

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 759**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 39/36 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2010 E 10704399 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2393830**

54 Título: **Péptidos de plantas herbáceas para vacunas**

30 Prioridad:

05.02.2009 GB 0901928
05.02.2009 GB 0901927
20.07.2009 GB 0912578
14.08.2009 WO PCT/GB2009/001995
12.10.2009 GB 0917871

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2015

73 Titular/es:

CIRCASSIA LIMITED (100.0%)
The Oxford Science Park
Oxford OX4 4GA, GB

72 Inventor/es:

HAFNER, ROD;
LAIDLER, PAUL;
LAYTON, GUY y
LARCHE, MARK

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 532 759 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

Péptidos de plantas herbáceas para vacunas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para prevenir o tratar la alergia a las plantas herbáceas.

Antecedentes de la invención

10 El reconocimiento de antígenos por las células T necesita células presentadoras de antígeno (APC) para presentar fragmentos de antígeno (péptidos) en su superficie celular en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las células T utilizan sus receptores de células T específicos de antígeno (TCR) para reconocer los fragmentos de antígeno que presentan las APC. Tal reconocimiento actúa como un desencadenante del sistema inmunitario para generar una variedad de respuestas para erradicar el antígeno que se ha reconocido.

15 El reconocimiento de antígenos externos por el sistema inmunitario de un organismo, tal como el hombre, puede dar como resultado en algunos casos, enfermedades, conocidas como afecciones atópicas. Ejemplos de las últimas son las enfermedades alérgicas que incluyen el asma, dermatitis alérgica y rinitis alérgica. En este grupo de enfermedades, los linfocitos B generan anticuerpos de clase IgE (en seres humanos) que se unen a los antígenos generados externamente, a los que se denominan en este contexto alérgenos ya que estas moléculas producen una respuesta alérgica. La producción de IgE específicas de alérgenos depende de los linfocitos T que se activan también (son específicos de) por el alérgeno. Los anticuerpos IgE específicos del alérgeno se unen a las superficies de las células tales como los basófilos y los mastocitos por medio de la expresión en estas células de receptores para IgE en su superficie.

20 El entrecruzamiento de las moléculas de IgE en la superficie por el alérgeno da como resultado la desgranulación de estas células efectoras produciendo la liberación de mediadores inflamatorios tales como la histamina, 5-hidroxitriptamina y mediadores lipídicos tales como sulfuroleucotrienos. Además de los casos dependientes de la IgE, ciertas enfermedades alérgicas tales como el asma se caracterizan por acontecimientos independientes de la IgE.

25 Las enfermedades alérgicas mediadas por IgE se tratan normalmente con agentes que proporcionan un alivio sintomático o prevención. Ejemplos de tales agentes son antihistamínicos, agonistas β_2 , y glucocorticosteroides. Además, algunas enfermedades mediadas por IgE se tratan por procedimientos de desensibilización que implican la inyección periódica de componentes o extractos de alérgenos. Los tratamientos de desensibilización pueden inducir una respuesta de IgG que compite con la IgE por el alérgeno, o pueden inducir un supresor específico de células T que bloquea la síntesis de IgE dirigida contra el alérgeno. Esta forma de tratamiento no siempre es eficaz y tiene el riesgo de provocar graves efectos secundarios, particularmente un choque anafiláctico general. Esto puede ser fatal a menos de que se reconozca inmediatamente y se trate con adrenalina. Un tratamiento terapéutico disminuyera o eliminara la respuesta alérgica-inmunitaria no deseada contra un alérgeno particular, sin que altere la reactividad a otros antígenos ajenos o que desencadene una respuesta alérgica por sí mismo tendría un gran beneficio para los individuos alérgicos.

35 Los alérgenos de las plantas herbáceas se reconocen universalmente como una causa principal de enfermedades alérgicas en seres humanos y animales, que incluyen el asma, rinitis alérgica y dermatitis alérgica. Las proteínas presentes en el polen de las plantas herbáceas son particularmente importantes. Por ejemplo, aproximadamente el 90% de los afectados por fiebre del heno son alérgicos al polen de plantas herbáceas. Fiebre del heno es un término común para una forma de alergia estacional que se caracteriza por estornudos, goteo de nariz y picor de ojos. La expresión "fiebre del heno" aparece porque esta forma de enfermedad alérgica es más prevalente durante "la estación de cosecha del heno", que corresponde con la estación de floración de la mayoría de las plantas herbáceas, cuando las plantas herbáceas liberan las mayores cantidades de polen. Es particularmente prevalente en verano, típicamente desde finales de mayo a finales de agosto (en el Hemisferio Norte).

40 Se ha calculado que para los adultos en los Estados Unidos, la fiebre del heno es la 5ª enfermedad crónica y una causa principal de absentismo laboral, que resulta en cerca de 4 millones de días laborales perdidos cada año, lo que da como resultado un coste total de más de 700 millones de \$ de pérdidas totales de productividad. Las alergias también son la afección crónica que se comunica más frecuentemente en niños, limitando sus actividades en más del 40% de ellos. Cada año, las alergias suponen más de 17 millones de visitas externas en los Estados Unidos; las alergias estacionales como la fiebre del heno suponen más de la mitad de estas visitas por alergia.

45 Un tratamiento terapéutico o preventivo sería por lo tanto de gran beneficio para los seres humanos que padecen o están en riesgo de padecer alergia a plantas herbáceas.

65

Sumario de la invención

Los alérgenos del polen de plantas herbáceas se clasifican típicamente en grupos, con la mayoría de especies que expresan al menos un polen alergénico en cada grupo. Ejemplos de los grupos incluyen:

- el Grupo 1 de alérgenos de polen de plantas herbáceas, que incluye, por ejemplo, las proteínas Lol p 1 del Raigrás (*Lolium perenne*) y Phi p 1 de la hierba Timotea (*Phleum pratense*); y
- el Grupo 5 de alérgenos de polen de plantas herbáceas, que incluyen, por ejemplo, las proteínas Lol p 5a y Lol p 5b del Raigrás, Phi p 5 de la hierba Timotea, y Cyn d 5 de la Grama común (*Cynodon dactylon*).

Los presentes inventores han descubierto que ciertos fragmentos peptídicos derivados de los alérgenos principales de los pólenes de especies herbáceas son particularmente útiles para desensibilizar individuos a esos alérgenos. Las combinaciones polipeptídicas de la invención se han seleccionado por su capacidad para unirse a muchas moléculas del MHC Clase II, y producir proliferación de células T con una mínima liberación de histamina. Las composiciones y formulaciones de la invención pueden, por lo tanto, proporcionarse a individuos para prevenir o tratar la alergia a las plantas herbáceas por inducción de tolerancia.

Los péptidos descritos en el presente documento se seleccionaron como epítomos de células T unidos a MHC clase II por medio del uso de análisis *in silico* para predecir las interacciones péptido-MHC y ensayos de unión de MHC clase II. Se identificaron péptidos adicionales por homología. Los péptidos descritos en el presente documento y las combinaciones de péptidos de la invención se seleccionaron además basándose en ensayos de respuesta de células T *in vitro*.

Las combinaciones de péptidos de la invención, sin embargo, proporcionan una amplia cobertura de eficacia sobre la población humana por la dirección hacia múltiples moléculas diferentes de MHC. Una vacuna formulada con los péptidos descritos en el presente documento tendrían por lo tanto una amplia utilidad.

El trabajo de los inventores ha producido combinaciones de péptidos con las siguientes características:

- la combinación se une a muchas moléculas diferentes del MHC Clase II
- la combinación produce una estimulación significativa de liberación de citoquinas en individuos alérgicos a plantas herbáceas.
- los péptidos de las combinaciones no producen una liberación significativa de histamina.

Las combinaciones se seleccionan por un análisis extenso de secuencias de epítomos de plantas herbáceas para identificar los péptidos centrales que tienen propiedades de unión al MHC particularmente buenas y perfiles de respuesta de citoquinas en individuos alérgicos a las plantas herbáceas. Las combinaciones comprenden un centro de tres de tales péptidos, cada uno de los cuales se ha seleccionado a partir de las plantas herbáceas más prevalentes, Timotea, Raigrás perenne y Grama Común.

Al proporcionar un grupo central de péptidos que representan las tres plantas herbáceas más prevalentes, preferentemente un grupo central de cuatro o más polipéptidos individuales diferentes en la misma composición proporciona una variedad de epítomos que se unen al MHC, y se construye con redundancia para permitir la naturaleza polimórfica del MHC. Al proporcionar un grupo central de la invención, preferentemente cuatro o más polipéptidos individuales diferentes que tienen propiedades de unión al MHC y perfiles de respuesta de citoquinas particularmente buenos también se proporcionan múltiples epítomos de células T, permitiendo el reclutamiento de una amplia variedad de especificidades de células T para la inducción de tolerancia. Por lo tanto, una composición de la invención tiene efectos beneficiosos aditivos sobre el uso de polipéptidos únicos. Los inventores han demostrado también que las composiciones de la invención eran capaces de proporcionar una cobertura extremadamente alta en una población polimórfica de estudio según se mide por la respuesta de citoquinas.

En consecuencia, la presente invención proporciona una composición adecuada para su uso en la prevención o tratamiento de la alergia a las plantas herbáceas, cuya composición comprende:

- (a) el polipéptido consiste en la secuencia KIPAGELQIIDKIDA, o una variante de la misma,
- (b) el polipéptido consiste en la secuencia SGKAFGAMAKKGQED, o una variante de la misma, y
- (c) el polipéptido consiste en la secuencia LKKAVTAMSEAEK, o una variante de la misma,

donde dicha variante es un polipéptido más largo de hasta 30 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia especificada en (a), (b) o (c).

Descripción de las secuencias mencionadas en el presente documento

Las SEC ID N^{os} 1 a 73 proporciona las secuencias de polipéptidos como se expone en las Tablas 2 a 4. Las SEC ID N^{os} 1 a 27 que corresponden a los péptidos derivados del Grupo 1 de alérgenos de plantas herbáceas. Las SEC ID N^{os} 28 a 73 que corresponden a los péptidos derivados del Grupo 5 de alérgenos.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a péptido que se pueden utilizar para la inducción de tolerancia. Tales péptidos se pueden derivar de cualquiera de los alérgenos de plantas herbáceas descritos en el presente documento o ser variantes de los mismos como se describe posteriormente. Una dificultad asociada con las estrategias de desensibilización basada en la inmunización peptídica descansa en cómo seleccionar un tamaño y región apropiados del alérgeno como base del péptido que se va a utilizar en la inmunización. El tamaño del péptido de elección es crucial. Si el péptido es demasiado pequeño, la vacuna no sería eficaz para inducir una respuesta inmunológica. Si el péptido es demasiado grande, o si el antígeno completo se introduce en un individuo, hay el riesgo de inducir reacciones adversas, tales como la anafilaxia, que puede ser fatal.

Los polipéptidos utilizados en la invención se han seleccionado para mantener la especificidad de las células T mientras que son lo suficientemente pequeños de tamaño para no poseer una significativa estructura terciaria que les capacitara para mantener la conformación de un epítopo que se une a IgE de molécula completa. Los polipéptidos utilizados en la invención por tanto no inducen un entrecruzamiento significativo de moléculas de IgE específicas adyacentes en células tales como mastocitos y basófilos y en consecuencia no producen una liberación significativa de histamina.

Una ventaja de la invención es la capacidad de los péptidos para dirigirse ampliamente a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Los receptores de células T (TCR) son altamente variables en su especificidad. La variabilidad se genera, como en las moléculas de anticuerpo, por medio de acontecimientos de recombinación genética en la célula. Los TCR reconocen antígenos en forma de péptidos cortos unidos a moléculas codificadas por genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Estos productos genéticos son las mismas moléculas que dan lugar a "tipos tisulares" que se utilizan en los trasplantes y también se denominan moléculas de Antígeno Leucocitario Humano (HLA) cuyas expresiones se pueden utilizar de manera intercambiable. Las moléculas de MHC individuales poseen hendiduras de unión que, debido a su forma y carga son capaces de unirse solamente a un número limitado de péptidos. Los péptidos unidos a una molécula MHC puede no unirse necesariamente a otras moléculas MHC.

Cuando una molécula de proteína tal como un antígeno o alérgeno es captado por células presentadoras de antígeno tales como los linfocitos B, células dendríticas, monocitos y macrófagos, la molécula se degrada enzimáticamente en la células. El proceso de degradación da lugar a fragmentos peptídicos de la molécula, que, si tienen el tamaño, carga y forma adecuados, se pueden unir entonces en la hendidura de unión peptídica de ciertas moléculas del MHC y ser presentadas posteriormente en la superficie de las células presentadoras de antígeno en cantidades suficientes para que puedan activar células T que tienen los receptores de célula T específico de MHC / péptido adecuados.

