITIIQRDNGYQPNYHAVNI  
IVGY ENVVVTVKVMGDDGVLACAIAT KYTWNVPKIAPKSENVVVT IREALAQPQRYC  
RHYWT PCIIHRGKPFQLEAVFEAN RTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATE (SEQ ID No  
 20 16)

junto con los sitios de restricción elegidos, en este ejemplo AccIII en el extremo 5' y SpeI en el extremo 3', se usan como entrada en el programa informático disponible públicamente DNAWORKS. Además, se añade un codón de parada entre el final de la secuencia del epítomo y el sitio SpeI.

25 Los parámetros que usa el programa para diseñar los oligonucleótidos están a la izquierda de los valores estándar propuestos y se instruye al programa para evitar las secuencias de los sitios de restricción que son necesarias para las etapas de clonación y transformación, tales como AccIII, SpeI y PmeI.

AccIII: tccgga

SpeI: actagt

PmeI: gtttaaac

30 DNAWORKS genera un conjunto de oligonucleótidos que se superponen y que representan ambas cadenas de las regiones codificadoras deseadas.

Por ejemplo, se genera el conjunto siguiente de 24 oligonucleótidos, a partir del que se genera el gen sintético que codifica los epítomos de alérgeno:



|    |   |    |                |
|----|---|----|----------------|
| 1  | TCCGGATGCCAAATTTACCCGCCAAACG                | 28 | (SEQ ID No 17) |
| 2  | AGCCTCTCTGATCTTGTTTCGCGTTTTGGCGGGTAAATTTGG  | 40 | (SEQ ID No 18) |
| 3  | CGAACAAAGATCAGAGAGGCTTTGCAATCTTGCAGGAGGCC   | 40 | (SEQ ID No 19) |
| 4  | TATGCCGAATCTCTGCGCATTGGGCCTCCTGCAAGATTGC    | 40 | (SEQ ID No 20) |
| 5  | GCGCAGAGATTTCGGCATATCCAATACTGCCAGATCTACC    | 40 | (SEQ ID No 21) |
| 6  | GTACGCCCATCGTATGGGGGGTAGATCTGGCAGTAGTTGG    | 40 | (SEQ ID No 22) |
| 7  | CCCATACGATGGGCGTACAATCATAACAGCGTGATAACGGC   | 40 | (SEQ ID No 23) |
| 8  | GCGTGGTAGTTAGGCTGATAGCCGTTATCACGCTGTATGA    | 40 | (SEQ ID No 24) |
| 9  | TATCAGCCTAACTACCACGCCGTGAACATCGTCGGCTACG    | 40 | (SEQ ID No 25) |
| 10 | TCACAGTAACCACGACATTCTCGTAGCCGACGATGTTTAC    | 40 | (SEQ ID No 26) |
| 11 | AGAATGTCGTGGTACTGTGAAGGTAATGGGCGATGACGG     | 40 | (SEQ ID No 27) |
| 12 | AGCTATGGCGCAAGCTAGAACCCCGTCATCGCCATTACC     | 40 | (SEQ ID No 28) |
| 13 | TCTAGCTTGCGCCATAGCTACCAAGTACACTTGGAACGTA    | 40 | (SEQ ID No 29) |
| 14 | TTTTCGGCGCAATTTTGGGTACGTTCCAAGTGTACTTGGT    | 40 | (SEQ ID No 30) |
| 15 | CCCAAATTTGCGCCGAAAAGTGAAAACGTCGTAGTGACCA    | 40 | (SEQ ID No 31) |
| 16 | TGAGCCAATGCCTCCCTTATGGTCACTACGACGTTTTTAC    | 40 | (SEQ ID No 32) |
| 17 | AGGGAGGCATTGGCTCAACCTCAAAGATACTGCAGACACT    | 40 | (SEQ ID No 33) |
| 18 | TTATGCAGGGCGTCCAGTAGTGTCTGCAGTATCTTTGAGG    | 40 | (SEQ ID No 34) |
| 19 | ACTGGACGCCCTGCATAATCCACCGTGGTAAACCCTTTCA    | 40 | (SEQ ID No 35) |
| 20 | CTTCGAACACTGCCTCAAGTTGAAAGGGTTTACCACGGTG    | 40 | (SEQ ID No 36) |
| 21 | ACTTGAGGCAGTGTTTGAAGCTAACAGGACGGTAACGCCA    | 40 | (SEQ ID No 37) |
| 22 | CCGCACCCACCTTGCATACGAATTGGCGTTACCGTCCTGT    | 40 | (SEQ ID No 38) |
| 23 | TGCAAGGTGGGTGCGGGTCTTGTGGGCTTTTTCTGGTGT     | 40 | (SEQ ID No 39) |
| 24 | ACTAGTTTATTTCAGTAGCAGCCACACCAGAAAAAGCCCAACA | 42 | (SEQ ID No 40) |

5 Estos 24 oligonucleótidos se disuelven, se mezclan entre sí, se hierven durante varios minutos y se enfrían hasta temperatura ambiente lentamente para permitir la hibridación. En etapas posteriores de PCR, usando grandes cantidades de los dos cebadores flanqueantes (cebadores #1 y #24), el gen hibridado se amplifica, el producto de PCR se escinde con las enzimas de restricción elegidas (AccIII y SpeI en este ejemplo) y se clonan en el vector de expresión como se ha descrito anteriormente, que contiene como un inserto el gen que codifica la parte de cadena pesada del Fab modificado. La preparación del vector de expresión final que contiene ambas cadenas, la transformación de *Pichia pastoris*, la selección de los clones y el cribado para clones productores se hace como se ha descrito anteriormente. La expresión y purificación de la proteína recombinante se realiza según protocolos estándar.

### Ejemplo 6

Fusión de VH y VL del anticuerpo anti-CD32 IV.3 fusión con dominios CH3 anti-TLR9 (SMIDS)

10 Todo el modelado molecular se hizo con Swiss-PdbViewer 3.7 (<http://swissmodel.expasy.org/spdbv/>)

Como un modelo de homología para un fragmento Fab de ratón, se usa el archivo de estructura 2BRR.pdb del Banco de Datos de Proteínas (www.pdb.org) y se usa 1OQO.pdb como una fuente para la estructura de un dominio CH3 de IgG humano.

5 Los modelos moleculares de VH y VL del anticuerpo IV.3 se preparan con el "modo de primera aproximación" de Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) usando las secuencias de aminoácidos de VH y VL respectivamente.

Usando la función de "ajuste mágico" del Swiss-PdbViewer, se ajustan dos copias de la estructura del dominio CH3 de 1OQO.pdb en el dominio CH1 y el CL respectivamente de 2BRR.pdb. Posteriormente, los modelos moleculares de VH y VL de IV.3 respectivamente se ajustan (de nuevo usando "ajuste mágico") en VH y VL de 2BRR.pdb.

10 Para la construcción de una proteína semejante a Fab en la que CH1 y CL se reemplazan ambos por un dominio CH3, es necesario decidir en qué punto la secuencia de VH debería terminar y conectarse con la secuencia de CH3, y en qué punto la secuencia de VL debería terminar y conectarse con la secuencia de CH3. Para ambas construcciones, se elige un punto en el que la cadena principal de las estructuras superpuestas y modelos (véase anteriormente) muestra una superposición óptima.

15 Para la cadena ligera, se encontró que la secuencia hasta Ala114 (numeración de 2BRR.pdb) se usará y se conectará a Pro343 (numeración de 1OQO.pdb) del dominio CH3. El punto de conexión entre estas dos secuencias se lee por lo tanto como sigue (la parte VL está subrayada):

**--Lys112 – Arg113-Ala114-Pro343-Arg344-Glu345 --**

20 Con el fin de permitir la unión de las dos secuencias codificadoras usando sitios de enzimas de restricción y ligación de ADN, la secuencia cercana al punto de conexión se cambia por una mutación silenciosa para introducir un único sitio XhoI (ctcgag, subrayado) como sigue:

**K R A P R E (SEQ ID No 41)**

**AAACGGGCTCCTCGAGAA (SEQ ID No 42)**

Para la inserción posterior de los epítomos de alérgeno, se introduce un sitio AclI (ggcgcgcc) justo antes del codón de parada de la construcción más una base extra para el mantenimiento del marco de lectura:

**ggg cgc gcc**

25 **Gly Arg Ala**

Además, para la clonación en el vector de expresión pPICZalphaA (sistema de expresión de Pichia pastoris, Invitrogen), se añade un sitio EcoRI (gaattc) en el extremo 5' (N-terminal) y un sitio KpnI (ggtacc) en el extremo 3' (C-terminal) de la construcción.

30 El dominio CH3 que se va a fusionar con VH y VL respectivamente seleccionado como parte de la construcción puede ser un dominio CH3 de IgG humano de tipo salvaje que puede servir como un control negativo o un dominio CH3 preparado previamente por ingeniería por tecnología SMID y seleccionado para unirse específicamente a TLR9. En este ejemplo aquí, la secuencia del clon A23, que se une específicamente a TLR9 y que se ha descrito en la solicitud de patente PCT/EP2006/050059 se fusiona tanto con VH como VL.

35 Por lo tanto, la secuencia completa de la proteína de fusión VL-CH3 tiene la secuencia de aminoácidos siguiente (la parte VL está subrayada), (SEQ ID No 43):

**DIVMTQAAPS VPVTPGESVS ISCRSSKSLI HTNGNTYLHW FLORPGQSPQ**  
**LLIYRMSVLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLSI SRVEAEDVGV FYCMQHLEYP**  
**LTFGAGTKLE LKRAPREPQV YTLPPSRDEL GIAQVSLTCL VKGFYPSDIA**  
**VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVLGRRWT LGNVFSCSVM**  
**HEALHNHYTQ KSLSLSPGK&**

Secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión VL-CH3 (los sitios de restricción están subrayados), (SEQ ID No 44):

```

gaattcGACA   TTGTGATGAC   CCAGGCTGCA   CCCTCTGTAC   CTGTCACTCC
TGGAGAGTCA   GTATCCATCT   CCTGCAGGTC   TAGTAAGAGT   CTCCTGCATA
CTAATGGCAA   CACTTACTTG   CATTGGTTCC   TACAGAGGCC   AGGCCAGTCT
CCTCAGCTCC   TGATATATCG   GATGTCCGTC   CTTGCCCTCAG   GAGTCCCAGA
CAGGTTCACT   GGCAGTGGGT   CAGGAACTGC   TTTCACACTG   AGCATCAGTA
GAGTGGAGGC   TGAGGATGTG   GGTGTTTTTT   ACTGTATGCA   ACATCTAGAA
TATCCGCTCA   CGTTCGGTGC   TGGGACCAAG   CTGGAAGTGA   AACGGGCTCC
TCGAGAACCA   CAGGTGTACA   CCCTGCCCCC   ATCCCGGGAC   GAGCTCGGCA
TCGCGCAAGT   CAGCCTGACC   TGCCTGGTCA   AAGGCTTCTA   TCCCAGCGAC
ATCGCCGTGG   AGTGGGAGAG   CAACGGGCAG   CCGGAGAACA   ACTACAAGAC
CACGCCTCCC   GTGCTGGACT   CCGACGGCTC   TTTCTTCTC   TACAGCAAGC
TTACCGTGT   GGGCCGCAGG   TGGACCCTGG   GGAACGTCTT   CTCATGCTCC
GTGATGCATG   AGGCTCTGCA   CAACCACTAC   ACACAGAAGA   GCCTCTCCCT
GTCTCCGGGT   AAATGAgggc   gcqccqqtac   c

```

Para la cadena pesada, se encontró que la secuencia hasta Thr123 (numeración de 2BRR.pdb) debería usarse y conectarse a Arg344 (numeración de 1OQO.pdb) del dominio CH3. El punto de conexión entre estas dos secuencias se lee por lo tanto como sigue (la parte VH está subrayada):

5 --- Ala121 – Lys122 – Thr123 – Arg344 – Glu345 – Pro346 ---

Con el fin de permitir la unión de las dos secuencias codificadoras usando sitios de enzimas de restricción y ligación de ADN, la secuencia cercana al punto de conexión se cambió por una mutación silenciosa para introducir un único sitio XhoI (ctcgag, subrayado) como sigue:

```

A K T R E P           (SEQ ID No 45)
GCCAAAACTCGAGAACCA (SEQ ID No 46)

```

10 Además, para la clonación en el vector de expresión pPICZalphaA (sistema de expresión de Pichia pastoris, Invitrogen), se añade un sitio EcoRI (gaattc) en el extremo 5' (N-terminal) y un sitio XbaI (tctaga) al extremo 3' (C-terminal) de la construcción. No se añade ningún codón de parada a esta secuencia y el sitio XbaI se pone en el marco de lectura correcto de manera que se fusiona la construcción a la etiqueta Hexa-His proporcionada por el vector para la purificación posterior de la proteína usando cromatografía de afinidad con metal inmovilizado.