Debido a la naturaleza polimórfica del MHC, los individuos en una población exógama tal como el hombre expresarán diferentes combinaciones de moléculas de MHC en sus superficies celulares. Como las diferentes moléculas del MHC se pueden unir con diferentes péptidos en la misma molécula basándose en el tamaño, carga y forma del péptido, diferentes individuos presentaran un repertorio diferente de péptidos unidos a sus moléculas del MHC. La identificación de epítopos de péptidos que se unen al MHC en una población exogámica tal como el hombre es más difícil que en animales endogámicos (tal como ciertas líneas de ratones de laboratorio). Basándose en la expresión diferencial del MHC entre individuos y las diferencias inherentes de la unión peptídica y la presentación que conllevan, es improbable que un único péptido se pueda identificar para su uso en terapias de desensibilización en el hombre.

Como se trata posteriormente, la invención afronta este problema proporcionando composiciones que se basan en más de un péptido, es decir, combinaciones de péptidos. Estas combinaciones se basan en grupos centrales de péptidos identificados experimentalmente que muestran sorprendentemente fuertes respuestas en pacientes alérgicos a las plantas herbáceas cuando se ensayan individualmente, y particularmente cuando se proporcionan en combinación. Estos subgrupos centrales de péptidos tienen propiedades ventajosas cuando se incluyen en vacunas con péptidos de plantas herbáceas.

Los grupos centrales comprenden al menos un péptido derivado de la hierba Timotea, al menos un péptido derivado del Raigrás perenne y al menos un péptido derivado de la Grama común, mostrando cada péptido. características particularmente buenas de respuesta individual. La inclusión de tales péptidos en combinación permite cubrir las tres plantas herbáceas más prevalentes, y adicionalmente extiende la cobertura a otras plantas herbáceas por homología, como se trata más posteriormente.

Además, un grupo central puede comprender al menos cuatro péptidos que se seleccionan de péptidos que tienen las características clasificadas más altas de respuesta individual del grupo ensayado, y que además muestran que proporcionan características de respuesta óptimas para una vacuna de plantas herbáceas cuando se proporciona juntos en la combinación.

Tales combinaciones de péptidos comprenden al menos un péptido derivado d un alérgeno de plantas herbáceas del Grupo I o una variante del mismo y al menos un péptido derivado de un alérgeno de planta herbácea del Grupo V o

- una variante del mismo. La clasificación de alérgenos de plantas herbáceas como alérgenos de plantas herbáceas del Grupo I y Grupo V se conoce bien por los expertos en la técnica, y se trata más en el presente documento. Un Grupo I de alérgenos de plantas herbáceas preferido es el alérgeno de la Grama común, Cyn d 1. Un alérgeno de plantas herbáceas del Grupo V preferido es el alérgeno del Raigrás, Lol p 5. La invención se refiere a una composición que comprende al menos un péptido derivado de Cyn d1 o una variante del mismo y al menos un péptido derivado de Lol p 5 o una variante del mismo. Las composiciones basadas en combinaciones de péptidos Cyn d 1 y Lol p 5 o variantes de los mismos como se trata más posteriormente.
- Los péptidos descritos en el presente documento comprenden, consisten en, o esencialmente consisten en las secuencias que se muestran en cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73. También se describen en el presente documento las variantes de estos péptidos específicos. Las variantes pueden comprender, consistir en, o esencialmente consistir en secuencias que son fragmentos de o cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73 o de homólogas de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73.
- Se describe en el presente documento una composición adecuada para su uso en la prevención o tratamiento de la alergia al polen de plantas herbáceas por inducción de tolerancia que comprenden:
- (a) al menos uno de los polipéptidos Tim07B (KIPAGELQIIDKIDA), Tim 10B (KYTVFETALKKAITAMSE), Tim 04A (WGAIWRIDTPDKL), Tim 07G (FKVAATAANAAPANDK), o una variante de cualquiera de los mismos;
 - (b) al menos uno de los polipéptidos Ber01 (SGKAFGAMAKKGQED), Ber02 (FIPMKSSWGA), Ber02C (KSSWGAIWRIDPKKPLK), Ber 02B KDSDEFIPMKSSWGAIWR, o una variante de cualquiera de los mismos; y
 - (c) al menos uno de los polipéptidos Bio04A (LKKAVTAMSEAEK), Rye09B (PEVKYAVFEAALTKAIT), Bio02A (KYDAYVATLTEALR), Bio03A (KFIPTLVAAVKQAYAAKQ), Rye 08A (ETYKFIPSLEAAVKQAY), Rye 05C (NAGFKA AVAAAANAPPK), o una variante de cualquiera de los mismos,
- En los que dichas variantes es un polipéptido más largo de hasta 30 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia del correspondiente polipéptido especificado en (a), (b) o (c).
- La composición de la invención se selecciona de acuerdo con los puntos (a) a (c) anteriores y comprende un mínimo de tres polipéptidos, un primer polipéptido que es Tim07B o una variante del mismo, un segundo polipéptido que es Ber01 o una variante del mismo, y un tercer polipéptido que es Bio04A o una variante del mismo. Preferentemente, la composición anterior comprende además del centro de tres polipéptidos un cuarto polipéptido de (a), (b), o (c) o una variante de cualquiera de los mismos. La composición puede comprender cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más polipéptidos de (a), (b) o (c) o variantes de los mismos.
- En algunos aspectos, la composición puede comprender dos, tres, cuatro o más polipéptidos de (a) o variantes de los mismos. En aspectos adicionales, la composición puede comprender dos, tres, cuatro o más polipéptidos de (b) o variantes de los mismos. En otros aspectos la composición puede comprender dos, tres, cuatro, cinco, seis o más polipéptidos de (c) o variantes de los mismos. Estas selecciones se someten a la composición que comprenden el polipéptido Tim07B o una variante del mismo, el polipéptido Ber01 o una variante del mismo, y el polipéptido Bio04A o una variante del mismo.
- La composición puede comprender al menos dos polipéptidos seleccionados de entre el grupo (a) o variantes de los mismos, al menos dos polipéptidos que se seleccionan de entre el grupo (b) o variantes de los mismos y al menos dos polipéptidos que se seleccionan de entre el grupo (c) o variantes de los mismos.
- Las composiciones pueden ser adecuadas para su uso en la prevención o tratamiento de la alergia al polen de plantas herbáceas por inducción de tolerancia.
- Todas las composiciones anteriores basadas en (a) a (c) puede comprender además polipéptidos que se seleccionan de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73 o variantes de las mismas no seleccionados previamente de acuerdo con (a) a (c).
- También se describe en el presente documento es una composición adecuada para su uso en la prevención o el tratamiento de la alergia al polen de plantas herbáceas por inducción de tolerancia que comprende al menos cuatro polipéptidos diferentes que se seleccionan de entre:
- (a) KIPAGELQIIDKIDA (Tim07B) o una variante del mismo;
 - (b) SGKAFGAMAKKGQED (Ber01) o una variante del mismo;
 - (c) LKKAVTAMSEAEK (Bio04A) o una variante del mismo;
 - (d) PEVKYAVFEAALTKAIT (Rye09B) o una variante del mismo;
 - (e) FIPMKSSWGA (Ber02) o una variante del mismo;
 - (f) KSSWGAIWRIDPKKPLK (Ber02C) o una variante del mismo;
 - (g) KFIPTLVAAVKQAYAAKQ (Bio03A) o una variante del mismo; y
 - (h) KYDAYVATLTEALR (Bio02A) o una variante del mismo;

en que dicha variante es un péptido más largo de hasta 30 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia del polipéptido correspondiente especificado en (a) a (h).

5 La composición por lo tanto comprende un mínimo de cuatro polipéptidos, seleccionándose cada uno de dichos polipéptidos de entre los polipéptidos de (a) a (h) o variantes de los mismos. La composición anterior puede comprender polipéptidos adicionales de (a) a (h) o una variante de cualquiera de los mismos, tales como cinco, seis, siete, ocho o más polipéptidos de (a) a (h) o variantes de los mismos.

10 Una composición de la invención se puede seleccionar de acuerdo con (a) a (h) anterior, siempre que comprenda el polipéptido Tim07B o una variante del mismo, el polipéptido Ber01 o una variante del mismo, y el polipéptido Bio04A o una variante del mismo.

15 Las composiciones anteriores que se seleccionan de (a) a (h) comprende preferentemente al menos cuatro polipéptidos diferentes (a) a (h) o comprende al menos cuatro variantes de cada uno que corresponden a secuencias originales o de línea de bases de (a) a (h) diferentes. Por lo tanto, las composiciones se seleccionan típicamente basándose en cuatro secuencias de epítomos diferentes de origen.

20 Todas las composiciones anteriores que se basan en (a) a (h) pueden por tanto comprender más polipéptidos seleccionados de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73 o variantes de los mismos no seleccionados previamente de acuerdo con (a) a (h). Todas las selecciones se someten a la composición que comprenden al menos cuatro polipéptidos que se seleccionan de entre (a) a (h) o variantes de los mismos.

25 Opcionalmente, cualquier composición de polipéptidos específicos descritos en el presente documento pueden comprender más polipéptidos hasta un total de catorce polipéptidos únicos. Los polipéptidos adicionales se relacionarán típicamente con (es decir, son típicamente homólogos y/o fragmentos de) las otras secuencias, es decir las SEC ID N^{os} 1 a 73, no están entre los polipéptidos ya seleccionados. Los péptidos adicionales son típicamente variantes funcionales de uno de los péptidos de las SEC ID N^{os} 1 a 73. Los péptidos adicionales pueden ser idénticos a cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73. La composición puede por lo tanto comprender hasta catorce polipéptidos diferentes como se proporciona en cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73, siempre que al menos tres de los polipéptidos se seleccionen de entre Tim07B o una variante del mismo, Ber01 o una variante del mismo, y Bio04A o una variante del mismo. Sin embargo, los polipéptidos adicionales opcionales no tienen que ser un 100% idénticos a cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73. Preferentemente son al menos idénticos en un 65% a al menos 9 (por ejemplo, al menos 10, 11, 12 o 13) o más aminoácidos contiguos de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73, que no se hayan seleccionado ya de entre los al menos tres polipéptidos. Estos aminoácidos contiguos pueden comprender un epítomo MHC clase II, por ejemplo que se une a cualquiera de las moléculas MHC mencionadas en el presente documento.

40 La invención también proporciona composiciones y formulaciones que comprenden los polipéptidos de la invención para su uso en la prevención o tratamiento de la alergia a las plantas herbáceas induciendo tolerancia. Tal inducción de tolerancia será típicamente a un epítomo (por ejemplo, un epítomo de célula T que se une al MHC clase II) presente en cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73.

45 Una composición de la invención puede ser una formulación farmacéutica que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La formulación farmacéutica puede utilizarse en un método para prevenir o tratar la alergia a las plantas herbáceas.

Especies herbáceas

50 Las especies herbáceas Raigrás (*Lolium perenne*), Timotea (*Phleum pratense*) y Grama común (*Cynodon dactylon*) son responsables de una alta proporción de la alergia a plantas herbáceas en todo el mundo, particularmente las alergias asociadas con el polen de plantas herbáceas, tales como la fiebre del heno. Otras especies herbáceas importantes incluyen el Holco (*Holcus lanatus*), Dáctilo (*Dactylis glomerata*), Alpiste (*Phalaris canariensis*) y Poa de los prados/pasto azul de Kentucky (*Poa pratensis*).

55 El Raigrás es una de las plantas herbáceas más comunes del mundo, y se utiliza ampliamente como fuente de alimentación animal. ES nativa de Europa, pero se ha introducido en todos los continentes del mundo y es común en todas las zonas templadas. Puede florecer durante todo el verano, pero típicamente entre mayo y julio en el hemisferio norte. El raigrás se adapta bien a climas templados húmedos, suaves, y crece mejor en suelos bastante pesados, ricos, húmedos. También crece bien en suelos ligeros bien abonados con suficiente humedad. NO tolera la sombra y necesita un suelo bien drenado. El raigrás crece típicamente en localizaciones con un pH del suelo que varía de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, aunque puede tolerar un intervalo desde aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8,5, preferentemente con una precipitación anual en el intervalo de 21 a aproximadamente 180 cm.

65 La Timotea es otra de las plantas herbáceas más comunes del mundo y es una fuente primaria de alimentación animal. Es nativa y se dispersa por la mayoría de Europa, Norte de África y norte de Asia. Se ha introducido y está

dispersa en América del Norte y del Sur, Sudáfrica y Australia. La hierba Timotea crece típicamente en localizaciones con una precipitación anual en el intervalo de aproximadamente 35 a aproximadamente 180 cm., un intervalo de temperatura anual de aproximadamente 4 a aproximadamente 22 °C, y un pH del suelo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8. Se adapta mejor a un clima fresco, húmedo, templado, creciendo bien en suelos pesados, profundos y húmedos o incluso mojados. La temperatura óptima para el crecimiento es de 18 ° - 21 °C variando con temperaturas día/noche de 15 °/10 °C y 21 °/15 °C. La estación de floración de la Timotea se limita típicamente a principios del verano y el polen de Timotea es una causa principal de la alergia a plantas herbáceas durante esta estación. En los estudios, hasta el 21% de los pacientes con rinitis alérgica u otros síntomas se ha encontrado ser en respuesta al polen de Timotea.