15 Por lo tanto, la secuencia completa de la proteína de fusión VH-CH3 tiene la secuencia de aminoácidos siguiente (la parte VH está subrayada), (SEQ ID No 47):

```

EVQLQDSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT NYGMNWKQA PGKGLKWMGW
LNTYTGESLY PDDFKGRFAF SSETSASTAY LQINNLKNEE MATYFCARGD
YGYDDPLDYW GQGTSVTVSS AKTREPQVYT LPPSRDELGI AOVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSKL TVLGRRTWLG
NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKSL EQLISEEDLN SAVDHHHHHH&

```

Secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión VH-CH3 (los sitios de restricción están subrayados), (SEQ ID No 48):

GAATTCGAGG TTCAGCTTCA GCAGTCTGGA CCTGAGCTGA AGAAGCCTGG  
 AGAGACAGTC AAGATCTCCT GCAAGGCTTC TGGGTATACC TTCACAAACT  
 ATGGAATGAA CTGGGTGAAG CAGGCTCCAG GAAAGGGTTT AAAGTGGATG  
 GGCTGGTTAA ACACCTACAC TGGAGAGTCA ATATATCCTG ATGACTTCAA  
 GGGACGGTTT GCCTTCTCTT CGGAAACCTC TGCCAGCACT GCCTATTTGC  
 AGATCAACAA CCTCAAAAAT GAGGACATGG CTACATATTT CTGTGCAAGA  
 GGGGACTATG GTTACGACGA CCCTTTGGAC TACTGGGGTC AAGGAACCTC  
 AGTCACCGTC TCCTCAGCCA AAACTCGAGA ACCACAGGTG TACACCCTGC  
 CCCCATCCCG GGACGAGCTC GGCATCGCGC AAGTCAGCCT GACCTGCCTG  
 GTCAAAAGGCT TCTATCCCAG CGACATCGCC GTGGAGTGGG AGAGCAACGG  
 GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACGCC TCCC GTGCTG GACTCCGACG  
 GCTCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTTACCG TGTTGGGCCG CAGGTGGACC  
 CTGGGGAAAG TCTTCTCATG CTCCGTGATG CATGAGGCTC TGCACAACCA  
 CTACACACAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC GGGTAAATCT CTAGAACAAA  
 AACTCATCTC AGAAGAGGAT CTGAATAGCG CCGTCGACCA TCATCATCAT  
 CATCATTGA

**Plan de clonación detallado**

**Cadena pesada:**

- 5 La región VH del anticuerpo IV.3 se amplifica por PCR con cebadores 4.3HupEco y 4.3HdownXho y posteriormente se digiere con EcoRI y XhoI. El clon de CH3 A23 preparado por ingeniería por SMID se amplifica por PCR con los cebadores CH3upXhoA y CH3XBA2 y posteriormente se digiere con XhoI y XbaI. La secuencia de VH y la secuencia de CH3 se ligan entre sí a través del sitio XhoI y se ligan en pPICZalphaA (Invitrogen), que se ha digerido previamente con EcoRI y XbaI. El vector resultante se denomina pPICA23.

10 **LISTA DE CEBADORES:**

|             |                                       |                |
|-------------|---------------------------------------|----------------|
| 4.3HUPECO   | cagagaattc gaggttcagc ttcagcagtc      | (SEQ ID No 49) |
| 4.3HDOWNXHO | gatgctcgag ttttggtcga ggagacggtg      | (SEQ ID No 50) |
| CH3UPXHOA   | aaaactcgag aaccacaggt gtacaccctg cc   | (SEQ ID No 51) |
| CH3XBA2     | actgatctag acctttaccc ggagacaggg agag | (SEQ ID No 52) |

**Cadena ligera:**

- 15 La región VL del anticuerpo IV.3 se amplifica por PCR con cebadores 4.3LupEco y 4.3LdownXho y posteriormente se digiere con EcoRI y XhoI. El clon de CH3 A23 preparado por ingeniería por SMID se amplifica por PCR con los cebadores CH3upXhoB y CH3StopKpn y posteriormente se digiere con XhoI y KpnI. La secuencia de VL y la secuencia de CH3 se ligan entre sí a través del sitio XhoI y se ligan en pPICZalphaA (Invitrogen), que se ha digerido previamente con EcoRI y KpnI. El vector resultante se denomina pPICLA23.

**LISTA DE CEBADORES:**

4.3LUPECO      gatagaattc gacattgtga tgacccaggc tg (SEQ ID No 53)  
 4.3LDOWNXHO    attactcgag gagcccgttt cagttccagc t (SEQ ID No 54)  
 CH3UPXHOB      gctcctcgag aaccacaggt gtacaccctg cc (SEQ ID No 55)  
 CH3STOPKPN     acgtggtacc tcaggcgcgc cctttaccog gagacagga gag  
 (SEQ ID No 56)

**Combinación de los dos casetes de expresión en un vector**

5 El casete de cadena ligera se corta con BgIII (pos. 1) y BamHI (pos. 2319) de pPICLA23 (4235 pb) y el fragmento de 2319 pb se purifica mediante electroforesis preparativa en gel. El fragmento de 1916 pb se desecha. El vector pPICHA23 (4219 pb) se digiere con BamHI y se inserta el fragmento de 2319 pb purificado previamente de pPICLA23. El vector de expresión de Pichia pastoris resultante, que porta dos casetes de expresión, uno para la proteína de fusión VL-CH3 y uno para la proteína de fusión VH-CH3, se criba de manera que ambos insertos tengan la misma dirección de transcripción. El vector resultante pPICHLA23 (6537 pb) se lineariza antes de transformación en Pichia pastoris, por ejemplo, con BamHI o con BssSI, se transforma en Pichia pastoris por electroporación y se seleccionan transformantes positivos con Zeocina. Se criban varios clones para la expresión de la proteína recombinante. Se selecciona un clon para la producción a gran escala y la proteína de fusión recombinante se purifica por cromatografía de afinidad con metal inmovilizado usando procedimientos estándar. Toda la manipulación, cultivo y expresión en Pichia se realiza siguiendo protocolos estándar (Invitrogen).

**Inserción de los epítomos de alérgeno en el vector pPICHLA23 y expresión de la proteína de fusión recombinante**

15 La secuencia que codifica los epítomos de alérgeno como se describe en el ejemplo 5 se inserta en el vector pPICHLA23 como sigue:

El vector se digiere con Ascl (4174-4182) lo que da lugar a su linearización. En este sitio Ascl, se inserta la secuencia de ADN que codifica los epítomos de alérgeno. La secuencia que codifica los epítomos de alérgeno se amplifica con los cebadores EpiTLR1 y EpiTLR2 con el fin de unir los sitios Ascl a ambos extremos de la secuencia.

20 **Lista de cebadores**

EpiTLR1      TAAAGGGCGC GCCTCCGGAT GCCAAATTTA CC  
 (SEQ ID No 57)

EpiTLR2      TACCTCAGGC GCGCCTTATT CAGTAGCAGC CACAC  
 (SEQ ID No 58)

El producto de PCR resultante se digiere con Ascl y se liga en el vector previamente digerido. El vector resultante se denomina pHLA23EP (7046 pb). La transformación de Pichia, expresión y purificación de la proteína de fusión recombinante se realiza como se ha descrito anteriormente para la construcción que no tiene epítomos insertados.

25 **VL del anticuerpo IV.3:**

secuencia de aminoácidos:

DIVMTQAAPS VPVTPGESVS ISCRSSKSLI HTNGNTYLHW FLQRPQSPQ  
 LLIYRMSVLA SGVPDRFSGS GSGTAETLSI SRVEAEDVGV EYCMQHLEYP  
 LTFGAGTKLE LKRA (SEQ ID No 59)

secuencia de ácido nucleico:

GACATTGTGA TGACCCAGGC TGCACCCTCT GTACCTGTCA CTCCTGGAGA  
GTCAGTATCC ATCTCCTGCA GGTCTAGTAA GAGTCTCCTG CATACTAATG  
GCAACACTTA CTTGCATTGG TTCCTACAGA GGCCAGGCCA GTCTCCTCAG  
CTCCTGATAT ATCGGATGTC CGTCCTTGCC TCAGGAGTCC CAGACAGGTT  
CAGTGGCAGT GGGTCAGGAA CTGCTTTCAC ACTGAGCATC AGTAGAGTGG  
AGGCTGAGGA TGTGGGTGTT TTTTACTGTA TGCAACATCT AGAATATCCG  
CTCACGTTTC GTGCTGGGAC CAAGCTGGAA CTGAAACGGG CT (SEQ ID No 60)

**VH del anticuerpo IV.3:**

secuencia de aminoácidos:

EVQLQQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT NYGMNWVKQA PGKGLKWMGW  
LNTYTGESLY PDDFKGRFAF SSETSASTAY LQINNLKNEE MATYFCARGD  
YGYDDPLDYW GQGTSVTVSS AKT (SEQ ID No 61)

5 secuencia de ácido nucleico:

GAGGTTCAGC TTCAGCAGTC TGGACCTGAG CTGAAGAAGC CTGGAGAGAC  
AGTCAAGATC TCCTGCAAGG CTTCTGGGTA TACCTTCACA AACTATGGAA  
TGAAGTGGGT GAAGCAGGCT CCAGGAAAGG GTTTAAAGTG GATGGGCTGG  
TTAAACACCT AACTGGAGA GTCAATATAT CCTGATGACT TCAAGGGACG  
GTTTGCCTTC TCTTCGAAA CCTCTGCCAG CACTGCCTAT TTGCAGATCA  
ACAACCTCAA AAATGAGGAC ATGGCTACAT ATTTCTGTGC AAGAGGGGAC  
TATGGTTACG ACGACCCTTT GGACTACTGG GGTC AAGGAA CCTCAGTCAC  
CGTCTCCTCA GCCAAAACA (SEQ ID No 62)

Vector de expresión final pPICHCLA23.seq (SEQ ID No 63) que contiene regiones de unión a TLR9 y CD32

6537 pb

1  
agatctaaca tccaaagacg aaaggttgaa tgaaaccttt ttgccatccg acatccacag  
61  
gtccattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atacactagc agcagaccgt  
121  
tgcaaacgca ggacctccac tcctcttctc ctcaacaccc acttttgcca tcgaaaaacc  
181  
agcccagtta ttgggcttga ttggagctcg ctcattecaa ttccttctat taggctacta  
241  
acaccatgac tttattagcc tgtctatcct ggccccctg gcgaggttca tgtttgttta  
301  
tttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg  
361  
agtgtggggg caaatagttt catgttcccc aaatggccca aaactgacag tttaaacgct  
421  
gtcttgaac ctaatatgac aaaagcgtga tctcatccaa gatgaactaa gtttggttcg  
481  
ttgaaatgct aacggccagt tggcaaaaa gaaacttcca aaagtcggca taccgtttgt  
541  
cttgtttggg attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct  
601  
ctctatcgct tctgaacccc ggtgcacctg tgccgaaacg caaatgggga aacaccgct  
661  
ttttggatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact  
721  
gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aaccctact tgacagcaat  
781  
atataaacag aaggaagctg cctgtctta aaccttttt tttatcatca ttattagctt