La grama común típicamente crece en localizaciones con una precipitación anual de aproximadamente 9 a aproximadamente 429 cm, una variación de temperatura anual de aproximadamente 5 a aproximadamente 28 °C, y un pH del suelo en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 8,5, preferentemente aproximadamente 6 a aproximadamente 7. La estación de floración de la Grama común es típicamente a finales del verano (agosto a octubre en el hemisferio norte). Las plantas de grama común producen altas cantidades de polen y son por lo tanto una causa principal de la fiebre del heno. Las plantas de grama común también se ha informado que causan dermatitis de contacto. La grama común crece ampliamente por todo el mundo, predominantemente en climas cálidos, y se encuentra típicamente entre las latitudes de aproximadamente 30 ° norte y aproximadamente 30 ° sur.

Fragmentos peptídicos del Grupo 1 y Grupo 5 de alérgenos del polen de plantas herbáceas

Los alérgenos principales de las plantas herbáceas incluyen el Grupo 1 de alérgenos de plantas herbáceas y el Grupo 5 de alérgenos de plantas herbáceas. Las proteínas de las diferentes especies se asignaron a los grupos basándose en la homología de secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, los alérgenos principales del polen de plantas herbáceas del Grupo 1 incluyen la proteína de Timotea Phl p 1 y la proteína de Raigrás Lol p 1, y los alérgenos principales del polen de plantas herbáceas del Grupo 5 incluyen la proteína de Timotea Phl p 5 y la proteína de Raigrás Lol p 5.

Los presentes inventores han identificado las regiones en ciertas proteínas alergénicas del polen de plantas herbáceas que comprenden epítomos de células T que se unen al MHC Clase II. Los presentes inventores también han demostrado que las regiones que corresponden con epítomos de células T que se unen al MHC Clase II en los alérgenos principales del polen de plantas herbáceas están altamente conservados entre los representantes de un determinado Grupo, véase por ejemplo, el Ejemplo 2. Basándose en esta información, los péptidos derivados de las regiones relevantes de una proteína de un Grupo determinado son adecuados para prevenir o tratar la alergia a plantas herbáceas por inducción de tolerancia a los alérgenos de plantas herbáceas en ese grupo. Por ejemplo, las regiones relevantes de, por ejemplo, Phl p 1 de la Timotea o la Lol p 1 del Raigrás son adecuados para su uso en la prevención o tratamiento de la alergia a las plantas herbáceas por inducción de tolerancia a los alérgenos de plantas herbáceas del Grupo 1.

Los péptidos descritos en el presente documento se derivan de alérgenos de plantas herbáceas del Grupo 1 (SEC ID N^{os} 1 a 27) y el Grupo 5 (SEC ID N^{os} 28 a 73). El término "péptido" y "polipéptido" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento. Las proteínas anteriores se denominan también "los alérgenos". Las Tablas 2 a 4 exponen las secuencias de los péptidos descritos en el presente documento, indicando la proteína parental de la que se deriva cada péptido.

Una composición específica preferida es la combinación 3 que se expone en la Tabla 7. En esta composición, se puede sustituir opcionalmente uno o más de los polipéptidos individuales de las SEC ID N^{os} 1, 2, 5, 31, 46 y 69 por una variante de los mismos. En algunas realizaciones, dos, tres, cuatro, cinco o más de los polipéptidos de las SEC ID N^{os} 1, 2, 5, 31, 46 y 69 presentes en la Combinación 3 se pueden sustituir por variantes de los mismos.

Una composición más preferida comprende, consiste o esencialmente consiste en los polipéptidos de las SEC ID N^{os} 1, 2, 5, 28, 31, 91 y 93 o variantes de los mismos. Otras composiciones preferidas comprenden las SEC ID N^{os} 1, 2, 5, 28, 31, 91 y 93 o en lugar de uno, dos o tres, cuatro o más de estos polipéptidos, variantes de los mismos. En algunas realizaciones las composiciones de siete péptidos no comprenden ningún polipéptido más o no comprende ningún polipéptido más derivado de alérgenos de plantas herbáceas. En realizaciones preferidas, las composiciones comprenden las SEC ID N^{os} 1, 2, 5, 28, 31, 91 y 93 o variantes de las mismas y no contienen ninguna proteína más con más del 20% de homología con una proteína de ninguna de las especies herbáceas mencionadas en el presente documento. Las composiciones anteriores pueden comprender además constituyentes no peptídicos tales como vehículos o adyuvantes.

Variantes

La composición de la invención puede comprender una variante de cualquiera de los polipéptidos Tim07B1, Ber01 y Bio04A. Tal variante es un polipéptido más largo de hasta 30 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de Tim07B1, Ber01 y Bio04A. Otras variantes descritas en el presente documento comprenden típicamente 1, 2, 3 o más de los epítomos del MHC Clase II presentes en los correspondientes péptidos de las SEC ID N^{os} 1 a 73.

Se mencionan en el presente documento las variantes funcionales. Tal variante puede ser capaz de hacer que un individuo tolere un epítipo del MHC Clase II presente en el péptido correspondiente de las SEC ID N^{os} 1 a 59, y por lo tanto típicamente comprenderá una secuencia que se une a la misma molécula del MHC Clase II y/o es reconocida por la célula T que reconoce el epítipo correspondiente del polipéptido de las SEC ID N^{os} 1 a 73. La variante de polipéptido puede por lo tanto inducir tolerancia contra el polipéptido nativo correspondiente.

Las variantes de las SEC ID N^{os} 1 a 73 pueden ser fragmentos que se derivan por truncado, por ejemplo, por eliminación de uno o más aminoácidos de los extremos terminales N y/o C de un polipéptido. Los fragmentos también se pueden generar por una o más eliminaciones internas, siempre que el centro de 9 aminoácidos que construyen el epítipo de célula T no esté sustancialmente destruido.

Por ejemplo, una variante de la SEC ID N^o 1 puede comprender un fragmento de la SEC ID N^o 1, es decir una secuencia más corta. Esto puede incluir la eliminación de uno, dos, tres o cuatro aminoácidos del extremo terminal N de la SEC ID N^o 1 o del extremo terminal C de la SEC ID N^o 1. Tales eliminaciones se pueden hacer en ambos extremos de la SEC ID N^o 1. Una variante de la SEC ID N^o 1 puede incluir aminoácidos adicionales (por ejemplo de la secuencia de la proteína parental de la que se deriva el péptido) extendiendo los extremos de la SEC ID N^o 1. Una variante puede incluir una combinación de eliminaciones y adiciones expuestas anteriormente. Por ejemplo, se pueden eliminar aminoácidos de un extremo de la SEC ID N^o 1, pero se pueden añadir aminoácidos adicionales de la secuencia de la proteína parental de longitud completa en el otro extremo de la SEC ID N^o 1. La misma exposición de variantes anterior se aplica también a las SEC ID N^{os} 2 a 73.

Una variante de un péptido puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73 o un fragmento de las mismas. Una variante de un péptido puede comprender una secuencia que tenga una identidad de secuencia de al menos un 65% con al menos 9 o más aminoácidos contiguos de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73. Este nivel de identidad de aminoácidos se puede apreciar en cualquier sección del péptido, aunque es preferentemente en la región central. El nivel de identidad de aminoácidos es sobre al menos 9 aminoácidos contiguos pero puede ser al menos en 10, 11, 12, 13, 14, 15 o al menos 16 o 17 aminoácidos, dependiendo del tamaño de los péptidos que se comparan. En consecuencia, cualquiera de los niveles de identidad especificados anteriormente puede ser a lo largo de toda la longitud de la secuencia.

Ejemplos de variantes preferidas que se seleccionan basándose en la identidad de secuencia con péptidos particularmente preferidos que se describen en el presente documento son:

Variantes de Ber01 (SEC ID N^o 1): SGKAFGAMAKKGEED (SEC ID N^o 74), *Holcus lanatus*, Hol 11; *Poa pratensis* Poa p 1; SGHAFGSMMAKKGEED (SEC ID N^o 75), *Dactylis glomerata*, Dac g 1; *Lolium perenne* Lol p 1; SGIAFGSMMAKKGDED (SEC ID N^o 76), *Phleum pratense*, Phl p 1, SGTAFGAMAKKGEED (SEC ID N^o 77), *Zea mays*, Zea m 1.

Variantes de Bio02A (SEC ID N^o 28): KYDAYVATLTESLR (SEC ID N^o 78), *Hordeum vulgare*, Hor v 5; KYDAYVATLSEALR (SEC ID N^o 79), *Phleum pratense*, Phl p 5; *Poa pratensis*, Poa p 9; KYDAFVAALTEALR (SEC ID N^o 80), *Dactylis glomerata*, Dac g 5; KYDAFVTTLTEALR (SEC ID N^o 81), *Holcus lanatus*, Hol 15.

Variantes de Bio03A (SEC ID N^o 29): KFIPTLEAAVKQAYAA (SEC ID N^o 82), *Dactylis glomerata*, Dac g 5; *Phalaris aquatica*, Pha a 5; KFIPALEAAVKQAYAA (SEC ID N^o 83), *Phleum pratense*, Phl p 5.

Variantes de Tim07B (SEC ID N^o 69): KIPAGELQIVDKIDA (SEC ID N^o 84), *Dactylis glomerata*, Dac g 5; *Phalaris aquatica*, Pha a 5; KIPTGELQIVDKIDA (SEC ID N^o 85), *Lolium perenne*, Lol p 5; KIPAGEQQIIDKIDA (SEC ID N^o 86), *Poa pratensis*, Poa p 5. El Tim07B también se conserva en *Holcus lanatus*, Hol 15b.

Variantes de Bio04A (SEC ID N^o 31): LKKAITAMSEAQK (SEC ID N^o 87), *Phleum pratense*, Phl p5; *Holcus lanatus*, Hol 15b; LKKAITAMSQAQK (SEC ID N^o 88), *Poa pratensis*, Poa p 5.

Variantes de Ber02C (SEC ID N^o 5): KESWGAIWRIDTPDK (SEC ID N^o 89), *Phalaris aquatica*, Pha a 1; *Phleum pratense*, Phl p 1.

Variantes of Rye09B (SEC ID N^o 46): PQVKYAVFEAALTKAIT (SEC ID N^o 90), *Phleum pratense*, Phl p 5.

Por lo tanto, las SEC ID N^{os} 74 A 90 son variantes preferidas que se pueden utilizar como sustitutos de los péptidos nativos anteriores. Otras variantes preferidas de los péptidos nativos de la invención se derivan de alérgenos del maíz. Los alérgenos del maíz tienen una estrecha homología con los alérgenos del polen de plantas herbáceas y por tanto las secuencias derivadas del maíz pueden contener epitopos de reacción cruzada para utilizarlos en la inducción de tolerancia en la alergia al polen de plantas herbáceas.

En conexión con las secuencias de aminoácidos, “identidad de secuencia” se refiere a secuencias que tienen un valor establecido cuando se evalúan utilizando ClustalW (Thompson et al., 1994, supra) con los siguientes parámetros:

- 5 Parámetros de alineamiento por parejas - Método: preciso, Matriz: PAM, Falta de hueco abierto: 10,00, Falta por extensión de hueco: 0,10; Parámetros del alineamiento múltiple – Matriz: PAM, falta de hueco abierto: 10, 00, % de identidad por retraso; 30, Penalización de huecos en los extremos: on, distancia de separación de huecos: 0, Matriz negativa: on, falta por extensión de hueco: 0,20, faltas por huecos específicos de resto: on, Faltas de huecos hidrófilos; on, Restos hidrófilos: GPSNDQEKR. La identidad de secuencia en un resto particular se pretende que incluya restos idénticos que simplemente se han derivado.

Una variante de un péptido puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, o más, o hasta 10 sustituciones de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73. Las variantes de sustitución implican preferentemente el remplazo de uno o más aminoácidos con el mismo número de aminoácidos, y haciendo sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, se puede sustituir un aminoácido por un aminoácido que tenga propiedades similares, por ejemplo, otro aminoácido básico, otro aminoácido ácido, otro aminoácido neutro, otro aminoácido con carga, otro aminoácido hidrófilo, otro aminoácido hidrófobo, otro aminoácido polar, otro aminoácido aromático u otro aminoácido alifático. Algunas propiedades de los 20 aminoácidos principales que se pueden utilizar para seleccionar sustitutos son las siguientes.

20

Ala	alifático, hidrófobo, neutro	Met	hidrófobo, neutro
Cys	polar, hidrófobo, neutro	Asn	polar, hidrófilo, neutro
Asp	polar, hidrófilo, con carga (-)	Pro	hidrófobo, neutro
Glu	polar, hidrófilo, con carga (-)	Gin	polar, hidrófilo, neutro
Phe	aromático, hidrófobo, neutro	Arg	polar, hidrófilo, con carga (+)
Gly	alifático, neutro	Ser	polar, hidrófilo, neutro
His	aromático, polar, hidrófilo, con carga (+)	Thr	polar, hidrófilo, neutro
Ile	alifático, hidrófobo, neutro	Val	alifático, hidrófobo, neutro
Lys	polar, hidrófilo, con carga(+)	Trp	aromático, hidrófobo, neutro
Leu	alifático, hidrófobo, neutro	Tyr	aromático, polar, hidrófobo

Más variantes incluyen las que en vez de aminoácidos de origen natural, el aminoácido que aparece en la secuencia es un análogo estructural del mismo. Los aminoácidos que se utilizan en las secuencias también se pueden modificar, por ejemplo, marcándolos, siempre que la función del péptido no se afecte significativamente adversamente. Cuando el péptido tiene una secuencia que se diferencia de la secuencia de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73 o un fragmento de las mismas, las sustituciones pueden producirse a lo largo de la longitud completa de la secuencia, en la secuencia de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73 o fuera de la secuencia de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73. Por ejemplo, las variaciones que se han descrito en el presente documento, tales como adiciones, eliminaciones, sustituciones y modificaciones, se pueden producir en la secuencia de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73. Una variante de péptido puede comprender o consistir esencialmente en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73 en la cual se han hecho una, dos, tres, cuatro o más sustituciones de aminoácidos. Una variante del péptido puede comprender un fragmento de la proteína parental que es mayor que cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73. En esta realización, las variaciones que se han descrito en el presente documento, tales como sustituciones y modificaciones, se pueden producir dentro y/o fuera de la secuencia de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73.

Las variantes de péptidos descritas en el presente documento tienen de 9 a 30 aminoácidos de longitud inclusive. Preferentemente, puede ser de 9 a 30 o más preferentemente de 13 a 17 aminoácidos de longitud. Los péptidos puede ser de la misma longitud que las secuencias del péptido de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73.

Los péptidos se pueden derivar químicamente del alérgeno peptídico, por ejemplo, por escisión proteolítica o se puede derivar en un sentido intelectual a partir el alérgeno polipeptídico, por ejemplo utilizando la secuencia de aminoácidos del alérgeno polipeptídico y sintetizando péptidos basándose en la secuencia. Los péptidos se pueden sintetizar utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

El término “péptido” incluye no solo moléculas en las que se han unido restos de aminoácidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino también moléculas en las que se invierte el enlace peptídico. Tales peptidomiméticos retro-invertidos se pueden fabricar utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como los que se describen en Meziere et al (1997) J. Immunol.159, 3230-3237. Esta estrategia implica la fabricación de pseudopéptidos que contienen

cambios que implican la estructura y no la orientación de las cadenas laterales. Meziere et al (1997) demuestran que, al menos para las respuestas del MHC Clase II y células T auxiliares, estos pseudopéptidos son útiles. Los péptidos retro-invertidos, que contienen enlaces NH-CO en vez de CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

5 De manera similar, el enlace peptídico puede obviarse completamente siempre que se utilice un resto enlazador que mantenga el espacio entre los átomos de carbono de los restos de aminoácidos; se prefiere particularmente si el resto enlazador tiene sustancialmente la misma distribución de cargas y sustancialmente la misma planitud que un enlace peptídico. También se apreciará que el péptido se puede bloquear convenientemente en su extremo N o C para ayudar a reducir la susceptibilidad a la digestión exoproteolítica. Por ejemplo, el extremo N del grupo amino de los péptidos se puede proteger haciéndolo reaccionar con ácido carboxílico y el extremo C del grupo carboxílico del péptido se puede proteger haciéndolo reaccionar con una amina. Otros ejemplos de modificaciones incluyen la glucosilación y fosforilación. Otra modificación potencial es que los hidrógenos en las aminas de cadena lateral de R o K se pueden remplazar con grupos metileno ($-NH_2 \rightarrow NH(Me)$ o $N(Me)_2$).

15 Los análogos de péptidos de acuerdo con la invención también pueden incluir variantes de péptidos que aumenten o disminuyan la semivida del péptido in vivo. Ejemplos de análogos capaces de aumentar la semivida de los péptidos que se utilizan de acuerdo con la invención incluyen peptoides análogos de los péptidos, derivados D-aminoácidos de los péptidos, e híbridos péptido-peptoides. Una realización más de las variantes de péptidos que se utilizan de acuerdo con la presente invención comprende formas de D-aminoácidos. La preparación de polipéptidos que utilizan D-aminoácidos más que L-aminoácidos disminuye mucho cualquier rotura no deseada de tal agente por procesos metabólicos normales, disminuyendo la cantidad de agente que se necesita administrar, junto con la frecuencia de su administración.

25 Los péptidos proporcionados por la presente invención pueden derivarse de variantes de corte y empalme de las proteínas parentales codificadas por un ARNm generado por corte y empalme alterado de las transcripciones primarias que codifican las cadenas de proteína parental. Los péptidos también se pueden derivar de aminoácidos mutantes, variantes de glucosilación y otros derivados covalentes de las proteínas parentales que mantienen al menos una propiedad de unión al MHC de los alérgenos. Los derivados ejemplares incluyen moléculas en las que los péptidos de la invención están modificados covalentemente por sustitución, química, enzimática, u otro medio apropiado con un medio distinto de un aminoácido de origen natural.

35 Las variantes descritas anteriormente se pueden preparar durante la síntesis del péptido o por modificación post-producción, o cuando el péptido está en forma recombinante utilizando las técnicas conocidas de mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria, o escisión enzimática y/o ligadura de ácidos nucleicos.

40 De acuerdo con la presente invención, el uno o más péptidos que la composición puede comprender además son preferentemente variantes funcionales de cualquiera de las SEC ID N^{os} 1 a 73. Es decir, los péptidos son preferentemente capaces de inducir una respuesta inmunitaria. En particular, son capaces de inducir una respuesta de fase tardía en un individuo con alergia a plantas herbáceas. Esto se puede ensayar por la capacidad del péptido para inducir la proliferación de células T en una muestra de células T. Los métodos de ensayo de la inducción de proliferación de células T se conocen bien en la técnica y uno de tales métodos se ejemplifica en el Ejemplo 4. Preferentemente el uno o más péptido de más son capaces de producir la proliferación de células T en al menos el 20% de las muestras de células T, en el que cada muestra se obtiene de individuos alérgicos a las plantas herbáceas diferentes de la población. Las composiciones de la invención son preferentemente capaces de inducir la proliferación de células T en el 30% o más muestras de células T obtenidas de entre un panel de individuos alérgicos a las plantas herbáceas. Más preferentemente, las composiciones son capaces de inducir la proliferación de células T en un 35% o más, 40% o más, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, o 90 % o más de las muestras obtenidas de individuos sensibilizados de un panel.

50 Las composiciones también pueden ser capaces de inducir una liberación significativa de una o más citoquinas, preferentemente que incluyen uno o más de entre interferón gamma, interleucina-10 e interleucina-13 en muestras de células T obtenidas de individuos sensibilizados de un panel. Una liberación "significativa" se puede determinar por criterios similares a los descritos posteriormente en el Ejemplo 5. Por lo tanto, las composiciones pueden ser capaces de inducir una liberación de una o más citoquinas en un 35% o más, 40% o más, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, o 90 % o más de las muestras obtenidas de individuos sensibilizados de un panel. El número de individuos del panel de individuos alérgicos a las plantas herbáceas puede ser cualquier número mayor de uno, por ejemplo al menos 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 80, o al menos 100 individuos.

60 Se prefiere que si los péptidos producen la proliferación de células T, no den lugar a la liberación de histamina por las preparaciones de basófilos o mastocitos a partir de un individuo sensibilizado. Puede haber alguna liberación de histamina, pero preferentemente la composición no producirá cantidades significativas de histamina para liberarse. Una liberación significativa de histamina se puede considerar que es la liberación del 20% o más de la histamina total disponible en los leucocitos cuando se estimula una muestra de leucocitos de un individuo con una composición in vitro. Un individuo normal típicamente tiene un contenido de histamina en los leucocitos de $150 \text{ ng}/10^7$ células.

65

Las variantes adecuadas capaces de unirse a TCR pueden derivarse empíricamente o seleccionarse de acuerdo con criterios conocidos. En un único péptido hay ciertos restos que contribuyen a la unión en la hendidura de unión antigénica del MHC y otros restos que interactúan con las regiones hipervariables del receptor de células T (Allen et al (1987) Nature 327: 713-5).

5 En los restos que contribuyen a la interacción con el receptor de células T, se ha demostrado una jerarquía que pertenece a la dependencia de la activación de células T con la sustitución de un determinado resto del péptido. Utilizando péptidos en los que se han sustituido uno o más restos de contacto con el receptor de células T con un aminoácido diferente, varios grupos han demostrado profundos efectos en el proceso de activación de células T. 10 Evavold & Allen (1991) Nature 252: 1308-10) demostraron la disociación de la proliferación de células T y la producción de citoquinas. En este modelo in vitro, un clon de célula T específico para los restos 64-76 de la hemoglobina (en el contexto de I-E^k), se desafió con un análogo peptídico en el que se había hecho una sustitución conservadora de ácido aspártico por ácido glutámico. Esta sustitución no interfería significativamente en la capacidad del análogo para unirse a I-E^k.

15 A continuación del desafío in vitro de un clon de célula T con este análogo, no se detectó proliferación aunque se mantuvo la secreción de IL-4, que era la capacidad del clon para ayudar a las respuestas de células B. En un estudio posterior el mismo grupo demostró la separación de citólisis mediada por células T de la producción de citoquinas. En este caso, el formador permanecía inalterado mientras que el último discapacitado. La eficacia de los 20 ligandos del péptido alterado in vivo se demostró inicialmente en un modelo murino de EAE (encefalomielitis alérgica experimental) por McDevitt y sus colegas (Smilek et al (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88 : 9633-9637). En este modelo se induce EAE por inmunización con el péptido encefalitogénico Ac1-11 de MBP (proteína mielina básica). La sustitución en la posición cuatro (lisina) con un resto de alanina generaba un péptido que se unía bien a su elemento de restricción (A α ^uA β ^u), pero no era inmunogénico en la cepa susceptible PL/JxSJLF1 y que, además 25 prevenía la aparición de EAE cuando se administraba o antes o después de la inmunización con el péptido encefalitogénico. Por lo tanto, se pueden identificar restos en los péptidos que afectan la capacidad de los péptidos para inducir varias funciones de células T.

30 De manera ventajosa, los péptidos se pueden definir como que favorecen la proliferación de células T y la desensibilización. Metzler y Wraith han demostrado una capacidad tolerogénica mejor de los péptidos en los que se han hecho sustituciones que aumentan la afinidad péptido-MHC (Metzler & Wraith(1993) Int Immunol ~ : 1159-65). Sloan-Lancaster et al (1993) Nature 363: 156-9 han demostrado que un ligando peptídico alterado puede producir una anergia profunda de largo plazo en las células T clonadas.

35 Las composiciones de la invención pueden ser capaces de inducir una respuesta de fase tardía en un individuo que está sensibilizado a los alérgenos. La expresión "respuesta de fase tardía" incluye el significado que se expone en Allergy and Allergic Diseases (1997) A. B. Kay (Ed.), Blackwell Science, pp 1113-1130. La respuesta de fase tardía puede ser cualquier respuesta de fase tardía (LPR). Preferentemente, los péptidos pueden ser capaces de inducir una respuesta asmática tardía (LAR) o una respuesta de rinitis tardía, o una respuesta cutánea de fase tardía o una 40 respuesta ocular de fase tardía. Si un péptido particular puede dar lugar o no a una LPR se puede determinar utilizando métodos bien conocidos en la técnica; un método preferido es el que se describe en Cromwell O, Durham SR, Shaw RJ, Mackay J y Kay AB. Provocation tests and measurements of mediators from mast cells and basophils in asthma and allergic rhinitis. In: Handbook of Experimental Immunology (4) Capítulo 127, Editor: Weir DM, Blackwell Scientific Publications, 1986.

45 Por tanto, preferentemente, los péptidos individuales descritos en el presente documento son capaces para inducir una LPR en un individuo que ha sido sensibilizado a los alérgenos. Si un individuo ha sido sensibilizado o no a los alérgenos se puede determinar por procedimientos bien conocidos tales como el ensayo de punción cutánea con soluciones de extractos de alérgenos, inducción de LPR cutánea, historia clínica, desafío alérgico y ensayo de 50 radioalergosorbentes (RAST) para la medición de IgE específica del alérgeno. Si se espera que un individuo particular se beneficie o no del tratamiento se puede determinar por lo que se basa el médico, por ejemplo, por tales ensayos.