841  
 actttcataa ttgcgactgg ttccaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga  
 901  
 caacttgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaaacg atgagatttc cttcaatttt  
 961  
 tactgctggt ttattcgcag catcctccgc attagctgct ccagtcaaca ctacaacaga  
 1021  
 agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggg tactcagatt tagaagggga  
 1081  
 tttcgatggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat aacgggttat tgttataaa  
 1141  
 tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta tctctcgaga aaagagaggc  
 1201  
 tgaagctgaa ttcgaggttc agcttcagca gtctggacct gagctgaaga agcctggaga  
 1261  
 gacagtcaag atctcctgca aggcttctgg gtataccttc acaaactatg gaatgaactg  
 1321  
 ggtgaagcag gctccaggaa agggtttaaa gtggatgggc tgggttaaca cctacactgg  
 1381  
 agagtcaata tctcctgatg acttcaaggg acggtttgcc ttctcttcgg aaacctctgc  
 1441  
 cagcactgcc tatttcgaga tcaacaacct caaaaatgag gacatggcta catatttctg  
 1501  
 tgcaagaggg gactatggtt acgacgacct ttggactac tggggtaag gaacctcagt  
 1561  
 caccgtctcc tcagcaaaaa ctcgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga  
 1621  
 tgagctgggc atcgcgcaag tcagcctgac ctgctgggc aaaggcttct atcccagca  
 1681  
 catcgccgtg gagtgggaga gcaacgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc  
 1741  
 cgtgctggac tccgacggtt ctttctctct ctacagcaag cttaccgtgt tgggccgag  
 1801  
 gtggaccctg gggaaactct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta  
 1861  
 cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatctcta gaacaaaaac tcatctcaga  
 1921  
 agaggatctg aatagcggcg tcgaccatca tcatcatcat cattgagttt gtagecctag  
 1981  
 acatgactgt tctcagttc aagttgggca cttacgagaa gaccggctct gctagattct  
 2041  
 aatcaagagg atgtcagaat gccatttggc tgagagatgc aggcttcatt tttgatactt



2101  
 ttttatttgt aacctatata gtataggatt ttttttgtca ttttgtttct tctogtacga  
 2161  
 gcttgctoct gatcagoccta totogcagct gatgaatata ttgtggtagg ggtttgggaa  
 2221  
 aatcattoga gtttgatggt tttcttggtt tttcccaactc ctcttcagag tacagaagat  
 2281  
 taagtgagac ctctgtttgt gcagatccaa catccaaaga cgaaggttg aatgaaacct  
 2341  
 ttttgccatc cgacatccac aggtccattc tcacacataa gtgccaaacg caacaggagg  
 2401  
 ggatacaacta gcagcagacc gttgcaaacg caggacctcc actcctcttc tectcaaac  
 2461  
 ccacttttgc catcgaaaaa ccagcccagt tattgggctt gattggagct cgctcattcc  
 2521  
 aattccttct attaggetac taacaccatg actttattag cctgtctatc ctggccccc  
 2581  
 tggcgaggtt catgtttggt tatttccgaa tgcaacaagc tccgcattac acccgacat  
 2641  
 cactccagat gagggcttcc tgagtgtggg gtcaaatagt ttcatgttcc ccaaatggcc  
 2701  
 caaaactgac agtttaaacg ctgtcttggg acctaatatg acaaaagcgt gatctcatcc  
 2761  
 aagatgaact aagtttggtt cgttgaaatg ctaacggcca gttggtcaaa aagaaacttc  
 2821  
 caaaagtcgg cataccgttt gtcttgtttg gtattgattg acgaatgctc aaaaataatc  
 2881  
 tcattaatgc ttagcgcagt ctctctatcg cttctgaacc ccggtgcacc tgtgccgaaa  
 2941  
 cgcaaatggg gaaacacccg ctttttggat gattatgcat tgtctccaca ttgtatgctt  
 3001  
 ccaagattct ggtgggaata ctgctgatag cctaacgttc atgatcaaaa ttttaactgtt  
 3061  
 ctaacccta cttgacagca atatataaac agaaggaagc tgccctgtct taaacctttt  
 3121  
 tttttatcat cattattagc ttactttcat aattgcgact ggttccaatt gacaagcttt  
 3181  
 tgattttaac gactttaac gacaacttga gaagatcaaa aaacaactaa ttattcgaaa  
 3241  
 cgatgagatt tcttcaatt tttactgctg ttttattcgc agcatcctcc gcattagctg  
 3301  
 ctccagtcaa cactacaaca gaagatgaaa cggcacaat tccggctgaa gctgtcatcg

3361  
 gttactcaga tttagaaggg gatttcgatg ttgctgtttt gccattttcc aacagcacia  
 3421  
 ataacgggtt attgtttata aataactacta ttgccagcat tgetgctaaa gaagaagggg  
 3481  
 tatctctcga gaaaagagag gctgaagctg aattcgacat tgtgatgacc caggctgcac  
 3541  
 cctctgtacc tgtcactcct ggagagtcag tatccatctc ctgcaggctc agtaagagtc  
 3601  
 tctgcatac taatggcaac acttaacttc attggttctc acagaggcca ggcagctc  
 3661  
 ctcagctcct gatatacgg atgtccgtcc ttgectcagg agtcccagac aggttcagt  
 3721 gcagtggttc aggaactgct ttcacactga gcctcagtag agtggaggct gaggatgtgg  
 3781 gtgtttttta ctgtatgcaa catctagaat atccgctcac gttcgggtct gggaccaagc  
 3841 tggaactgaa acgggtcctc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg  
 3901 agctgggcat cgcgcaagtc agcctgacct gcttggtcaa aggtttctat cccagcgaca  
 3961  
 tgcctgtgga gtgggagagc aacgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg  
 4021  
 tgctggactc cgaaggctct ttcttctctc acagcaagct taccgtgttg ggcgcaggt  
 4081 ggaccctggg gaacgtcttc tcatgctcgg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca  
 4141  
 cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aagggcgcgc ctgaggtacc togagccgg  
 4201  
 gcggccgcca gctttctaga acaaaaactc atctcagaag aggatctgaa tagcgcctc  
 4261  
 gaccatcacc atcatcatca ttgagtttgt agccttagac atgactgttc ctcagttcaa  
 4321  
 gttgggcact tacgagaaga ccggctcttc tagattctaa tcaagaggat gtcagaatgc  
 4381  
 catttgctg agagatgcag gcttcatttt tgatactttt ttatttgtaa cctatatagt  
 4441  
 ataggatttt ttttgcatt ttgtttcttc tctgacgagc ttgctcctga tcagcctatc  
 4501  
 tgcagctga tgaatatctt gtggtagggg ttgggaaaa tcattogagt ttgatgtttt  
 4561  
 tottggtatt tcccactcct cttcagagta cagaagatta agtgagacct tegtittgtc  
 4621  
 ggatccccca cacaccatag cttcaaaatg tttctactcc tttttactc ttcagattt  
 4681  
 tctcggactc cgcgcctcgc cgtaccactt caaaacaccc aagcacagca tactaaattt  
 4741

tcctctttc ttcctctagg gtgtcgtaa ttaccctac taaaggttg gaaaagaaa  
 4801  
 aagagaccgc ctcgtttctt tttcttcgtc gaaaaaggca ataaaaattt ttatcacgtt  
 4861  
 tctttttctt gaaatTTTT ttttagttt tttctcttt cagtgcctc cattgatatt  
 4921  
 taagttaata aacggtcttc aatttctcaa gtttcagttt catttttctt gttctattac  
 4981  
 aactttttt acttcttggt cattagaaag aaagcatagc aatctaact aaggggCGGT  
 5041  
 gttgacaatt aatcatcggc atagtatc gccatagtat aatacgaca ggtgaggaac  
 5101  
 taaaccatgg ccaagttgac cagtgcctt ccggtgctca ccgcgcgga cgtcgccgga  
 5161  
 gcggtcgagt tctggaccga ccggtcggg ttctccggg acttcgtgga ggaagactc  
 5221  
 gccggtgtg tccgggacga cgtgaccctg ttcatcagcg cgtccagga ccaggtggtg  
 5281  
 ccggacaaca ccctggcctg ggtgtgggtg ccggccctg acgagctgta cggcagtg  
 5341  
 tcggaggtcg tgtccacgaa ctccgggac gcctccggc cggccatgac cgagatcggc  
 5401  
 gagcagccgt gggggcggga gttcgccctg ccgaccccg ccgcaactg cgtgcactc  
 5461  
 gtggccgagg agcaggactg acacgtccga ccggcgccca cgggtcccag gcctcggaga  
 5521  
 tccgtcccc ttttctttg tcgatatcat gtaattagtt atgtcacgt tacattcacg  
 5581  
 cctcccccc acatccgctc taaccgaaaa ggaaggagtt agacaacctg aagtctaggt  
 5641  
 ccctatttat tttttatag ttatgttagt attaagaacg ttatttatat tcaaatTTT  
 5701  
 tcttttttt ctgtacagac gcgtgtacgc atgtaacatt atactgaaa cttgcttga  
 5761  
 gaaggtttg ggacgctcga aggctttaat ttgcaagctg gagaccaaca tgtgagcaaa  
 5821  
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgtt ctggcgttt tccataggct  
 5881  
 ccgccccct gacgagcctc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgac  
 5941  
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaactcc ctcgctcgt ctctgttcc  
 6001

gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgtttc  
6061  
teaatgctca cgcctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgetcca agctgggctg  
6121  
tgtgcacgaa cccccgttc agcccagccg ctgcccctta tccgtaact atcgtcttga  
6181  
gtccaacccg gtaagacaag acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag  
6241  
cagagcgagg tatgtaggog gtgctacaga gttcttgaag tggtaggcta actacggcta  
6301  
cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag  
6361  
agttggtagc tottgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgttg  
6421  
caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tttttctac  
6481  
ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc aogttaaggg attttggta tgagatc  
//

**Vector de expresión final pHLA23EPseq (SEQ ID No 64) que contiene regiones de unión a TLR9 y CD32 y secuencia de epítipo (véase SEQ ID No 16)**

7046 pb

1  
agatctaaca tccaaagacg aaaggttga tgaaccttt ttgccatccg acatccacag  
61  
gtccattctc acacataagt gccaaaagca acaggagggg atacactagc agcagaccgt  
121  
tgcaaacgca ggaacctcac tctctttctc ctcaaacacc acttttgcca tcgaaaaacc  
181  
agcccagtta ttgggcttga ttggagctcg ctcatccaa ttccttctat taggctacta  
241  
acaccatgac tttattagcc tgtctatcct ggccccctg gcgaggttea tgtttgttia  
301  
ttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg  
361  
agtgtggggt caaatagttt catgttcccc aaatgcccc aaactgacag tttaaacgct  
421  
gtcttggaac ctaatatgac aaaagcgtga tctcatccaa gatgaactaa gtttggttcg  
481  
ttgaaatgct aacggccagt tggtaaaaa gaaacttcca aaagtoggca tacogtttgt  
541

cttgtttggg attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct  
 601  
 ctctatcgct tctgaacccc ggtgcacctg tgccgaaaacg caaatgggga aacacccgct  
 661  
 ttttggatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaafact  
 721  
 gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aaccctact tgacagcaat  
 781  
 atataaacag aaggaagctg cctgtotta aacctttttt tttatcatca ttattagctt  
 841  
 actttcataa ttgagactgg ttccaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga  
 901  
 caacttgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaaaacg atgagatttc cttcaatttt  
 961  
 tactgtggtt ttattcgcag catctccgc attagctgct ccagtcaaca ctacaacaga  
 1021  
 agatgaaaacg gcacaaattc eggctgaagc tgtcatcggc tactcagatt tagaagggga  
 1081  
 tttcgatggt gctgttttgc cttttccaa cagcacaast aacgggttat tgtttataaa  
 1141  
 tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta tctctcgaga aaagagaggc  
 1201  
 tgaagctgaa ttcgaggttc agcttcagca gtctggacct gagctgaaga agcctggaga  
 1261  
 gacagtcaag atctectgca aggtttctgg gtataccttc acaaactatg gaatgaactg  
 1321  
 ggtgaagcag gctccaggaa agggtttaa gtggatgggc tggttaaaca cctacactgg  
 1381  
 agagtcaata tatctgatg acttcaaggg aoggtttgcc ttctctcgg aaacctctgc  
 1441  
 cagcactgcc tttttgcaga tcaacaacct caaaaatgag gacatggcta catatttctg  
 1501  
 tgcaagaggg gactatggtt acgacgaccc ttggactac tggggtaag gaacctcagt  
 1561  
 caccgtctcc tcagccaaaa ctcgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga  
 1621  
 tgagctgggc atcgcgcaag tcagcctgac ctgcctggtc aaaggttct atcccagcga  
 1681  
 catcgccgtg gagtgggaga gcaacgggca gccggagaac aactacaaga ccacgctcc  
 1741  
 cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag cttaccgtgt tgggcccag  
 1801