55 La desensibilización o inducción de tolerancia de un individuo a los alérgenos significa la inhibición o disminución de las reacciones alérgicas tisulares que inducen los alérgenos en individuos sensibilizados apropiadamente. Se ha demostrado que las células T se pueden activar selectivamente, y luego se vuelven indiferentes. Además, la anergia o eliminación de estas células T da lugar a la desensibilización del paciente a un alérgeno particular. La desensibilización se manifiesta en sí misma como una reducción en la respuesta a un alérgeno o péptido derivado del alérgeno, o preferentemente una eliminación de tal respuesta, en la segunda o posteriores administraciones del 60 alérgeno o el péptido derivado del alérgeno. La segunda administración se puede hacer después de que pase un periodo de tiempo para permitir que se produzca la desensibilización, es preferible cualquier periodo entre un día y varias semanas. Se prefiere un intervalo de aproximadamente dos semanas.

65 Aunque las composiciones de la invención pueden ser capaces de inducir una LPR en un individuo alérgico a plantas herbáceas, se debería apreciar que cuando se utiliza una composición para tratar a una paciente es preferible que se utilice una concentración de la composición lo suficientemente baja tal que no ocurra una LPR

observable pero que la respuesta sea la suficiente para desensibilizar parcialmente las células T tal que se pueda dar la próxima dosis (preferentemente mayor), etcétera. De esta manera se establece la dosis para dar lugar una desensibilización completa pero a menudo sin que nunca se induzca una LPR en el paciente. Aunque, la composición o péptido es capaz producirla a una concentración más alta que la que se administra.

5 Las composiciones de la invención son capaces de inducir una respuesta en fase tardía en el 50% o más de un panel de individuos alérgicos a las plantas herbáceas de la población. Más preferentemente, las composiciones son capaces de inducir una LPR en el 55% o más, 60% o más, 70% o más, 75% o más, 80% o más, 85% o más, o 90% o más de individuos sensibilizados en un panel. Si las composiciones son capaces de inducir o no una LPR en un
10 cierto porcentaje de un panel de sujetos se puede determinar por métodos que se conocen bien en la técnica.

Se entenderá que los péptidos descritos en el presente documento comprenden un epítipo de células T que consiste en un centro de 9 aminoácidos que son la secuencia mínima esencial necesaria para la unión con el MHC clase II. Sin embargo, los péptidos pueden comprender también restos adicionales flanqueando el centro de 9
15 aminoácidos. Los péptidos por lo tanto pueden comprender una región que contiene un epítipo de células T, en el que se pueden modificar algunos restos sin afectar la función del epítipo. En consecuencia, las variantes funcionales de los péptidos que se definen anteriormente incluyen péptidos que se han alterado para mejorar su solubilidad con respecto a la secuencia nativa de los péptidos. La solubilidad mejorada es ventajosa para la inducción de tolerancia de los sujetos a los alérgenos de los que derivan los péptidos de la invención, mientras que
20 la administración de agentes poco solubles a los sujetos producen respuestas inflamatorias de intolerancia, no deseables. La solubilidad de los péptidos se puede mejorar alterando los restos que flanquean la región que contiene un epítipo de células T. Un péptido descrito en el presente documento se puede modificar para que sea más soluble tal que comprenda:

- 25 i) hacia el extremo N de los restos del péptido que flanquean un epítipo de células T: uno a seis aminoácidos contiguos que corresponden a los aminoácidos uno a seis contiguos inmediatamente al extremo N de dichos restos en la secuencia de la proteína de la que deriva el péptido; y/o
- ii) hacia el extremo C de los restos que flanquean un epítipo de células T: uno a seis aminoácidos contiguos que corresponden a los aminoácidos uno a seis contiguos inmediatamente al extremo C de dichos restos en la
30 secuencia de la proteína de la que deriva el péptido; o
- iii) tanto hacia el extremo N como al C de los restos del péptido que flanquean un epítipo de células T, al menos un aminoácido seleccionado de entre arginina, lisina, histidina, glutamato y aspartato.

Opcionalmente, los péptidos pueden adicionalmente modificarse para ser más solubles tal que:

- 35 i) cualquiera de los restos de cisteína en la secuencia nativa del péptido se remplazan por serina o ácido 2-aminobutírico; y/o
- ii) cualquiera de los restos hidrófobos en los hasta tres aminoácidos en el extremo N o C de la secuencia nativa del péptido, que no está comprendido en un epítipo de células T, se eliminan; y/o
- 40 iii) cualquiera de los dos aminoácidos consecutivos comprenden la secuencia Asp-Gly en los hasta cuatro aminoácidos en el extremo N o C de la secuencia nativa del péptido, que no están comprendidos en el epítipo de células T, se eliminan; y/o
- iv) uno o más restos cargados positivamente se añaden en el extremo N y/o C.

45 Ejemplos de péptidos modificados para aumentar la solubilidad son Rye 09B y Tim07B como se describe en el Ejemplo 8. Las variantes con solubilidad mejorada se muestran en la Tabla 8. Por lo tanto, los péptidos Rye 09B1 (SEC ID N° 91), KPEVKYAVFEAALTKAIT; Rye 09B2 (SEC ID N° 92), KKPEVKYAVFEAALTKAIT, Tim 07B1, (SEC ID N° 93), KKIPAGELQIIDKIDA, Tim 07B2 (SEC ID N° 94), KKIPAGELQIIDKIDAK son ejemplos preferidos de
50 variantes con solubilidad mejorada. Las SEC ID N° 91 a 94 puede por lo tanto utilizarse preferentemente como sustitutos para los péptidos nativos anteriores en una composición de la invención.

Los polipéptidos pueden estar presentes en una forma sustancialmente aislada. Se pueden mezclar con vehículos o diluyentes que no interferirán con su uso pretendido y aún se considerará como sustancialmente aislado. También pueden estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenden en general al menos un 90%, por
55 ejemplo, al menos un 95%, 98% o 99%, de las proteínas de la preparación.

Formulaciones y composiciones

Aunque sea posible para las composiciones de acuerdo con la invención que se presenten en bruto, es preferible
60 que se presenten como una formulación farmacéutica. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto más de la invención, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica de la invención que es una formulación farmacéutica adecuada para su uso en la prevención o tratamiento de la alergia a las plantas herbáceas que comprende uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente uno o más principios
65 activos. El vehículo debe ser 'aceptable' en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el receptor del mismo. Típicamente, los vehículos para inyección, y la formulación final, son estériles y libres de pirógenos. Preferentemente, el vehículo o diluyente es el tioglicerol.

La formulación de una composición que comprende los péptidos descritos en el presente documento se puede llevar a cabo utilizando formulaciones químicas farmacéuticas y metodologías de referencia que están disponibles fácilmente para el experto en la técnica.

5 Por ejemplo, las composiciones que contienen uno o más de los péptidos descritos en el presente documento se pueden combinar con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Puede haber sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH y similares, presentes en el excipiente o vehículo. Estos excipientes, vehículos y sustancias auxiliares son en general agentes farmacéuticos que no inducen una respuesta inmunitaria en el individuo que recibe la composición, y que se puede
10 administrar sin toxicidad excesiva. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol, tioglicerol y etanol. Se pueden incluir también sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como hidroclo-
15 ruros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos y similares; y sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. Una revisión minuciosa de los excipientes, vehículos y sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Tales composiciones se pueden preparar, envasar, o vender en forma de administración adecuada en embolada o para administración continua. Las composiciones inyectables se pueden preparar, envasar, o vender en forma de
20 unidades de dosificación, tal como en ampollas, o envases multidosis que contengan un conservante. Las composiciones incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas, e implantes de liberación continua o formulaciones biodegradables. Tales composiciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales que incluyan, pero no se limiten a , agentes suspensores, estabilizantes, o dispersantes. En una realización de una composición para su administración parenteral, el principio
25 activo se proporciona en forma seca (por ejemplo, en polvo o gránulos) para su reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar, envasar o vender en forma de una solución o suspensión oleosa o acuosa inyectable estéril. Esta suspensión o solución se puede formular de acuerdo con la
30 técnica conocida, y puede comprender, además del principio activo, ingredientes adicionales tales como agentes dispersantes, agentes humectantes, o agentes suspensores descritos en el presente documento. Tales formulaciones inyectables estériles se pueden preparar utilizando un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente no tóxico, tal como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes o disolventes aceptables incluyen, pero no se limitan a estos, solución de Ringer, solución de cloruro sódico isotónica, y aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos. Otras composiciones administrables por vía parenteral, que son útiles incluyen
35 las que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación de liposomas, o como un componente de sistemas poliméricos biodegradables. Las composiciones de liberación sostenida o implantes pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos biodegradables farmacéuticamente aceptables, o sales moderadamente solubles.

40 De manera alternativa, los péptidos descritos en el presente documento pueden encapsularse, adsorberse, o asociarse con, vehículos particulados derivados de poli(láctidos) y Poli(láctidos-co-glicólidos). Véase, por ejemplo, Jeffery et al. (1993) Pharm. Res. 10:362-368. También se pueden utilizar otros sistemas y polímeros particulados, por ejemplos, polímeros tales como la polilisina, poliarginina, espermina, espermidina, así como conjugados de estas
45 moléculas.

La formulación de cualquiera de los péptidos mencionados en el presente documento dependerá de factores tales como la naturaleza de la sustancia y el método de suministro. Cualquiera de tales sustancias se puede administrar en una variedad de formas de dosificación. Se pueden administrar por vía oral (por ejemplo, como comprimidos, trociscos, grageas, suspensiones oleosas o acuosas, polvos dispersables o gránulos), tópica, parenteral,
50 subcutánea, por inhalación, intravenosa, intramuscular, intraesternal, transdérmica, intradérmica, sublingual, intranasal, bucal o por técnicas de infusión. La sustancia se puede administrar también como supositorios. Un médico será capaz de determinar la vía necesaria de administración para cada individuo particular.

Las composiciones o formulaciones descritas en el presente documento contendrán una concentración adecuada de
55 cada péptido que sea eficaz sin producir una reacción adversa. Típicamente, la concentración de cada péptido de la composición estará en un intervalo de 0,03 a 200 nmol. Más preferentemente en el intervalo de 0,3 a 200 nmol/ml, 3 a 180 nmol/ml, 10 a 150 nmol/ml, 5 a 200 nmol/ml o 30 a 120 nmol/ml. La composición o formulaciones deberían tener una pureza mayor del 95% o 98% o una pureza de al menos un 99%.

60 Se puede utilizar un adyuvante en combinación con los polipéptidos descritos en el presente documento. El adyuvante se administra preferentemente en una cantidad que es suficiente para aumentar el efecto de los polipéptidos o viceversa. El adyuvante u otro principio activo puede ser un agente que potencia los efectos de los polipéptidos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el otro agente puede ser una molécula inmunomoduladora o un adyuvante que aumenta la respuesta al péptido.
65

En una realización, por lo tanto, la composición descrita en el presente documento se utiliza como terapia en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. Los agentes se pueden administrar por separado, simultáneamente o secuencialmente. Se pueden administrar en la misma o en composiciones diferentes. En consecuencia, en un método descrito en el presente documento, el sujeto se puede tratar también con un agente terapéutico más.

Se puede formular una composición, por lo tanto, que comprenda los péptidos descritos en el presente documento y también una o más de otras moléculas terapéuticas. Una composición de la invención puede utilizarse de manera alternativa simultáneamente, secuencialmente o por separado con uno o más de otras composiciones terapéuticas como parte de un tratamiento combinado.

Ejemplos no limitantes de adyuvantes incluyen la vitamina D, rapamicina y esteroides glucocorticoides tales como dexametasona, fluticasona, budesonida, mometasona, beclometasona, hidrocortisona, acetato de cortisona, prednisona, prednisona, metilprednisolona, betametasona y triamcinolona. Un glucocorticoide preferido es la dexametasona.

Métodos terapéuticos e individuos a tratarse

La presente divulgación se refiere a péptidos que son capaces de desensibilizar o inducir tolerancia en individuos humanos a los alérgenos descritos anteriormente y por lo tanto son útiles en la prevención o el tratamiento de la alergia a plantas herbáceas. Los péptidos se pueden utilizar en la prevención o el tratamiento de la alergia al polen de plantas herbáceas. Se describen en el presente documento composiciones para el uso en la prevención o el tratamiento de la alergia a las plantas herbáceas por inducción de tolerancia. Las composiciones de la invención se pueden utilizar para reducir los síntomas alérgicos o mejorar la afección de un individuo alérgico. Además se describe en el presente documento un método de inducción de tolerancia o desensibilización de un individuo alérgico a las plantas herbáceas que comprende la administración de una combinación de polipéptidos descritos en el presente documento.