gtggaccctg gggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta  
 1861  
 cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatctcta gaacaaaaac tcctctcaga  
 1921  
 agaggatctg aatagcgcgg tcgaccatca tcctcatcat cattgagttt gtagccttag  
 1981  
 acatgactgt tcttcagttc aagttgggca cttacgagaa gaccggctct gctagattct  
 2041  
 aatcaagagg atgtcagaat gccatttggc tgagagatgc aggcttcatt tttgatactt  
 2101  
 ttttatttgt aacctatata gtataggatt tttttgtca ttttgttct tctcgtaoga  
 2161  
 gcttgctcct galcagccta tctcgcagct gatgaatata ttgtggtagg ggtttgggaa  
 2221  
 aatcattoga gtttgatggt tttcttggtt tttccactc ctcttcagag tacagaagat  
 2281  
 taagtgagac ctctgtttgt gcagatccaa catccaaaga cgaaagggtg aatgaaacct  
 2341  
 ttttgcctc cgacatccac aggtccattc tcacacataa gtgccaaacg caacaggagg  
 2401  
 ggatacacta gcagcagacc gttgcâaacg caggacctcc actcctcttc tctcaacac  
 2461  
 ccacttttgc catcgaaaaa ccagcccagt tattgggctt gattggagct cgctcattec  
 2521  
 aattccttct attaggctac taacaccatg actttattag cctgtctata ctggccccc  
 2581  
 tggcgagggt catgtttgtt tatttccgaa tgcaacaagc tccgcattac acccgaacat  
 2641  
 cactccagat gagggtttc tgagtgtggg gtcaaatagt ttcatgttcc ccaaattggc  
 2701  
 caaaactgac agtttaaacg ctgtcttggg acctaatatg acaaaagcgt gatctcatcc  
 2761  
 aagatgaact aagtttggtt cgttgaaatg ctaacggcca gttggtcaaa aagaaacttc  
 2821  
 caaaagtggg cataccgttt gtcttgtttg gtattgattg acgaatgctc aaaaataatc  
 2881  
 tcattaatgc ttagcgcagt ctctctatcg cttctgaacc cgggtgcacc tgtgccgaaa  
 2941  
 cgcaaattgg gaaacaccgg ctttttggat gattatgcat tgtctccaca ttgtatgctt  
 3001  
 ccaagattct ggtgggaata ctgctgatag cctaaccgtc atgatcaaaa ttaactgtt  
 3061

ctaaccoccta cttgacagca atatataaac agaaggaagc tgcocctgtct taaacoccttt  
 3121  
 tttttatcat cattattagc ttactttcat aattgcgact ggtccaatt gacaagcctt  
 3181  
 tgattttaac gacttttaac gacaacttga gaagatcaaa aaacaactaa ttattcgaaa  
 3241  
 cgatgagatt tccttcaatt ttactgtctg ttttattcgc agcatcctcc gcattagctg  
 3301  
 ctccagtcaa cactacaaca gaagatgaaa cggcacaaat tccggctgaa gctgtcatcg  
 3361  
 gttactcaga tttagaaggc gatttcgatg ttgctgtttt gccattttcc aacagcacia  
 3421  
 ataacgggtt attgtttata aatactacta ttgccagcat tgcctgctaaa gaagaagggg  
 3481  
 tatctctoga gaaaagagag gctgaagctg aattcgacat tctgatgacc caggctgcac  
 3541  
 cctctgtacc tgcactcct ggagagctag tatccatctc ctgcaggctc agtaagagtc  
 3601  
 tctctcatac taatggcaac acttacttgc attggttctc acagaggcca gccagctctc  
 3661  
 ctccagctct gatatatcgg atgtccgtcc ttgcctcagg agtcccagac aggttcagtg  
 3721  
 gcagtgggc aggaactgct ttcacactga gcatcagtag agtggaggct gaggatgtgg  
 3781  
 gtgtttttta ctgtatgcaa catctagaat atccgctcac gttcggctgct gggaccaagc  
 3841  
 tggaaactgaa acgggctcct cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg  
 3901  
 agctgggcat cgcgcaagtc agcctgacct gcctgtcaa aggttctat cccagcgaca  
 3961  
 tcgccgtgga gtgggagagc aacgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg  
 4021  
 tgcctggactc cgaaggctct ttcttctctc acagcaagct taccgtgttg gcccgaggct  
 4081  
 ggaccctggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca  
 4141  
 cgcagaagag cctctccttg tctccgggta aagggcgcgc ctccggatgc caaatttacc  
 4201  
 cgccaaacgc gaacaagatc agagaggctt tgcaatcttg caggaggccc aatgcgcaga  
 4261  
 gattcggcat atccaactac tgccagatct acccccata cgatgggcgt acaatcatac  
 4321

agcgtgataa cggctatcag cctaactacc acgocgtgaa catcgtcggc tacgagaatg  
 4381  
 tcgtggtrac tgtgaaggta atgggcgatg acggggttct agcttgcgcc atagctacca  
 4441  
 agtacacttg gaacgtaccc aaaattgccc cgaaaagtga aaacgtcgtg gtgaccataa  
 4501  
 gggaggcatt ggctcaacct caaagatact gcagacacta ctggacgccc tgcataatcc  
 4561  
 accgtggtaa accctttcaa cttgaggcag tgttcgaagc taacaggacg gtaacgccaa  
 4621  
 ttcgtatgca aggtgggtgc gggctttgtt gggctttttc tgggtgtggct gctactgaat  
 4681  
 aaggcgcgcc tgaggtaact cgagccgccc cgcccgccag ctttctagaa caaaaactca  
 4741  
 tctcagaaga ggatctgaat agcgcogtgc accatcatca tcatcatcat tgagtttga  
 4801  
 gcottagaca tgactgttcc tcagttcaag ttgggcactt acgagaagac cgttcttgc  
 4861  
 agattctaata caagaggatg tcagaatgcc atttgcctga gagatgcagg cttcatttt  
 4921  
 gatacttttt tatttgtaac ctatatagta taggattttt tttgtcattt tgtttcttt  
 4981  
 cgtacgagct tgctcctgat cagcctatct cgcagctgat gaatatcttg tggtaggggt  
 5041  
 ttgggaaaat cattcgagtt tgatgttttt cttggtattt cccactcttc ttcagagtac  
 5101  
 agaagattaa gtgagacctt cgtttgtgcg gatccccac acaccatagc ttcaaaatgt  
 5161  
 ttctactcct tttttactct tccagatttt ctcggaactcc ggcacatgcc gtaccacttc  
 5221  
 aaaacaccca agcacagcat actaaatttt ccctctttct tctctaggg tgtogttaat  
 5281  
 taccctact aaaggtttgg aaaagaaaa agagaccgcc tcgtttcttt ttcttcgtc  
 5341  
 aaaaaggcaa taaaaatttt taccacgttt cttttctttg aaattttttt ttttagttt  
 5401  
 tttctcttc agtgacctcc attgatattt aagttaataa acggtcttca atttctcaag  
 5461  
 tttcagtttc attttcttg ttctattaca acttttttta cttcttgttc attagaaaga  
 5521  
 aagcatagca atctaacta aggggcgggt ttgacaatta atcctcggca tagtatatcg  
 5581



gcatagtata atacgacaag gtgaggaact aaaccatggc caagttgacc agtgccggtc  
 5641  
 cgggtgctcac cgcgcgcgac gtgcgccggag cgggtcgagtt ctggaccgac cggctcgggt  
 5701  
 tctcccggga cttegtggag gacgacttcg ccggtgtggg ccgggacgac gtgaccctgt  
 5761  
 tcatcagcgc ggtccaggac caggtgggtc cggacaacac cctggcctgg gtgtgggtgc  
 5821  
 gcggcctgga cgagctgtac gccgagtggg cggaggtcgt gtccaagAAC ttcgggacg  
 5881  
 cctccggggc ggccatgacc gagatcggcg agcagccgtg ggggcgggag ttcgccctgc  
 5941  
 gcgaccgggc cggcaactgc gtgcacttcg tggecgagga gcaggactga cacgtccgac  
 6001  
 ggcggcccac ggggccagg cctcggagat ccgtccccct tttcctttgt cgatatcatg  
 6061  
 taattagtta tgtcaagctt acattcacgc cctcccccca catccgctct aaccgaaaag  
 6121  
 gaaggagtta gacaacctga agtctaggtc cctatttatt tttttatagt tatgttagta  
 6181  
 ttaagaacgt tatttatatt tcaaattttt ctttttttcc tgtacagacg cgtgtacgca  
 6241  
 tgtaacatta tactgaaaac cttgcttgag aaggttttgg gacgctcgaa ggctttaatt  
 6301  
 tgcaagctgg agaccaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag  
 6361  
 gccgcgttgc tggcgttttt ccataggttc cgcctccctg acgagcatca caaaaatcga  
 6421  
 cgctcaagtc agaggtagcg aaaccogaca ggactataaa gataccaggc gtttccctc  
 6481  
 ggaagctccc tegtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaaccgata cctgtccgcc  
 6541  
 tttctcctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg  
 6601  
 gtgtaggteg ttgcctocaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc  
 6661  
 tgcgccttat ccggtaaacta tegtcttgag tccaaccocg taagacacga cttatcgcca  
 6721  
 ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag  
 6781  
 ttcttgaagt ggtggcctaa ctacgctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct  
 6841

```

ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc
6901
accgctggta gcggtgggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga
6961
tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa cgaaaactca
7021
cgttaaggga ttttggatc gagatc
//

```

Todas las temperaturas están en grados Celsius. Se usan las abreviaturas siguientes:

CD32= Fc $\gamma$ RII

TLR9= receptor 9 semejante a Toll

5 Der P1= alergeno principal 1 de Dermatophagoides pteronissyus

Der P2= alergeno principal 2 de Dermatophagoides pteronissyus

Der F1= alergeno principal 1 de Dermatophagoides farinae

En lo que sigue, se describen los aspectos preferidos de la presente descripción:

- 10 1. Una molécula o complejo molecular capaz de unirse a TLR9 y a CD32 que comprende al menos un epítipo de al menos un antígeno.
2. Una molécula o complejo molecular según 1, caracterizado por que el epítipo es un epítipo de célula T.
3. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 ó 2, caracterizado por que el epítipo se obtiene de un alergeno.
- 15 4. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 3, caracterizado por que al menos un epítipo está unido de forma no covalente a la molécula.
5. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 4, caracterizado por que al menos un epítipo está unido de forma no covalente a la región de unión a TLR9 y/o CD32.
6. Una molécula o complejo molecular según 5, caracterizado por que al menos un epítipo está unido a la región de unión a TLR9 y/o CD32 a través de una interacción de anticuerpo y/o interacción de ligando.
- 20 7. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 6, caracterizado por que el epítipo se produce a partir de al menos una cadena de ADN que contiene epítipo de célula T de un antígeno o un péptido sintético.
8. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 7, caracterizado por que el epítipo se selecciona del grupo que consiste en alergenos en dermatitis atópica, asma alérgico, rinitis alérgica o conjuntivitis alérgica.
- 25 9. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 8, caracterizado por que el epítipo se aísla de antígenos completos, antígenos desnaturalizados o antígenos modificados para prevenir la unión a IgE.
10. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 9, caracterizado por que comprende al menos un anticuerpo o derivado o fragmento de éste.
11. Una molécula o complejo molecular según 10, caracterizado por que el anticuerpo o fragmento o derivado de éste es IgG, IgM, IgE, IgA o IgD.
- 30 12. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 11, caracterizado por que tiene estructura humana o humanizada.
13. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 12, caracterizado por que tiene estructura murina o parcialmente murina.

14. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 13, caracterizado por que tiene estructura de camélido o parcialmente camélido.
15. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 14, caracterizado por que comprende al menos un soporte de unión preparado por ingeniería.
- 5 16. Una molécula o complejo molecular según 15, caracterizado por que el soporte de unión se selecciona del grupo que consiste en fibronectina III, lipocalinas, Proteína A, inhibidor de  $\alpha$ -amilasa, proteínas con repeticiones de anquirina, un dominio C2, un dominio A, un dominio semejante a EGFR, un dab, Un chi-Ab, CTLA-4, cristalino gamma y cualquier otra proteína.
- 10 17. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 16, caracterizado por que comprende al menos una parte de un dominio pequeño mutado de inmunoglobulina (SMID).
18. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 17, caracterizado por que comprende al menos parte de un anticuerpo anti-CD32 o derivado o fragmento de éste.
19. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 18, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 59 o parte de ésta.
- 15 20. Una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 19, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 61 o parte de ésta.
21. Composición farmacéutica que comprende al menos una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 20, opcionalmente junto con al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
22. Uso de una preparación farmacéutica según 21 para inmunoterapia activa.
- 20 23. Método para tratar alergias en el que se administra una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de al menos una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 20 a un sujeto que necesita dicho tratamiento opcionalmente junto con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
24. Uso de al menos una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 20 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de alergias.
- 25 25. Proceso para producir una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 20, usando técnica recombinante en el que los genes que codifican las estructuras de unión para TLR9, CD32 y el epítipo se construyen en un vector y se expresan en una célula huésped.
26. Vector de ácido nucleico para expresar una molécula según cualquiera de 1 a 20, que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID No 60.
- 30 27. Vector de ácido nucleico para expresar una molécula según cualquiera de 1 a 20, que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID No 62.
28. Vector de ácido nucleico para expresar una molécula según cualquiera de 1 a 20, que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID No 63.
- 35 29. Vector de ácido nucleico para expresar una molécula según cualquiera de 1 a 20, que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID No 64.
30. Proceso para producir una molécula o complejo molecular según una cualquiera de 1 a 20, usando entrecruzamiento químico.

## REFERENCIAS

1. Mudde, G.C., I.G.Reischl, N.Corvaia, A.Hren, y E.-M.Pöllabauer. 1996. Antigen presentation in allergic sensitization. *Immunol. Cell Biol.* 74:167-173.
2. Bheekha Escura, R., E.Wasserbauer, F.Hammerschmid, A.Pearce, P.Kidd, y G.C.Mudde. 1995. Regulation and targetting of T-cell immune responses by IgE and IgG antibodies. *Immunology* 86:343-350.
3. Pène, J., F.Rousset, F.Brière, I.Chretien, J.-Y.Bonnefoy, H.Spits, T.Yokota, K.-I.Arai, J.Banchereau, y J.E.De Vries. 1988. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6880-6884.
4. Ebner, C. 1999. Immunological mechanisms operative in allergen-specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 119:1-5.
5. Ferreira, F., C.Ebner, B.Kramer, G.Casari, P.Briza, A.J.Kungl, R.Grimm, B.Jahn-Schmid, H.Breiteneder, D.Kraft, M.Breitenbach, H.J.Rheinberger, y O.Scheiner. 1998. Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy. *FASEB Journal* 12:231-242.
6. Rissoan, M.C., V.Soumelis, N.Kadowaki, G.Grouard, F.Briere, R.D.Malefyt, y Y.J.Liu. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183-1186.
7. Kapsenberg, M.L., C.M.Hilkens, E.A.Wierenga, y P.Kalinski. 1999. The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy. *Clin. Exp. Allergy* 29:33-36.
8. Charbonnier, A.S., H.Hammad, P.Gosset, G.A.Stewart, S.Alkan, A.B.Tonnel, y J.Pestel. 2003. Der p1-pulsed myeloid and plasmacytoid dendritic cells from house dust mite-sensitized allergic patients dysregulate the T cell response. *J. Leukocyte Biol.* 73:91-99.
9. Rothenfusser, S., E.Tuma, S.Endres, y G.Hartmann. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: The key to CpG. *Hum. Immunol.* 63:1111-1119.
10. Latz, E., A.Schoenemeyer, A.Visintin, K.A.Fitzgerald, B.G.Monks, C.F.Knetter, E.Lien, N.J.Nilsen, T.Espevik, y D.T.Golenbock. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* 5:190-198.
11. Leifer, C.A., M.N.Kennedy, A.Mazzoni, C.W.Lee, M.J.Kruhlak, y D.A.Segal.

2004. TLR9 Is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J. Immunol.* 173:1179-1183.
12. Wang, W.W., D.Das, X.L.Tang, W.Budzynski, y M.R.Suresh. 2005. Antigen targeting to dendritic cells with bispecific antibodies. *J. Immunol. Methods.*
13. van Schaijk, F.G., E.Oosterwijk, A.C.Soede, M.Broekema, C.Frielink, W.J.McBride, D.M.Goldenberg, F.H.Corstens, y O.C.Boerman. 2005. Pretargeting of carcinoembryonic antigen-expressing tumors with a biologically produced bispecific anticarcinoembryonic antigen x anti-indium-labeled diethylenetriaminepentaacetic acid antibody. *Clin. Cancer Res.* 11:7130s-7136s.
14. Le, G.F., U.Reusch, G.Moldenhauer, M.Little, y S.M.Kipriyanov. 2004. Immunosuppressive properties of anti-CD3 single-chain Fv and diabody. *J. Immunol. Methods* 285:111-127.
15. Schuster, M., P.Umana, C.Ferrara, P.Brunker, C.Gerdes, G.Waxenecker, S.Wiederikum, C.Schwager, H.Loibner, G.Himmeler, y G.C.Mudde. 2005. Improved effector functions of a therapeutic monoclonal Lewis Y-specific antibody by glycoform engineering. *Cancer Res* 65:7934-7941.
16. Orlandi, R., D.H.Gussow, P.T.Jones, y G.Winter. 1989. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:3833-3837.
17. Barton, G.M., J.C.Kagan, y R.Medzhitov. 2005. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* ..
18. Chen, W.L., J.L.Wang, H.Z.An, J.Zhou, L.H.Zhang, y X.T.Cao. 2005. Heat shock up-regulates TLR9 expression in human B cells through activation of ERK and NF-kappaB signal pathways. *Immunol. Lett.* 98:153-159.
19. Eaton-Bassiri, A., S.B.Dillon, M.Cunningham, M.A.Ryczyn, J.Mills, R.T.Sarisky, y M.L.Mbow. 2004. Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* 72:7202-7211.
20. Leroy, B.P., J.-M.Lachapelle, M.Jacquemin, y J.-M.Saint-Remy. 1992. Treatment of atopic dermatitis by allergen-antibody complexes: Long-term clinical results and evolution of IgE antibodies. *Dermatologica* 184:271-274.
21. Chua, K.Y., W.K.Greene, P.Kehal, y W.R.Thomas. 1991. IgE binding studies with large peptides expressed from Der p II cDNA constructs. *Clin. Exp. Allergy.* 21:161-166.

22. Baselmans, P.J., E. Pollabauer, F.C. Van Reijssen, H.C. Heystek, A. Hren, P. Stumptner, M.G. Tilanus, W.C. Vooijs, y G.C. Mudde. 2000. IgE production after antigen-specific and cognate activation of HLA- DPw4-restricted T-cell clones, by 78% of randomly selected B-cell donors. *Hum. Immunol.* 61:789-798.
23. Beck, H., G. Schwarz, C.J. Schroter, M. Deeg, D. Baier, S. Stevanovic, E. Weber, C. Driessen, y H. Kalbacher. 2001. Cathepsin S and an asparagine-specific endoprotease dominate the proteolytic processing of human myelin basic protein in vitro. *Eur J Immunol* 31:3726-3736.
24. Higgins, J.A., C.J. Thorpe, J.D. Hayball, R.E. O'Hehir, y J.R. Lamb. 1994. Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of *Dermatophagoides* species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93:891-899.
25. Bian, H., J.F. Reidhaar-Olson, and J. Hammer. 2003. The use of bioinformatics for identifying class II-restricted T-cell epitopes. *Methods* 29:299-309.
26. Sturniolo, T., E. Bono, J. Ding, L. Radrizzani, O. Tuereci, U. Sahin, M. Braxenthaler, F. Gallazzi, M.P. Protti, F. Sinigaglia, and J. Hammer. 1999. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol.* 17:555-561.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F-STAR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNGS- UND ENTWICKLUNGSGES.M.B.H.

<120> Moléculas nuevas

<130> R 49641

<150> EP 06110672.0

<151> 2006 03 03

<160> 66

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> humano

<400> 1

Cys Pro Arg His Phe Pro Gln Leu His Pro Asp Thr Phe Ser  
1 5 10

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> humano

<400> 2

Leu Thr His Leu Ser Leu Lys Tyr Asn Asn Leu Thr Val Val Pro Arg  
1 5 10 15

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> humano

<400> 3

Ala Asn Leu Thr Ala Leu Arg Val Leu Asp Val Gly Gly Asn Cys Arg  
1 5 10 15

Arg Cys Asp His Ala Pro Asn Pro Cys  
20 25

<210> 4

<211> 43

<212> PRT

<213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 4

Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr  
1 5 10 15

Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg Glu Ala Leu Ala  
20 25 30

Gln Pro Gln Arg Tyr Cys Arg His Tyr Trp Thr  
35 40

<210> 5  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 5

Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr  
 1 5 10 15

Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg Glu Ala Leu  
 20 25 30

<210> 6  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 6

Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 7

Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp  
 1 5 10 15

Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu  
 20 25

<210> 8  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 8

Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn  
 1 5 10 15

Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly Tyr  
 20 25

<210> 9  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 9

Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Val Phe  
 1 5 10 15

Glu Ala Asn



<210> 10  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 10

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

Val Val Thr

<210> 11  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 11

Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly Asp Asp Gly Val Leu  
 1 5 10 15

Ala Cys Ala Ile Ala Thr  
 20

<210> 12  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 12

Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr  
 1 5 10 15

Cys Gln Ile Tyr Pro Pro  
 20

<210> 13  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 13

Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg Glu Ala Leu  
 1 5 10 15

<210> 14  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 14

Ile Arg Glu Ala Leu Ala Gln Pro Gln Arg Tyr Cys Arg His Tyr Trp  
 1 5 10 15

Thr

<210> 15  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> humano

<400> 15  
 aaacgggcag atgctgcacc aactgtatcc atcttc

36

<210> 16  
 <211> 164  
 <212> PRT  
 <213> humano

<400> 16

Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg Glu Ala Leu Gln  
 1 5 10 15

Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr Cys  
 20 25 30

Gln Ile Tyr Pro Pro Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln Arg Asp Asn  
 35 40 45

Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly Tyr Glu Asn  
 50 55 60

Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly Asp Asp Gly Val Leu Ala Cys  
 65 70 75 80

Ala Ile Ala Thr Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys Ile Ala Pro Lys  
 85 90 95

Ser Glu Asn Val Val Val Thr Ile Arg Glu Ala Leu Ala Gln Pro Gln  
 100 105 110

Arg Tyr Cys Arg His Tyr Trp Thr Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys  
 115 120 125

Pro Phe Gln Leu Glu Ala Val Phe Glu Ala Asn Arg Thr Val Thr Pro  
 130 135 140

Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val  
 145 150 155 160

Ala Ala Thr Glu

<210> 17  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el

|                     |   |    |
|---------------------|---|----|
| epitopo de alergeno |   |    |
| <400>               | 17<br>tccggatgcc aaatttaccc gccaaacg  | 28 |
| <210>               | 18  |    |
| <211>               | 40  |    |
| <212>               | ADN   |    |
| <213>               | secuencia artificial  |    |
| <220>               |   |    |
| <223>               | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno |    |
| <400>               | 18<br>agcctctctg atcttggtcg cgtttgccgg gtaaatttgg                                       | 40 |
| <210>               | 19  |    |
| <211>               | 40  |    |
| <212>               | ADN   |    |
| <213>               | secuencia artificial  |    |
| <220>               |   |    |
| <223>               | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno |    |
| <400>               | 19<br>cgaacaagat cagagaggct ttgcaatctt gcaggaggcc                                       | 40 |
| <210>               | 20  |    |
| <211>               | 40  |    |
| <212>               | ADN   |    |
| <213>               | secuencia artificial  |    |
| <220>               |   |    |
| <223>               | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno |    |
| <400>               | 20<br>tatgccgaat ctctgcgcat tgggcctcct gcaagattgc                                       | 40 |
| <210>               | 21  |    |
| <211>               | 40  |    |
| <212>               | ADN   |    |
| <213>               | secuencia artificial  |    |
| <220>               |   |    |
| <223>               | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno |    |
| <400>               | 21<br>gcgcagagat tcggcatatc caactactgc cagatctacc                                       | 40 |
| <210>               | 22  |    |
| <211>               | 40  |    |
| <212>               | ADN   |    |
| <213>               | secuencia artificial  |    |
| <220>               |   |    |
| <223>               | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno |    |
| <400>               | 22<br>gtacgcccat cgtatggggg gtagatctgg cagtagttgg                                       | 40 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| <210> | 23  |    |
| <211> | 40  |    |
| <212> | ADN   |    |
| <213> | secuencia artificial  |    |
| <220> |   |    |
| <223> | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno |    |
| <400> | 23  |    |
|       | cccatacgat gggcgtacaa tcatacagcg tgataacggc   | 40 |
| <210> | 24  |    |
| <211> | 40  |    |
| <212> | ADN   |    |
| <213> | secuencia artificial  |    |
| <220> |   |    |
| <223> | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno |    |
| <400> | 24  |    |
|       | gcgtggtagt taggctgata gccgttatca cgctgtatga   | 40 |
| <210> | 25  |    |
| <211> | 40  |    |
| <212> | ADN   |    |
| <213> | secuencia artificial  |    |
| <220> |   |    |
| <223> | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno |    |
| <400> | 25  |    |
|       | tatcagccta actaccacgc cgtgaacatc gtcggctacg   | 40 |
| <210> | 26  |    |
| <211> | 40  |    |
| <212> | ADN   |    |
| <213> | secuencia artificial  |    |
| <220> |   |    |
| <223> | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno |    |
| <400> | 26  |    |
|       | tcacagtaac cacgacattc tcgtagccga cgatgttcac   | 40 |
| <210> | 27  |    |
| <211> | 40  |    |
| <212> | ADN   |    |
| <213> | secuencia artificial  |    |
| <220> |   |    |
| <223> | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno |    |
| <400> | 27  |    |
|       | agaatgctcgt gggtactgtg aaggtaatgg gcgatgacgg  | 40 |
| <210> | 28  |    |
| <211> | 40  |    |
| <212> | ADN   |    |
| <213> | secuencia artificial  |    |

<220>  
 <223> oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno  
 <400> 28  
 agctatggcg caagctagaa ccccgatc gcccattacc 40

<210> 29  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno  
 <400> 29  
 tctagcttgc gccatagcta ccaagtacac ttggaacgta 40

<210> 30  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno  
 <400> 30  
 ttttcggcgc aattttgggt acgttccaag tgtacttgggt 40

<210> 31  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno  
 <400> 31  
 cccaaaattg cgccgaaaag tgaaaacgtc gtagtgacca 40

<210> 32  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno  
 <400> 32  
 tgagccaatg cctcccttat ggtcactacg acgttttcac 40

<210> 33  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epitopo de alergeno

|   |   |    |
|---|---|----|
| <400> 33                                    |   |    |
| agggagcat tggctcaacc tcaaagatac tgcaagacact |   | 40 |
| <210> 34                                    |   |    |
| <211> 40                                    |   |    |
| <212> ADN                                   |   |    |
| <213> secuencia artificial                  |   |    |
| <220>                                       | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el |    |
| <223>                                       | epitopo de alergeno   |    |
| <400> 34                                    |   |    |
| ttatgcaggg cgtccagtag tgtctgcagt atctttgagg |   | 40 |
| <210> 35                                    |   |    |
| <211> 40                                    |   |    |
| <212> ADN                                   |   |    |
| <213> secuencia artificial                  |   |    |
| <220>                                       | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el |    |
| <223>                                       | epitopo de alergeno   |    |
| <400> 35                                    |   |    |
| actggacgcc ctgcataatc caccgtggta aaccctttca |   | 40 |
| <210> 36                                    |   |    |
| <211> 40                                    |   |    |
| <212> ADN                                   |   |    |
| <213> secuencia artificial                  |   |    |
| <220>                                       | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el |    |
| <223>                                       | epitopo de alergeno   |    |
| <400> 36                                    |   |    |
| cttcgaacac tgcctcaagt tgaagggtt taccacggtg  |   | 40 |
| <210> 37                                    |   |    |
| <211> 40                                    |   |    |
| <212> ADN                                   |   |    |
| <213> secuencia artificial                  |   |    |
| <220>                                       | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el |    |
| <223>                                       | epitopo de alergeno   |    |
| <400> 37                                    |   |    |
| acttgaggca gtgttcgaag ctaacaggac ggtaacgcca |   | 40 |
| <210> 38                                    |   |    |
| <211> 40                                    |   |    |
| <212> ADN                                   |   |    |
| <213> secuencia artificial                  |   |    |
| <220>                                       | oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el |    |
| <223>                                       | epitopo de alergeno   |    |
| <400> 38                                    |   |    |
| ccgcaccac cttgcatacg aattggcggt accgtcctgt  |   | 40 |
| <210> 39                                    |   |    |

<211> 40  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epítipo de alérgeno  
  
 <400> 39  
 tgcaagggtgg gtgcgggtct tgttgggctt tttctggtgt 40

<210> 40  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido para la generación de gen sintético que codifica el epítipo de alérgeno  
  
 <400> 40  
 actagtttat tcagtagcag ccacaccaga aaaagcccaa ca 42

<210> 41  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> humano  
  
 <400> 41  
 Lys Arg Ala Pro Arg Glu  
 1 5

<210> 42  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> mutación silenciosa para introducir un único sitio XhoI  
  
 <400> 42  
 aaacgggctc ctcgagaa 18

<210> 43  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia completa de una proteína de fusión VL-CH3  
  
 <400> 43  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Thr  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Val Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Ser Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Phe Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

Arg Ala Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 115 120 125

Glu Leu Gly Ile Ala Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 130 135 140

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 145 150 155 160

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 165 170 175

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Leu Gly Arg Arg Trp Thr Leu Gly  
 180 185 190

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 195 200 205

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 210 215

<210> 44  
 <211> 681  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión VL-CH3

<400> 44  
 gaattcgaca ttgtgatgac ccaggctgca ccctctgtac ctgtcactcc tggagagtca 60  
 gtatccatct cctgcaggtc tagtaagagt ctctgcata ctaatggcaa cacttacttg 120  
 cattggttcc tacagaggcc aggccagtct cctcagctcc tgatatatcg gatgtccgtc 180  
 cttgcctcag gagtcccaga caggttcagt ggcagtgggt caggaactgc tttcactg 240  
 agcatcagta gagtggaggc tgaggatgtg ggtgtttttt actgtatgca acatctagaa 300  
 tatccgctca cgttcggtgc tgggaccaag ctggaactga aacgggctcc tcgagaacca 360  
 caggtgtaca cctgcccc atcccgggac gagctcggca tcgcgcaagt cagcctgacc 420  
 tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caacgggcag 480  
 ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc tttcttctc 540



tacagcaagc ttaccgtggt gggccgcagg tggaccctgg ggaacgtctt ctcagtctcc 600  
 gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acacagaaga gcctctccct gtctccgggt 660  
 aaatgagggc gcgccgtac c 681

<210> 45  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> parte de la cadena pesada del dominio CH3

<400> 45

Ala Lys Thr Arg Glu Pro  
 1 5

<210> 46  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> VH-CH3 con mutación silenciosa para introducir un sitio XhoI

<400> 46  
 gccaaaactc gagaacca

18

<210> 47  
 <211> 250  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia completa de la proteína de fusión VH-CH3

<400> 47

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Leu Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Ile Tyr Pro Asp Asp Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Ser Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Gly Tyr Asp Asp Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

ES 2 483 615 T3

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Gly Ile Ala Gln Val Ser  
 130 135 140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190  
 Leu Gly Arg Arg Trp Thr Leu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Pro Gly Lys Ser Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Ser Ala Val Asp His His His His His His  
 245 250

<210> 48  
 <211> 759  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión VH-CH3 completa  
 <400> 48  
 gaattcgagg ttcagcttca gcagtctgga cctgagctga agaagcctgg agagacagtc 60  
 aagatctcct gcaaggcttc tgggtatacc ttcacaaact atggaatgaa ctgggtgaag 120  
 caggctccag gaaagggtt aaagtggatg ggctgggtaa acacctacac tggagagtca 180  
 atatatcctg atgacttcaa gggacggttt gccttctctt cggaaacctc tgccagcact 240  
 gcctatattgc agatcaacaa cctcaaaaat gaggacatgg ctacatattt ctgtgcaaga 300  
 ggggactatg gttacgacga ccctttggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 360  
 tcctcagcca aaactcgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccc ggacgagctc 420  
 ggcacgcgc aagtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 480  
 gtggagtggg agagcaacgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 540  
 gactccgacg gctctttctt cctctacagc aagcttaccg tgttgggccc caggtggacc 600  
 ctggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 660  
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaactct ctagaacaaa aactcatctc agaagaggat 720

|   |     |
|---|-----|
| ctgaatagcg ccgtcgacca tcatcatcat catcattga              | 759 |
| <210> 49  |     |
| <211> 30  |     |
| <212> ADN   |     |
| <213> secuencia artificial                              |     |
| <220>   |     |
| <223> cebador 4.3HupEco                                 |     |
| <400> 49  |     |
| cagagaattc gaggttcagc ttcagcagtc                        | 30  |
| <210> 50  |     |
| <211> 30  |     |
| <212> ADN   |     |
| <213> secuencia artificial                              |     |
| <220>   |     |
| <223> cebador 4.3HDOWNXHO para la amplificación por PCR |     |
| <400> 50  |     |
| gatgctcgag ttttgctga ggagacggtg                         | 30  |
| <210> 51  |     |
| <211> 32  |     |
| <212> ADN   |     |
| <213> secuencia artificial                              |     |
| <220>   |     |
| <223> cebador CH3UPXHOA para la amplificación por PCR   |     |
| <400> 51  |     |
| aaaactcgag aaccacaggt gtacaccctg cc                     | 32  |
| <210> 52  |     |
| <211> 34  |     |
| <212> ADN   |     |
| <213> secuencia artificial                              |     |
| <220>   |     |
| <223> cebador CH3XBA2 para la amplificación por PCR     |     |
| <400> 52  |     |
| actgatctag acctttaccg ggagacaggg agag                   | 34  |
| <210> 53  |     |
| <211> 32  |     |
| <212> ADN   |     |
| <213> secuencia artificial                              |     |
| <220>   |     |
| <223> cebador 4.3LUPECO para la amplificación por PCR   |     |
| <400> 53  |     |
| gatagaattc gacattgtga tgaccaggc tg                      | 32  |
| <210> 54  |     |
| <211> 31  |     |
| <212> ADN   |     |
| <213> secuencia artificial                              |     |
| <220>   |     |

<223> cebador 4.3LDOWNXHO para la amplificación por PCR  
 <400> 54  
 attactcgag gagcccgttt cagttccagc t 31

<210> 55  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador CH3UPXHOB para la amplificación por PCR  
 <400> 55  
 gctcctcgag aaccacaggt gtacaccctg cc 32

<210> 56  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador CH3STOPKPN para la amplificación por PCR  
 <400> 56  
 acgtggtacc tcaggcgcgc cctttacccg gagacagga gag 43

<210> 57  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador EpiTLR1 para la amplificación por PCR  
 <400> 57  
 taaagggcgc gcctccggat gccaaattta cc 32

<210> 58  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador EpiTLR2 para la amplificación por PCR  
 <400> 58  
 tacctcaggc ggccttatt cagtagcagc cacac 35

<210> 59  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> anticuerpo producido recombinantemente

<400> 59

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Thr  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Val Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Ser Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Phe Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

Arg Ala

- <210> 60
- <211> 342
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- <220>
- <223> secuencia de ácido nucleico del anticuerpo producido recombinantemente

<400> 60  
 gacattgtga tgaccaggc tgcaccctct gtacctgtca ctctggaga gtcagtatcc 60  
 atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg cataactaatg gcaacactta cttgcattgg 120  
 ttctacaga ggccaggcca gtctcctcag ctctgatat atcggatgtc cgtccttgcc 180  
 tcaggagtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagcatc 240  
 agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt ttttactgta tgcaacatct agaatatccg 300  
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggaa ctgaaacggg ct 342