El individuo que se va a tratar o proporcionar la composición o formulación de la invención es preferentemente un ser humano. Se apreciará que del individuo a tratarse puede saberse que está sensibilizado a los alérgenos, en riesgo de sensibilizarse o sospechoso de estar sensibilizado. El individuo se puede ensayar en cuanto a sensibilización utilizando técnicas bien conocidas en la técnica y como se describe en el presente documento. De manera alternativa, el individuo puede tener una historia familiar de alergia a las plantas herbáceas. Puede no ser necesario ensayar un individuo en cuanto a la sensibilización a las plantas herbáceas porque el individuo puede mostrar síntomas de alergia cuando se expone a plantas herbáceas, o una sustancia o producto que contiene o comprender cualquiera de lo anterior. La sustancia o producto derivado de una planta herbácea es típicamente el polen de la planta herbácea. Por proximidad se entiende 10 metros o menos, 5 metros o menos, 2 metros o menos, 1 metro o menos, o 0 metros de los artículos descritos anteriormente. Los síntomas de alergia pueden incluir picor de ojos, goteo de nariz, dificultades respiratorias, piel roja con picor o prurito.

El individuo que se va a tratar puede ser de cualquier edad. Sin embargo, preferentemente el individuo puede estar en el grupo de edad de 1 a 90, 5 a 60, 10 a 40, o más preferentemente de 18 a 35.

Preferentemente, el individuo que se va a tratar es de una población que tiene frecuencias del alelo MHC en el intervalo de frecuencias que son representativas de la población caucásica. Las frecuencias alélicas de la población de referencia para 11 familias de alelos DRB1 comunes se muestran en la Tabla A (Datos de HLA Facts Book, Parham y Barber).

Tabla A

DRB1	1	3	4	7	8	11	12	13	14	15	16
%	6,4	14,7	15,7	8,8	3,4	8,3	3,9	14,7	2,9	17,6	2,5
% Población de Referencia	9,4	11,1	12,8	13,2	3,7	13,4	2,3	10,2	3,2	10,7	3,6

Las frecuencias de referencia se obtuvieron por análisis de múltiples estudios que comunican frecuencias y las figuras mostradas son valores medios. Preferentemente, por lo tanto, el individuo que se va a tratar es de una población que tiene frecuencias alélicas de MHC equivalentes que la población de referencia para los alelos a los que se refiere la Tabla A (tal como para al menos 1, 2, 3, 4, 5 o todos los alelos), por ejemplo en los intervalos de las figuras más o menos el 1, 2, 3, 5, 10, 15 o 20%.

Preferentemente el individuo es de una población en la que las frecuencias de alelo de los alelos DRB1 siguientes son:

- 4 - al menos el 9%
- 7 - al menos el 10%
- 11 - al menos el 8%.

5 El individuo puede haber tenido alergia a las plantas herbáceas durante el menos 2 semanas, 1 mes, 6 meses, 1 año o 5 años. El individuo puede tener prurito, congestión nasal, goteo nasal y/o tos producida por la alergia. Al individuo se le ha podido administrar o no otras composiciones /compuestos que tratan la alergia a plantas herbáceas. El individuo puede vivir en una región geográfica que tiene:

- 10 - un clima templado, y/o:
 - un pH del suelo típico en el intervalo de aproximadamente 3,5, 4, o 4,5 a aproximadamente 5,5, 6, 7 u 8; y/o
 - una precipitación media anual no menor de aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 18, 19 o 20 cm por año y no mayor de aproximadamente 180 cm, 250 cm, 300 cm, 400 cm o 500 cm por año; y/o
 15 - una temperatura mínima anual de no menos de aproximadamente -5 °C, -4 °C, -3 °C, -2 °C, -1 °C, 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C o 5 °C y/o
 - una temperatura máxima anual no mayor de aproximadamente 35 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 29 °C, aproximadamente 28 °C, aproximadamente 27 °C, aproximadamente 26 °C aproximadamente 25 °C, aproximadamente 24 °C, aproximadamente 23 °C o aproximadamente 22 °C; y/o
 20 - se encuentra entre las latitudes de aproximadamente 30 ° norte y aproximadamente 30 ° sur.

20 El individuo típicamente padece alergia a las plantas herbáceas en una estación en particular. La estación corresponde típicamente con la estación de floración de las plantas herbáceas, que es típicamente en verano, preferentemente a principios del verano (por ejemplo, de mayo a junio en el hemisferio norte) o finales del verano (por ejemplo agosto a octubre en el hemisferio norte). El individuo alérgico a las plantas herbáceas es típicamente
 25 alérgico al polen de plantas herbáceas.

Métodos de suministro

30 Una vez que se formulan las composiciones de la invención se pueden suministrar a un su jeto in vivo utilizando una variedad de vías y técnicas conocidas. Por ejemplo, una composición se puede proporcionar como una solución, suspensión o emulsión inyectable y se administra por vía parenteral, subcutánea, epidérmica, intradérmica, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, intravenosa por inyección utilizando una aguja y jeringa convencionales, o utilizando un sistema de inyección jet líquido. Las composiciones también se pueden administrar tópicamente en la piel y tejido mucoso, tal como por vía nasal, intratraqueal, intestinal, rectal o vaginal, o se proporciona como una
 35 pulverización fina para administración respiratoria o pulmonar. Otros modos de administración incluyen la administración oral, supositorios, administración sublingual, y técnicas de suministro transdérmico activo o pasivo.

40 Cuando se va a administrar un péptido descrito en el presente documento, se prefiere administrar el péptido en un sitio del cuerpo donde tenga la capacidad de ponerse en contacto con las células presentadoras de antígeno adecuadas, y donde él o ellos, tengan la oportunidad de ponerse en contacto con las células T del individuo.

Regímenes de suministro

45 La administración de los péptidos (la composición que contiene una pluralidad de péptidos) puede ser por cualquier método adecuado como se ha descrito anteriormente. Las cantidades del péptido adecuadas se pueden determinar empíricamente, pero típicamente están en el intervalo dado a continuación. Una sola administración de cada péptido puede ser suficiente para tener un efecto beneficioso para el paciente, pero se apreciará que puede ser beneficioso que el péptido se administre más de una vez, en cuyo caso los regímenes típicos de administración pueden ser, por ejemplo, una o dos veces a la semana durante 2-4 semanas cada 6 meses, o una vez al día durante una semana
 50 cada cuatro a seis meses.

Las dosificaciones para la administración dependerán de varios factores incluyendo la naturaleza de la composición, la vía de administración y la programación y tiempos del régimen de administración. Las dosis adecuadas de una molécula de la invención puede estar en el orden de hasta 15 µg, hasta 20 µg, hasta 25 µg, hasta 30 µg, hasta 50
 55 µg, hasta 100 µg, hasta 500 µg o más por administración. Las dosis adecuadas pueden ser menores de 15mg, pero al menos de 1 ng, o al menos de 2 ng, o al menos de 5 ng, o al menos de 50 ng, o al menos 100 ng, o al menos de 500 ng, o al menos de 1 µg, o al menos de 10 µg. La dosis que se utilice puede ser mayor, por ejemplo, hasta 1 mg, hasta 2 mg, hasta 3 mg, hasta 4 mg, hasta 5 mg o mayores. Tales dosis se pueden proporcionar en una formulación líquida, a una concentración adecuada para permitir un volumen adecuado para la administración por la vía seleccionada.
 60

La invención se ilustra por los siguientes Ejemplos:

Ejemplo 1*Búsqueda de unión con MHC Clase II*

5 El objetivo del estudio es identificar un panel distintivo de péptidos con fuertes afinidades para los ocho alotipos HLA-DRB1* del MHC Clase II humano más comunes. Con el fin de identificar péptidos de unión en los principales alérgenos de plantas herbáceas Lol p 1, Rye Lol p Va, p Vb, p 5a y p 5b de Raigrás, Cyn d 1 de Grama común y Phi p 5 de Timotea, se empleó una estrategia in silico conocida como “inserción peptídica” utilizando el algoritmo disponible comercialmente EpiMatrix (EpiVax Inc.). Este es un análisis bioinformático de péptidos de una secuencia
 10 respecto al potencial para colocarse en la hendidura de unión de las moléculas HLA-DR del MHC Clase II. EpiMatrix es un algoritmo basado en una matriz que ordena 9 segmentos largos de aminoácidos, solapados con 8 aminoácidos, de cualquier secuencia de polipéptidos por probabilidad estimada para unirse a cada una de las moléculas seleccionadas del MHC (De Groot et al., AIDS Research and Human Retroviruses 13:539-41 (1997)). El procedimiento del desarrollo de los motivos de la matriz fueron publicados por Schafer et al, 16 Vaccine 1998 (1998).
 15 En este Ejemplo, se evalúa el potencial de unión para HLA DR1, DR3, DR4, DR7, DR8, DR11, DR13 y DR15. Los supuestos ligandos MHC se seleccionan puntuando cada marco 9mérico de una secuencia de proteínas. Esta puntuación se deriva comparando la secuencia de los 9meros con la matriz de secuencias de aminoácidos conocidas que se unen a cada alelo MHC. Estudios retrospectivos han demostrado que el EpiMatrix predice con precisión ligandos publicados de MHC (Jesdale et al., in Vaccines '97 (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1997)). La predicción satisfactoria de péptidos que se unen a múltiples moléculas de MHC también se ha confirmado.

La probabilidad de unión estimada de una molécula MHC seleccionada se calcula por EpiMatrix de la siguiente manera. Los péptidos se puntúan estimando la promoción o inhibición relativa de unión de cada aminoácido,
 25 comparándola con enlazadores MHC conocidos para un determinado alelo MHC. Esta información se suma a lo largo del péptido y se asigna una puntuación sumatoria (puntuación EMX) al péptido completo. Tras comparar la puntuación EMX con las puntuaciones conocidas de ligandos MHC, el EpiMatrix llega a una “probabilidad de unión estimada” (abreviada como EBP, pero no es estrictamente una probabilidad). La EBP describe la proporción de péptidos con puntuaciones EMX como mayor o menor con que se unirán a una determinada molécula MHC. El
 30 intervalo de la EBP va del 100% (altamente probable que se una) a menos del 1% (muy improbable que se una).

Las secuencias de polipéptidos analizadas por EpiMatrix se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1

Ber01 ori	SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA
Ber02 ori	PKDSDEFIPMKSSWGAIWRIDPKKPLKGP
Ber03 ori	RLTSEGG AHLVQDDVIPANWKPDTVYTSK
Bio01 ori	QKLIEKINAGFKA AVAA
Bio02 ori	AYVATL TEALRVIAGTL
Bio03 ori	KFIPTLVAAVKQAYAAKQAT
Bio04 ori	TALKKAVTAMSEAEKEA
Bio05 ori	NDKFTVFESAFNKALNE
Rye01 ori	LDAKSTWYGKPTGAGPKDNG
Rye02 ori	GHAFGSMAKKGEEQNVR SAG
Rye03 ori	GSNPNYLAILVKYVDGDGDV
Rye04 ori	KESWGAWRIDTPDKLTGPF
Rye05 ori	DVNAGFKA AVAAAANAPPAD
Rye06 ori	GATPEAKYDAFVTALTEALR
Rye07 ori	GELQIVDKIDAAFKIAATAANAAPTNDKF
Rye08 ori	GAYETYKFIPSLEAAVKQAY
Rye09 ori	PEVKYAVFEAALTKAITAMTQAQKAGKPA
Tim10 ori	PEVKYTVFETALKKAITAMSEAQ

Basándose en los resultados del análisis EpiMatrix de estas secuencias, se identificaron los péptidos centrales que se predijo que tenían buenas propiedades de unión a MHC. Los péptidos seleccionados se muestran en la Tabla 2. Los péptidos destacados en gris y marcados con * no son péptidos seleccionados. Estos se corresponden con las secuencias originales analizadas en EpiMatrix, de los que derivan posteriormente los péptidos seleccionados. Por ejemplo, Ber01 deriva de Ber01 ori.

Tabla 2

Péptidos del Grupo 1

10

SEC ID N°	Nombre del péptido	Secuencia del péptido	Grupo de Alérgenos	Proteína de origen	
95	Ber01 ori	SGKAFGAMA KK QEDKL RKA	1	Ber Cyn d1	*
1	Ber01	SGKAFGAMA KK QED	1	Ber Cyn d1	
96	Ber02 ori	PKDSDEFIPMKSSWGAIW RIDPKKPLKGP	1	Ber Cyn d1	*
2	Ber02	FIPMKSSWGA	1	Ber Cyn d1	
3	Ber02A	WGAIWRJDPKKPL	1	Ber Cyn d1	
4	Ber02B	KDSDEFIPMKSSWGA1WR	1	Ber Cyn d1	
5	Ber02C	KSSWGAIWRIDPKKPLK	1	Ber Cyn d1	
6	Ber02D	MKSSWGAIWRIDPKKPLK	1	Ber Cyn d1	
7	Ber02E	MKSSWGAIWRJDPKPLK	1	Ber Cyn d1	
97	Ber03 ori	RLTSEGG AHLV QDDVIPA NWKPD TV YTSK	1	Ber Cyn d1	*
8	Ber03A	IPANWKP DT YTSK	1	Ber Cyn d1	
9	Ber04	KATFYGSDPRGAAP	1	Ber Cyn d1	
10	Ber05	AYHFDLSGKAFG	1	Ber Cyn d1	
98	Rye01 ori	LDAKST2YGKPTGAGPK DNG	1	Rye Lol p1	*
11	Rye01	LDAKSTWYGKPTGAG	1	Rye Lol p1	
12	Rye01A	KWLDAKSTWYGKPTGAG	1	Rye Lol p1	
99	Rye02 ori	GHAFGSM AKK GEEQNVRSAG	1	Rye Lol p1	*
13	Rye02	FGSM AKK GEEQNVRSAG	1	Rye Lol p1	
14	Rye02A	HAFGMA KK GEEQNVRSAG	1	Rye Lol p1	

ES 2 532 759 T3

100	Rye03 ori	GSNPNYLAILVKYVDGDG DV	1	Rye Lol p1	*
15	Rye03A	SNPNYLAILVKYVD	1	Rye Lol p1	
101	Rye04 ori	KESWGAWWRIDTPDKLT GPF	1	Rye Lol p1	*
16	Rye04	WGAWWRIDTPDKL	1	Rye Lol p1	
17	Rye04A	KESWGAWWRIDTPDKL	1	Rye Lol p1	
18	Rye04B	KESWGAWWRIDTPDKLG P	1	Rye Lol p1	
19	Rye12	APYHFDLSGHAFGS	1	Rye Lol p1	

Péptidos del Grupo 5

102	Bio02 ori	AYVATLTEALRVIAGTL	5	Rye Lol p 5b	*
28	Bio02A	KYDAYVATLTEALR	5	Rye Lol p 5b	
103	Bio03 ori	KFIPTLVAAVKQAYAAKQ AT	5	Rye Lol p 5b	*
29	Bio03A	KFIPTLVAAVKQAYAAKQ	5	Rye Lol p 5b	
30	Bio03B	YKFIPTLVAAVKQAYAAK Q	5	Rye Lol p 5b	
104	Bio04 ori	TALKKAVTAMSEAEBCV	5	Rye Lol p 5b	*
31	Bio04A	LKKAVTAMSEAEK	5	Rye Lol p 5b	
32	Bio04B	PETALKKAVTAMSEAEK	5	Rye Lol p 5b	
105	Bio05 ori	NDKFTVFESAFNKALNE	5	Rye Lol p Va	*
33	Bio05B	KFTVFESAFNKALNE	5	Rye Lol p Va	

106	Rye05 ori	DVNAGFKA AVAAAAANAPPA D	5	Rye Lol p Va	*
34	Rye05A	FKA AVAAAAANAPPADKFK	5	Rye Lol p Va	
35	Rye05C	NAGFKA AVAAAAANAPPK	5	Rye Lol p Va	
107	Rye06 ori	GATPEAKYDAFVTALTEALR	5	Rye Lol p Va	*
36	Rye06A	KYDAFVTALTEALR	5	Rye Lol p Va	
37	Rye06B	PEAKYDAFVTALTEALR	5	Rye Lol p Va	

ES 2 532 759 T3

108	Rye07 ori	GELQIVDKIDA AFKIAATAA NAAPTNDKF	5	Rye Lol p Va	*
38	Rye07A	GELQIVDKIDA AFK	5	Rye Lol p Va	
39	Rye07B	KIPTGELQIVDKIDA	5	Rye Lol p Va	
40	Rye07G	FKIAATAANAAPTNDK	5	Rye Lol p Va	
41	Rye07H	AFKIAATAANAAPTNDK	5	Rye Lol p Va	
109	Rye08 ori	GAYETYKFIPSLEAAVKQAY	5	Rye Lol p Va	*
42	Rye08	YKFIPSLEAAVKQAY	5	Rye Lol p Va	
43	Rye08A	ETYKFIPSLEAAVKQAY	5	Rye Lol p Va	
44	Rye08B	DSYKFIPTLVAVK	5	Rye Lol p Va	
110	Rye09 ori	PEVKYAVFEAALTKAITAMT QAQKAGKPAKA	5	Rye Lol p Va	*
45	Rye09A	LTKAITAMTQAQKAGK	5	Rye Lol p Va	
46	Rye09B	PEVKYAVFEAALTKAIT	5	Rye Lol p Va	
47	Rye09D	KYAVFEAALTKAITAMT	5	Rye Lol p Va	
48	Rye 11	DKFKIFEAAFSESSK	5	Rye Lol p Va	
49	Rye 13	TPLRRTSSRSSRP	5	Rye Lol p Va	
50	Rye 14	DVAYKAAEAHPRGQ	5	Rye Lol p Va	
51	Rye 15	ALRVIAGTLEVHA	5	Rye Lol p Vb	
52	Rye 16	FENTFNNAIKVSLG	5	Rye Lol p Vb	
111	Tim10 ori	PEVKYTVFETALKKAITAMS EAQ	5	Tim Phl p 5	*
53	Tim10B	KYTVFETALKKAITAMSE	5	Tim Phl p 5	
54	Tim10C	LKKAITAMS	5	Tim Phl p 5	
55	Tim10D	PETALKKAITAMS	5	Tim Phl p 5	

Tim = Hierba Timotea; Rye = Raigrás; Cyn = Grama común

Cualquiera de los péptidos indicados anteriormente que tienen un resto de glutamato (E) o glutamina (Q) en el extremo N, por ejemplo el Rye 08A, puede que tenga este resto remplazado por piroglutamina para mejorar la

estabilidad durante la fabricación, sin afectar la función del péptido. Los datos de más ensayos de estos péptidos se obtienen típicamente utilizando péptidos donde tienen lugar tales remplazos.

Se llevó a cabo un EpiMatrix más en las secuencias enteras de tres secuencias conocidas de hierba Timotea: Hierba Timotea Phl p 1 (N° de registro NCBI 1N10A), Hierba Timotea Phl p Va (N° de registro NCBI Q40962), y Hierba Timotea Phl p Vb (N° de registro Q40963). Este análisis identificó más péptidos centrales (y sus secuencias flanqueantes) en los que se había previsto que tenían una buena unión al MHC clase II. Estas secuencias se muestran posteriormente en las Tablas 3A-C. En cada tabla:

“Restos de la secuencia principal” da la localización del péptido en la secuencia que se analizaba. El péptido central (aminoácidos centrales resaltados en negrita) define la secuencia de unión actual que se identificó durante el análisis. Los flancos de estabilización (del extremo N y extremo C, no negrita) se incluyeron para su uso con la secuencia central y se necesitan típicamente para ayudar a la fabricación de los péptidos. “Número de éxitos” se refiere al número de afinidades de unión previstas como altas para todos los tipos de MHC ensayados con la secuencia. La “puntuación del Grupo EpiMatrix” se deriva del número de éxitos normalizados por la longitud del grupo. La Puntuación del Grupo es por tanto, el exceso, o escasez en las propiedades de unión previstas añadidas con respecto a un péptido de referencia aleatorio. Una puntuación por encima de 10 se considera que indica amplias propiedades de unión al MHC.

Tabla 3
A) 1N10A – Phl p 1

RESTOS EN LA SECUENCIA PRINCIPAL (INCLUIDOS LOS FLANQUEANTES)	SECUENCIA	Hidrofobia	ÉXITOS EpiMatrix (EXCLUYENDO FLANQUEANTES)	PUNTUACIÓN DE GRUPOS EpiMatrix (EXCLUYENDO FLANQUEANTES)	SEC ID N°
120 - 142	GDEQK LR SAGELELQ FRRV K CKY	-1,15	10	13,23	20
157 - 175	NPNYLALLV KYV NGDGDVV	0,19	8	14,11	21
191 - 209	KES WGAI WRIDTPDKLTGP	-0,85	8	13,79	22
229 - 241	PEG WKAD TSYESK	-1,77	6	12,78	23

B) Q40962 – Phl p Va

RESTOS EN LA SECUENCIA PRINCIPAL (INCLUIDOS LOS FLANQUEANTES)	SECUENCIA	Hidrofobia	ÉXITOS EpiMatrix (EXCLUYENDO FLANQUEANTES)	PUNTUACIÓN DE GRUPOS EpiMatrix (EXCLUYENDO FLANQUEANTES)	SEC ID N°
42 - 60	IEKINAG FKA LAGAGVQP	0,41	8	13,04	56
55 - 78	GAGVQ PAD KYRTFVATFGPAS NK A	-0,32	12	17,23	57
98 - 122	ALTSK LDA AYK LAYK TAEGAT PE AK	-0,38	11	14,26	58
164 - 184	IEK VDA AFK VAA TAANAAPAN	0,37	9	12,44	59
206 - 226	YESY KFI PALEAA VKQ AYAAT	0,04	8	14,18	60
232 - 253	EVKY TVF ETALK KAIT MSE QA	-0,06	12	17,18	61

C) Q40963 – Phl p Vb

ES 2 532 759 T3

RESTOS EN LA SECUENCIA PRINCIPAL (INCLUIDOS LOS FLANQUEANTES)	SECUENCIA	Hidrofobia	ÉXITOS EpiMatrix (EXCLUYENDO FLANQUEANTES)	PUNTUACIÓN DE GRUPOS EpiMatrix (EXCLUYENDO FLANQUEANTES)	SEC ID N°
49 - 69	DINVGFKAAVAAAASVPAADK	0,63	13	21,17	62
115 - 138	FDSFVASLTEALRVIAGALEV HAV	1,10	11	15,59	63
158 - 176	IDKIDAAFKVAATAAATAP	0,66	8	13,93	64
206 - 232	IPSLEAAVKQAYAATVAAAPQ VKYAVF	0,69	11	12,1	65
229 - 247	YAVFEAALTKAITAMSEVQ	0,66	9	14,1	66

Ejemplo 2

Búsqueda de homólogas

5 Las secuencias de cada uno de los péptidos identificados anteriormente como de unión al MHC Clase II se utilizaron para sondear la secuencia de proteínas alternativas en el grupo de alérgenos a las plantas herbáceas del que se derivaba la secuencia parental. Por ejemplo, el péptido Rye01 es de Lol p 1, por lo tanto se utilizó la secuencia de Rye01 para sondear las secuencias conservadas en el Grupo 1 de otras especies herbáceas, en particular la Timotea. Los resultados de este análisis se muestra posteriormente para los restos de Lol p 1 del Raigrás como se indica, en comparación con las correspondientes secuencias de Phl p 1 de Timotea y Cyn d1 de la Grama común:

19-38 Raigrás: LDAKSTWYGKPTGAGPKDNG (RYE 01 ori)
Timotea LDAKSTWYGKPTGAGPKDNG

109-128 Raigrás: GHAFGSMAMKKGEEQNVRSA (Rye 02 ori)
Timotea
Cyn d 1 109-128: GHAFGAMAKKGDEQKLRSA
SGKAFGAMAKKGQE DKLRKA

154-173 Raigrás: GSNPNYLAILVKYVDGDGDV (Rye03 ori)
Timotea GSNPNYLALLVKYVNGDGDV

190-209 Raigrás: KESWGAVWRIDTPDKLTGPF (Rye04 ori)
Timotea
Cyn d 1 181-209 GKDKWIELKESWGAIWRIDTPDKLTGPF
PKDSDEFIPMKSSWGAIWRIDPKKPLK

Cyn d 1 217-241 EGGAHLVQDDVIPANWKPDTVYT SK
EGGTKTEAEDVIPEGWKADTSYESK
Timotea

15 De manera similar, se muestran a continuación los resultados para los restos de Lol p 5 de Raigrás como se indica, en comparación con las secuencias correspondientes de variantes Phl p5 de Timotea como se indica:

37-56 Raigrás: DVNAGFKAAVAAAANAPPAD (Rye 05 ori)
Phl p 5a KINAGFKAALAGAGVQPAD
Phl p Va KINAGFKAALAGAGVQPAD
Phl p 5 KINDGFKAALAAAAGVPPAD
Phl p Vb DINVGFKAAVAAAASVPAAD
Phl p Vb DINVGFKAAVAAAASVPAAD