- <210> 61
- <211> 123
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

- <220>
- <223> anticuerpo producido recombinantemente

<400> 61

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Leu Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Ile Tyr Pro Asp Asp Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Ser Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Asp Tyr Gly Tyr Asp Asp Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr  
 115 120

<210> 62  
 <211> 369  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia de ácido nucleico del anticuerpo producido recombinantemente

<400> 62  
 gaggttcagc ttcagcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60  
 tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct 120  
 ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ttaaacacct acactggaga gtcaatatat 180  
 cctgatgact tcaagggagc gtttgccttc tcttcgaaa cctctgccag cactgcctat 240  
 ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac atggctacat atttctgtgc aagaggggac 300  
 tatggttacg acgacctttt ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360  
 gccaaaaca 369

<210> 63  
 <211> 6537  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> vector de expresión final que contiene regiones de unión a TLR9 y CD32

<400> 63  
 agatctaaca tccaaagacg aaagggtgaa tgaaaccttt ttgccatccg acatccacag 60  
 gtccattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atacactagc agcagaccgt 120  
 tgcaaacgca ggacctccac tcctcttctc ctcaacacct acttttgcca tcgaaaaacc 180  
 agcccagtta ttgggcttga ttggagctcg ctcatccaa ttccttctat taggctacta 240  
 acaccatgac tttattagcc tgtctatcct ggccccctg gcgagggtca tgtttgttta 300  
 tttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg 360  
 agtgtgggggt caaatagttt catgttcccc aaatggccca aaactgacag tttaaacgct 420  
 gtcttggaac ctaatatgac aaaagcgtga tctcatccaa gatgaactaa gtttggttcg 480  
 ttgaaatgct aacggccagt tgggtcaaaaa gaaacttcca aaagtcggca taccgtttgt 540

|   |      |
|---|------|
| cttgtttggt attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct | 600  |
| ctctatcgct tctgaacccc ggtgcacctg tgccgaaacg caaatgggga aacacccgct | 660  |
| ttttggatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact | 720  |
| gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aaccctact tgacagcaat  | 780  |
| atataaacag aaggaagctg ccctgtctta aacctttttt tttatcarca ttattagctt | 840  |
| actttcataa ttgcgactgg ttccaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga | 900  |
| caacttgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaaacg atgagatttc cttcaatttt | 960  |
| tactgctggt ttattcgcag catcctccgc attagctgct ccagtcaaca ctacaacaga | 1020 |
| agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggc tactcagatt tagaagggga | 1080 |
| tttcgatggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat aacgggttat tgtttataaa  | 1140 |
| tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta tctctcgaga aaagagaggc | 1200 |
| tgaagctgaa ttcgaggttc agcttcagca gtctggacct gagctgaaga agcctggaga | 1260 |
| gacagtcaag atctcctgca aggtctctgg gtataccttc acaaactatg gaatgaactg | 1320 |
| ggtgaagcag gctccaggaa aggttttaa gtggatgggc tggttaaaca cctacactgg  | 1380 |
| agagtcaata tatcctgatg acttcaaggg acggtttgcc ttctcttcgg aaacctctgc | 1440 |
| cagcactgcc tatttgcaga tcaacaacct caaaaatgag gacatggcta catatttctg | 1500 |
| tgcaagaggg gactatggtt acgacgacct tttggactac tggggcaag gaacctcagt  | 1560 |
| caccgtctcc tcagccaaaa ctcgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga | 1620 |
| tgagctgggc atcgcgcaag tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga  | 1680 |
| catgccggtg gagtgggaga gcaacgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc | 1740 |
| cgtgctggac tccgacggct cttcttctct ctacagcaag cttaccgtgt tgggccgag  | 1800 |
| gtggacctg gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctc acaaccacta  | 1860 |
| cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatctcta gaacaaaaac tcatctcaga | 1920 |
| agaggatctg aatagcgcg tcgaccatca tcatcatcat cattgagttt gtageccttag | 1980 |
| acatgactgt tcctcagttc aagttgggca cttacgagaa gaccggtctt gctagattct | 2040 |
| aatcaagagg atgtcagaat gccatttgcc tgagagatgc aggcctcatt tttgatactt | 2100 |
| ttttatttgt aacctatata gtataggatt tttttgtca ttttgttct tctcgtacga   | 2160 |
| gcttgctcct gatcagccta tctcgcagct gatgaatata ttgtggtagg ggtttgggaa | 2220 |
| aatcattcga gtttgatggt ttcttggtta ttcccactc ctcttcagag tacagaagat  | 2280 |
| taagtgagac cttcgtttgt gcagatccaa catccaaaga cgaaagggtg aatgaaacct | 2340 |
| ttttgccatc cgacatccac aggtccattc tcacacataa gtgccaaacg caacaggagg | 2400 |
| ggatacacta gcagcagacc gttgcaaacg caggacctcc actcctcttc tcctcaacac | 2460 |
| ccacttttgc catcgaaaaa ccagcccagt tattgggctt gattggagct cgctcattcc | 2520 |
| aattccttct attaggctac taacaccatg actttattag cctgtctatc ctggccccc  | 2580 |
| tggcgaggtt catgtttggt tatttccgaa tgcaacaagc tccgcattac acccgaacat | 2640 |

cactccagat gagggcttcc tgagtgtggg gtcaaatagt ttcattgttcc ccaaattggcc 2700  
caaaactgac agtttaaacg ctgtcttggg acctaataag acaaaagcgt gatctcatcc 2760  
aagatgaact aagtttggtt cgttgaaatg ctaacggcca gttggtcaaa aagaaacttc 2820  
caaaagtcgg cataccgttt gtcttgtttg gtattgattg acgaatgctc aaaaataatc 2880  
tcattaatgc ttagcgcagt ctctctatcg cttctgaacc ccggtgcacc tgtgccgaaa 2940  
cgcaaatggg gaaacaccgg ctttttggat gattatgcat tgtctccaca ttgtatgctt 3000  
ccaagattct ggtgggaata ctgctgatag cctaacgttc atgatcaaaa ttttaactgtt 3060  
ctaaccctca cttgacagca atatataaac agaaggaagc tgccctgtct taaacctttt 3120  
tttttatcat cattattagc ttactttcat aattgcgact ggttccaatt gacaagcttt 3180  
tgattttaac gacttttaac gacaacttga gaagatcaaa aaacaactaa ttattcgaaa 3240  
cgatgagatt tccttcaatt ttactgctg ttttattcgc agcatcctcc gcattagctg 3300  
ctccagtcaa cactacaaca gaagatgaaa cggcacaat tccggctgaa gctgtcatcg 3360  
gttactcaga tttagaaggg gatttcgatg ttgctgtttt gccattttcc aacagcacia 3420  
ataacgggtt attgtttata aataactacta ttgccagcat tgctgctaaa gaagaagggg 3480  
tatctctcga gaaaagagag gctgaagctg aattcgacat tgtgatgacc caggctgcac 3540  
cctctgtacc tgtcactcct ggagagtcag tatccatctc ctgcaggtct agtaagagtc 3600  
tctcgcatac taatggcaac acttacttgc attggtcctc acagaggcca ggccagtctc 3660  
ctcagctcct gatataatcg atgtccgtcc ttgcctcagg agtcccagac aggttcagtg 3720  
gcagtgggtc aggaactgct ttcacactga gcacagtag agtggaggct gaggatgtgg 3780  
gtgtttttta ctgtatgcaa catctagaat atccgctcac gttcgggtgct gggaccaagc 3840  
tggaaactgaa acgggctcct cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg 3900  
agctgggcat cgcgcaagtc agcctgacct gcctggctcaa aggtcttctat cccagcgaca 3960  
tcgccgtgga gtgggagagc aacgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg 4020  
tgctggactc cgacggctct ttcttctctc acagcaaget taccgtgttg ggccgcaggt 4080  
ggaccctggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca 4140  
cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aagggcgcgc ctgaggtacc tcgagccgcg 4200  
gcggccgcca gctttctaga acaaaaactc atctcagaag aggatctgaa tagcgccgtc 4260  
gaccatcacc atcatcatca ttgagtttgt agccttagac atgactgttc ctcagttcaa 4320  
gttgggcact tacgagaaga ccggtcttgc tagattctaa tcaagaggat gtcagaatgc 4380  
catttgctg agagatgcag gcttcatttt tgatactttt ttatttgtaa cctatatagt 4440  
ataggatttt tttgtcatt ttgtttctc tcgtacgagc ttgctcctga tcagcctacc 4500  
tcgcagctga tgaatatctt gtggtagggg tttgggaaaa tcattcgagt ttgatgtttt 4560  
tcttggattt tcccactcct cttcagagta cagaagatta agtgagacct tcgtttgtgc 4620  
ggatccccca cacaccatag cttcaaatg tttctactcc tttttactc ttccagattt 4680  
tctcggactc cgcgcacgc cgtaccactt caaacaccc aagcacagca tactaaattt 4740



tcctctttc ttctcttagg gtgtcgttaa ttaccctgac taaaggtttg gaaaagaaaa 4800  
 aagagaccgc ctcgtttctt tttcttcgct gaaaaaggca ataaaaattt ttatcacggt 4860  
 tctttttctt gaaatttttt tttttagttt ttttctcttt cagtgcctc cattgatatt 4920  
 taagttaata aacggtcttc aatttctcaa gtttcagttt ctttttctt gttctattac 4980  
 aacttttttt acttcttggt cattagaaag aaagcatagc aatctaactt aaggggagggt 5040  
 gttgacaatt aatcatcggc atagtatatc ggcatagtat aatacgacaa ggtgaggaac 5100  
 taaacatgag ccaagttgac cagtgcctt cgggtgctca ccgcgcgcga cgtcgcggga 5160  
 gcggtcaggt tctggaccga ccggctcggg ttctcccggg acttcgtgga ggacgacttc 5220  
 gccggtgtgg tccgggacga cgtgaccctg ttcatcagcg cgtccagga ccagggtgtg 5280  
 ccggacaaca ccctggcctg ggtgtgggtg cgcggcctgg acgagctgta cgccgagtg 5340  
 tcggaggctg tgtccacgaa cttccgggac gcctccgggc cggccatgac cgagatcggc 5400  
 gagcagccgt gggggcggga gttcgcctg cgcgaccggg ccggcaactg cgtgcacttc 5460  
 gtggccgagg agcaggactg acacgtccga cggcggccca cgggtcccag gcctcggaga 5520  
 tccgtcccc ttttctttg tcgatatcat gtaattagtt atgtcacgct tacattcacg 5580  
 ccctcccc acatccgctc taaccgaaaa ggaaggagtt agacaacctg aagtctaggt 5640  
 ccctatttat tttttatag ttatgttagt attaagaacg ttatttatat ttcaaatttt 5700  
 tcttttttt ctgtacagac gcgtgtacgc atgtaacatt atactgaaaa cttgcttga 5760  
 gaaggttttg ggacgctcga aggctttaat ttgcaagctg gagaccaaca tgtgagcaaa 5820  
 aggccagcaa aagggcagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 5880  
 ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac 5940  
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaagctc ctctgtcgcct ctcctgttcc 6000  
 gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc 6060  
 tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg 6120  
 tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga 6180  
 gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggtg acaggattag 6240  
 cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtgccta actacggcta 6300  
 cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag 6360  
 agttgtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgttg 6420  
 caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatccttga tctttctac 6480  
 ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagatc 6537

<210> 64  
 <211> 7046  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> vector de expresión final que contiene regiones de unión a TLR9 y CD32  
 y secuencia de epítopo

<400> 64  
 agatctaaca tccaaagacg aaaggttgaa tgaaaccttt ttgccatccg acatccacag 60  
 gtccattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atacactagc agcagaccgt 120  
 tgcaaacgca ggacctccac tctcttctc ctcaacaccc acttttgcca tcgaaaaacc 180  
 agcccagtta ttgggcttga ttggagctcg ctcatccaa ttccttctat taggctacta 240  
 acaccatgac tttattagcc tgtctatcct ggccccctg gcgaggttca tgtttgttta 300  
 tttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg 360  
 agtgtggggg caaatagttt catgttcccc aaatggccca aaactgacag tttaaacgct 420  
 gtcttggaac ctaatatgac aaaagcgtga tctcatccaa gatgaactaa gtttggttcg 480  
 ttgaaatgct aacggccagt tggtcaaaaa gaaacttcca aaagtgggca taccgtttgt 540  
 ctgtttgggt attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct 600  
 ctctatcget tctgaacccc ggtgcacctg tgccgaaacg caaatgggga aacacccgct 660  
 ttttgatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact 720  
 gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aaccctact tgacagcaat 780  
 atataaacag aaggaagctg ccctgtctta aaccttttt tttatcatca ttattagctt 840  
 actttcataa ttgcgactgg ttccaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga 900  
 caacttgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaaacg atgagatttc cttcaatttt 960  
 tactgctggt ttattcgcag catctccgc attagctgct ccagtcaaca ctacaacaga 1020  
 agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggg tactcagatt tagaagggga 1080  
 tttcgatggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat aacgggttat tgtttataaa 1140  
 tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta tctctcgaga aaagagaggc 1200  
 tgaagctgaa ttcgaggttc agcttcagca gtctggacct gagctgaaga agcctggaga 1260  
 gacagtcaag atctcctgca aggcttctgg gtataccttc acaaactatg gaatgaactg 1320  
 ggtgaagcag gctccaggaa agggtttaa gtggatgggc tggttaaaca cctacactgg 1380  
 agagtcaata tctcctgatg acttcaaggg acggtttgcc ttctcttcgg aaacctctgc 1440  
 cagcactgcc tatttgcaga tcaacaacct caaaaatgag gacatggcta catatttctg 1500  
 tgcaagaggg gactatggtt acgacgacct tttggactac tggggtcaag gaacctcagt 1560  
 caccgtctcc tcagccaaaa ctcgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga 1620  
 tgagctgggc atcgcgcaag tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga 1680  
 catcgccgtg gagtgggaga gcaacgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc 1740  
 cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag cttaccgtgt tgggcccag 1800  
 gtggaccctg gggaaactct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta 1860  
 cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatctcta gaacaaaaac tcatctcaga 1920  
 agaggatctg aatagcggc tcgaccatca tcatcatcat cattgagttt gtagccttag 1980  
 acatgactgt tctcagttc aagtgggca cttacgagaa gaccggtctt gctagattct 2040

aatcaagagg atgtcagaat gccatttgcc tgagagatgc aggcttcatt tttgatactt 2100  
ttttatttgt aacctatata gtataggatt tttttgtca ttttgttct tctcgtacga 2160  
gcttgctcct gatcagccta tctcgcagct gatgaatatac ttgtggtagg ggtttgggaa 2220  
aatcattcga gtttgatggt tttcttggtta tttcccactc ctcttcagag tacagaagat 2280  
taagtgagac cttcgtttgt gcagatccaa catccaaaga cgaaagggtg aatgaaacct 2340  
ttttgccatc cgacatccac aggtccattc tcacacataa gtgccaaacg caacaggagg 2400  
ggatacacta gcagcagacc gttgcaaacg caggacctcc actcctcttc tcctcaacac 2460  
ccacttttgc catcgaaaaa ccagcccagt tattgggctt gattggagct cgctcattcc 2520  
aattccttct attaggctac taacaccatg actttattag cctgtctatc ctggccccc 2580  
tggcgagggt catgtttgtt tatttccgaa tgcaacaagc tccgcattac acccgaacat 2640  
cactccagat gagggcttcc tgagtgtggg gtcaaatagt ttcattgtcc ccaaattggcc 2700  
caaaactgac agtttaaacg ctgtcttga acctaatag acaaaagcgt gatctcatcc 2760  
aagatgaact aagtttggtt cgttgaaatg ctaacggcca gttggtcaaa aagaaacttc 2820  
caaaagtcgg cataccgttt gtcttgttg gtattgattg acgaatgctc aaaaataatc 2880  
tcattaatgc ttagcgcagt ctctctatcg cttctgaacc ccggtgcacc tgtgccgaaa 2940  
cgcaaattgg gaaacaccg ctttttgat gattatgcat tgtctccaca ttgtatgctt 3000  
ccaagattct ggtgggaata ctgctgatag cctaacttc atgatcaaaa ttaactgtt 3060  
ctaaccctta cttgacagca atatataaac agaaggaagc tgcctgtct taaaccttt 3120  
ttttatcat cattattagc ttactttcat aattgcgact ggtccaatt gacaagcttt 3180  
tgattttaac gactttaac gacaactga gaagatcaaa aaacaactaa ttattcgaaa 3240  
cgatgagatt tcctcaatt tttactgctg ttttattcgc agcatcctcc gcattagctg 3300  
ctccagtcaa cactacaaca gaagatgaaa cggcacaaat tccggctgaa gctgtcatcg 3360  
gttactcaga tttagaaggg gatttcgatg ttgctgtttt gccattttcc aacagcacia 3420  
ataacgggtt attgtttata aatactacta ttgccagcat tgctgctaaa gaagaagggg 3480  
tatctctcga gaaaagagag gctgaagctg aattcgacat tgtgatgacc caggctgcac 3540  
cctctgtacc tgtcactcct ggagagtcag tatccatctc ctgcaggctc agtaagagtc 3600  
tcctgcatac taatggcaac acttacttgc attggttcct acagaggcca ggccagtctc 3660  
ctcagctcct gatataatcg atgtccgtcc ttgcctcagg agtcccagac aggttcagtg 3720  
gcagtgggtc aggaactgct ttcacactga gcatcagtag agtggaggct gaggatgtgg 3780  
gtgtttttta ctgtatgcaa catctagaat atccgctcac gttcggtgct gggaccaagc 3840  
tggaactgaa acgggctcct cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg 3900  
agctgggcat cgcgcaagtc agcctgacct gcctgggtcaa aggccttctat cccagcgaca 3960  
tcgccgtgga gtgggagagc aacgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg 4020  
tgctggactc cgacggctct ttcttctct acagcaagct taccgtgttg ggccgcaggt 4080  
ggaccctggg gaacgtcttc tcatgtccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca 4140

ES 2 483 615 T3

cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aagggcgcg cctccggatgc caaatattacc 4200  
 cgccaaacgc gaacaagatc agagaggctt tgcaatcttg caggaggccc aatgcgcaga 4260  
 gattcggcat atccaactac tgccagatct accccccata cgatgggctg acaatcatac 4320  
 agcgtgataa cggctatcag cctaactacc acgccgtgaa catcgtcggc tacgagaatg 4380  
 tcgtggttac tgtgaaggta atgggcatg acggggttct agcttgcgcc atagctacca 4440  
 agtacacttg gaacgtaccc aaaattgctc cgaaaagtga aaacgtcgtg gtgaccataa 4500  
 gggaggcatt ggctcaacct caagatact gcagacacta ctggacgccc tgcataatcc 4560  
 accgtggtaa accctttcaa cttgaggcag tgttcgaagc taacaggacg gtaacgccaa 4620  
 ttcgtatgca aggtgggtgc gggctctgtt gggctttttc tgggtgtggct gctactgaat 4680  
 aagggcgccc tgaggtagct cgagccgctg cggccgcccag ctttctagaa caaaaactca 4740  
 tctcagaaga ggatctgaat agcgcctcgc accatcatca tcatcatcat tgagtttga 4800  
 gccttagaca tgactgttcc tcagttcaag ttgggcactt acgagaagac cggctctgct 4860  
 agattcctaat caagaggatg tcagaatgcc atttgcctga gagatgcagg cttcattttt 4920  
 gatacttttt tatttgtaac ctatatagta taggattttt tttgtcattt tgtttcttct 4980  
 cgtacgagct tgctcctgat cagcctatct cgcagctgat gaatatcttg tggtaggggt 5040  
 ttgggaaaat cattcgagtt tgatgttttt cttggtattt cccactctc ttcagagtac 5100  
 agaagattaa gtgagacctt cgtttgtgct gatccccac acaccatagc ttcaaatgt 5160  
 ttctactcct ttttactct tccagatttt ctcggactcc gcgcatcgcc gtaccacttc 5220  
 aaaacaccca agcacagcat actaaatttt ccctctttct tctctaggg tgtcgttaat 5280  
 taccgtagct aaaggtttg aaaagaaaa agagaccgcc tcgtttcttt ttcttcgctg 5340  
 aaaaggcaa taaaaatttt taccagttt cttttcttg aaatttttt ttttagtttt 5400  
 tttctcttc agtgacctcc attgatattt aagttaataa acggtcttca atttctcaag 5460  
 tttcagttc atttttcttg ttctattaca actttttta cttcttgctt attagaaaga 5520  
 aagcatagca atctaacta aggggctggt ttgacaatta atcatcgga tagtatatcg 5580  
 gcatagtata atacgacaag gtgaggaact aaaccatggc caagttgacc agtgccgttc 5640  
 cgggtgctcac cgcgctgac gtcgccggag cggctcagtt ctggaccgac cggctcgggt 5700  
 tctcccggga cttcgtggag gacgacttcg ccgggtgtgt ccgggacgac gtgaccctgt 5760  
 tcatcagcgc ggtccaggac caggtggtgc cggacaacac cctggcctgg gtgtgggtgc 5820  
 gcggcctgga cgagctgtac gccgagtgtt cggaggtcgt gtccacgaac ttccgggacg 5880  
 cctccgggcc ggccatgacc gagatcggcg agcagccgtg ggggcgggag ttcgccctgc 5940  
 gcgaccggc cggcaactgc gtgacttcg tggccgagga gcaggactga cacgtccgac 6000  
 ggcggccac gggctccagg cctcggagat ccgtccccct tttcctttgt cgatatcatg 6060  
 taattagtta tgtcacgctt acattcacgc cttccccca catccgtctt aaccgaaaag 6120  
 gaaggagtta gacaacctga agtctaggtc cctatttatt ttttatagt tatgttagta 6180  
 ttaagaacgt ttttatatt tcaaattttt ctttttttc tgtacagacg cgtgtacgca 6240

tgtaacatta tactgaaaac cttgcttgag aaggttttgg gacgctcgaa ggctttaatt 6300  
 tgcaagctgg agaccaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag 6360  
 gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga 6420  
 cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct 6480  
 ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc 6540  
 tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg 6600  
 gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc 6660  
 tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca 6720  
 ctggcagcag cactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag 6780  
 ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct 6840  
 ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttgtagct cttgatccgg caaacaacc 6900  
 accgctggta gcggtggtt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga 6960  
 tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa cgaaaactca 7020  
 cgtaaggga ttttggcat gagatc 7046

<210> 65  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> humano

<400> 65

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe  
 1 5 10

<210> 66  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> humano

<400> 66

aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc atcttc 36

**REVINDICACIONES**

- 5 1. Una preparación farmacéutica que comprende una molécula o complejo molecular capaz de unirse a TLR9 y a CD32, que comprende al menos un epítipo de al menos un antígeno, en la que la parte de unión a CD32 de la molécula o complejo molecular se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, dominios de proteínas y péptidos, y la parte de unión a TLR9 es un ácido nucleico.
2. La preparación farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que el epítipo es un epítipo de célula T.
3. La preparación farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada por que el epítipo se obtiene o produce a partir de al menos una cadena de ADN que contiene un epítipo de célula T de un antígeno o un péptido sintético.
- 10 4. La preparación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que el epítipo se selecciona del grupo que consiste en alergenos, específicamente alergenos en dermatitis atópica, asma alérgico, rinitis alérgica o conjuntivitis alérgica.
5. La preparación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que el epítipo se aísla de antígenos completos, antígenos desnaturalizados o antígenos modificados para prevenir la unión a IgE.
- 15 6. La preparación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que comprende al menos un anticuerpo o derivado o fragmento de éste.
7. La preparación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que la parte de unión a CD32 es al menos parte de un anticuerpo anti-CD32 o derivado o fragmento de éste.
8. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en inmunoterapia activa.
9. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, para el tratamiento o profilaxis de las alergias.
- 20 10. Proceso para producir una molécula o complejo molecular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, usando técnica recombinante, en el que los genes que codifican las estructuras de unión para TLR9, CD32 y el epítipo se construyen en un vector y se expresan en una célula huésped.
11. Proceso para producir una molécula o complejo molecular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, usando entrecruzamiento químico.