ES 2 532 759 T3

100-119 Raigrás:	GATPEAKYDAFVTALTEALR	(Rye 06 ori)
Phl p 5a	GATPEAKYDAYVATLSEALR	
Phl p Va	GATPEAKYDAYVATLSEALR	
Phl p 5	GATPEAKYDAYVATLSEALR	
Phl p Vb	GATPEAKFDSFVASLTEALR	
Phl p Vb	GATPEAKFDSFVASLTEALR	
145-164 Raigrás:	GELQIVDKIDAAFKIAATAA	(de Rye 07 ori)
Phl p 5a	GELQVIEKDAAFKVAATAA	
Phl p Va	GELQVIEKVDAAFKVAATAA	
Phl p 5	GELQFIEKVDSALKVAATAA	
Phl p Vb	GELQIIDKIDAAFKVAATAA	
Phl p Vb	GELQIIDKIDAAFKVAATAA	
154-173 Raigrás:	DAAFKIAATAANAAPTNDKF	(de Rye 07 ori)
Phl p 5a	DAAFKVAATAANAAPANDKF	
Phl p Va	DAAFKVAATAANAAPANDKF	
Phl p 5	DSALKVAATAANAAAANDKF	
Phl p Vb	DAAFKVAATAAATAPADDDKF	
Phl p Vb	DAAFKVAATAAATAPADDDKF	
190-209 Raigrás:	GAYETYKFIPSLEAAVKQAY	(Rye 08 ori)
Phl p 5a	GAYESYKFIPALEAAVKQAY	
Phl p Va	GAYESYKFIPALEAAVKQAY	
Phl p 5	GAYESYKFIPALEAAVKQAY	
Phl p Vb	GAYDTYKCIPSLEAAVKQAY	
Phl p Vb	GAYDTYKCIPSLEAAVKQAY	
217-236 Raigrás:	PEVKYAVFEAALTKAITAMT	(de Rye 09 ori)
Phl p 5a	PEVKYTVFETALKKAITAMS	
Phl p Va	PEVKYTVFETALKKAITAMS	
Phl p 5	PEVKYTVFETALKKAITAMS	
Phl p Vb	PEVKYTVFETALKKAITAMS	
Phl p Vb	AEVKYAVFEAALTKAITAMS	
226-245 Raigrás:	AALTKAITAMTQAQKAGKPA	(de Rye 09 ori)
Phl p 5a	TALKKAITAMSEAQKAAKPA	
Phl p Va	TALKKAITAMSEAQKAAKPA	
Phl p 5	TALKKAITAMSEAQKAAKPA	
Phl p Vb	AALTKAITAMSEVQKVSQPA	
Phl p Vb	AALTKAITAMSEVQKVSQPA	

Basándose en las secuencias de las proteínas de la hierba Timotea que estaban altamente conservada con las secuencias de Raigrás seleccionadas en el Ejemplo 1, se predijo que los péptidos adicionales derivados de estas secuencias tenían buenas propiedades de unión al MHC. Estos péptidos adicionales se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

<u>Péptidos del Grupo 1</u>				
SEC ID N°	Nombre del péptido	Secuencia peptídica	Grupo	Proteína
24	Tim02	FGAMAKKGDEQKLRSG	1	Tim Phl p 1
25	Tim02A	HAFGAMAKKGDEQKLRSG	1	Tim Phl p 1
26	Tim03A	SNPNYLALLVKYVNGD	1	Tim Phl p 1
27	Tim04A	WGAIWRIDTPDKL	1	Tim Phl p 1
<u>Péptidos del Grupo 5</u>				
67	Tim05A	FKAAVAAAASVPAADKFK	5	Tim Phl p 5
68	Tim06A	KFDSFVASLTEALR	5	Tim Phl p 5
69	Tim07B	KIPAGELQIIDKIDA	5	Tim Phl p 5
70	Tim07G	FKVAATAANAAPANDK	5	Tim Phl p 5
71	Tim08	YKFIPALEAAVKQAY	5	Tim Phl p 5
72	Tim08A	PEESYKFIPALEAAVKQAY	5	Tim Phl p 5
73	Tim09A	LTKAITAMSEVQKVSQ	5	Tim Phl p 5

Ejemplo 35 *Análisis de unión in vitro*

Los péptidos que se identificaron como que tenían un potencial de unión al MHC Clase II se pre-seleccionaron por solubilidad en un medio acuoso, ácido, y se ensayaron los péptidos en un ensayo de unión al MHC Clase II in vitro.

10 **Métodos**

El ensayo empleado es un ensayo de unión competitiva al MHC Clase II, en el que en cada péptido se analiza su habilidad para desplazar un enlazador control conocido de cada uno de los alotipos de MHC Clase II humanos investigados. Los alotipos y los péptidos de control utilizados en este estudio son típicamente los que se muestran a continuación:

15

Alotipo	Péptido de control	Secuencia
DRB1 *0301	Myco. tuberculosis/leprae hsp 65 2-16	AKTIAYDEEARRGLE
DRB1 *1101	Hemaglutinina de Influenza 307-319	PKYVKQNTLKLAT
DRB1 *1501	Proteína mielina básica humana 85-99	ENPVVHFFKNIIVTPR
Péptidos de control utilizados en los ensayos de unión in vitro		

Cada uno de los péptidos de las Tablas 2 a 4 (excluyendo los marcados con *) se analizaron en el ensayo de competición y se seleccionaron por su unión relativa comparada con los péptidos de control. Debido a la naturaleza de los ensayos competitivos los datos de cada péptido se determinaron como una relación de su propia CI50 respecto a la del péptido de control. Por tanto, un péptido que tiene un valor de la CI50 que es pareja al del péptido de control tiene una afinidad de unión idéntica, mientras que los péptidos con una relación menor de uno tienen una mayor afinidad y los que tienen una relación mayor de uno tienen una menor afinidad.

20

La solubilidad en solución acuosa es un criterio esencial para que un péptido sea un agente terapéutico eficaz. Por lo tanto, como consecuencia de la selección por solubilidad se eliminarán péptidos muy hidrófobos con una alta frecuencia de restos de aminoácidos hidrófobos en múltiples registros de unión. Esto es una característica de los enlazadores promiscuos HLA-DRB1*. Se identificaron los péptidos que se unen a uno o más alotipos del MHC Clase II. Se debería esperar que tales péptidos tendrían la capacidad de unirse a alotipos similares que no se han ensayado debido a la homología de las estructuras MHC.

30

Ejemplo 4

Se aplicó el siguiente método a los mismos péptidos como en el Ejemplo 3.

5 *Ensayo de proliferación celular*

El ensayo de proliferación celular se llevó a cabo en PBMC (se necesitan 140×10^6 células para todos los parámetros que se van a ensayar). Se midió la proliferación por la incorporación de un compuesto radiomarcado 3H-timidina. En más detalle, se distribuyeron 100 μ l de la concentración apropiada del antígeno o péptido en los pocillos adecuados de las placas de 96 pocillos. Las placas se colocaron entonces en una incubadora humificada con un 5% de CO₂ fijada a 37 °C durante un máximo de 4 horas. Las PBMC aisladas como se ha descrito anteriormente se prepararon a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio completo a temperatura ambiente. Entonces, se distribuyeron 100 μ l de la solución celular en cada uno de los pocillos de placas de 96 pocillos que contenían antígeno/péptido. Las placas se incubaron entonces durante 6 a 8 días. Los cultivos se pulsaron con la solución de timidina tritiada añadiendo 10 μ l de solución madre de timidina tritiada (1,85 MBq/ml en medio RPMI libre de suero) a cada pocillo. Las placas se volvieron a poner en la incubadora durante entre 8 y 16 horas. Los cultivos se recolectaron entonces utilizando el recolector celular Canberra Packard FilterMate 196. Las mallas secas del filtro se contaron utilizando un contador de centelleo beta apropiado.

20 Los recuentos de los pocillos que contenían el péptido se compararon estadísticamente con los pocillos que solo contenían medio (12 pocillos por grupo). Se utilizó el ensayo de Mann-Whitney no paramétrico. Se utilizó el mismo ensayo estadístico para todos los sujetos. Una diferencia significativa estadísticamente entre los pocillos con medio solamente y los pocillos con péptido estimulado se consideraron positivas a la estimulación de las PBMC por el péptido.

25 Ejemplo 5

Se seleccionaron 59 péptidos identificados por el análisis EpiMatrix del Ejemplo 1 que englobaban uno o más de los epítomos previstos que se unían al menos a 5/8 alelos MHC Clase II (HLA DR01, 03, 04, 07, 08, 11, 13, 15) para estudios posteriores. En muchos casos se previó que los epítomos se unirían al total de 8 de estos alelos. Algunas secuencias tenían uno o más epítomos solapados o no solapados pero epítomos estrechamente cercanos que se unían al mismo o diferentes alelos del MHC Clase II. Los péptidos seleccionados se muestran en las Tablas 5A y 5B posteriormente.

35 Se ensayaron 44 péptidos en cuanto a su actividad con el ensayo in vitro de liberación de citoquinas por las células T que se ha descrito utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 48 individuos alérgicos a las plantas herbáceas. Se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre heparinizada por centrifugación con gradiente de densidad de Ficoll. Los resultados se muestran en la Tabla 5A. Se ensayó otro grupo de 15 péptidos en 28 sujetos alérgicos a las plantas herbáceas. Los resultados se muestran en la Tabla 5B. Los sujetos eran de Hamilton y el área circundante en Ontario, Canadá. Se ensayaron los péptidos en cuanto a la estimulación de la producción de interferón gamma (IFN-gamma), Interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13) en los sobrenadantes de los cultivos de PBMC.

45 *Ensayos de liberación de citoquinas*

Se analizaron los perfiles de secreción de citoquinas de las PBMC en respuesta a la estimulación por los péptidos. Se ensayaron los sobrenadantes del ensayo de liberación de citoquinas se ensayaron en cuanto a la presencia de 3 citoquinas, IFN- γ , IL-10 e IL-13, utilizando ensayos ELISA. La presencia de las 3 citoquinas se ensayó utilizando una matriz de perlas multiplex (Luminex Corporation). El ensayo de liberación de citoquinas típicamente necesita 4×10^6 PBMC por sujeto. En más detalle, se distribuyeron 250 μ l de una solución de 200 μ g/ml de la concentración apropiada del antígeno o péptido en los pocillos adecuados de placas de 48 pocillos. Las placas se incubaron entonces en una incubadora humificada con el 5% de CO₂ a 37 °C durante un máximo de 4 horas. Se añadieron entonces 250 μ l de una suspensión de 5×10^6 PBMC a cada pocillo y las placas se volvieron a colocar en la incubadora durante 5 días. Tras la estimulación, se recolectaron las muestras de sobrenadante del cultivo para ensayarlo con el ensayo de perlas multiplex según los protocolos de referencia. Típicamente, las muestras se recolectaron en 3 alícuotas y se congelaron hasta que se llevaran a cabo los ensayos ELISA.

Un resultado positivo de la estimulación de la secreción de citoquinas se tomaba cuando la lectura era mayor de cuatro veces el pocillo de control, en el que no se había añadido el péptido. Los péptidos que daban un resultado positivo para una o más citoquinas en más de 18 de los 48 sujetos del primer grupo o 9 de los 28 sujetos del segundo grupo se consideraron particularmente útiles en el tratamiento de la alergia a las plantas herbáceas. 20 de los 44 péptidos ensayados del primer grupo de 48 sujetos, y 8 de los 15 péptidos ensayados en el segundo grupo de 28 sujetos cumplían los criterios anteriores.

65

ES 2 532 759 T3

La Tabla 5A muestra el número de positivos para las tres citoquinas del grupo de 48 y la Tabla 5B muestra el número de positivos para las tres citoquinas del grupo de 28. Los péptidos preferidos que cumplen los criterios definidos anteriormente se resaltan en negrita.

5

Tabla 5A

Péptido	IFN- γ +/48	IL-13 +/48	IL-10 +/48	>18/48 + para una o más citoquinas?
Ber01	35	22	34	Sí
Ber02	26	21	15	Sí
Ber02A	17	15	7	No
Ber02B	22	17	3	Sí
Ber02C	29	18	9	Sí
Ber03A	8	7	23	Sí
Bio02A	15	12	31	Sí
Bio03A	26	19	9	Sí
Bio04A	28	16	37	Sí
Bio04B	22	16	27	Sí
Bio05B	8	8	34	Sí
Rye01	12	5	2	No
Rye01A	2	4	4	No
Rye02	4	5	1	No
Rye02A	12	6	1	No
Rye03A	3	5	0	No
Rye04	6	3	1	No
Rye04A	8	4	2	No
Rye05A	13	10	3	No
Rye05C	20	19	12	Sí
Rye06A	11	15	5	No
Rye06B	11	7	5	No
Rye07A	8	3	25	Sí
Rye07B	10	3	1	No
Rye07G	7	3	2	No
Rye07H	10	8	4	No
Rye08	9	6	2	No
Rye08A	18	9	32	Sí
Rye09A	6	5	11	No
Rye09B	28	24	16	Sí
Tim02	16	6	3	No
Tim02A	6	9	2	No
Tim03A	9	9	4	No
Tim04A	16	4	31	Sí

Péptido	IFN- γ +/48	IL-13 +/48	IL-10 +/48	>18/48 + para una o más citoquinas?
Tim05A	15	12	9	No
Tim06A	17	11	11	No
Tim07B	23	18	41	Sí
Tim07G	19	20	10	Sí
Tim08	16	17	14	No
Tim08A	21	10	8	Sí
Tim10B	16	24	22	Sí
Tim10C	6	4	3	No
Tim10D	28	8	3	Sí

Tabla 5B

Péptido	IFN- γ +/28	IL-13 +/28	IL-10 +/28	\geq :9/28 + para una o más citoquinas?
Bio02D	21	8	21	Sí
Bio02E	13	2	24	Sí
Bio04	12	5	8	Sí
Bio05	11	5	1	Sí
Bio03B	13	8	4	Sí
Rye04B	3	6	0	No
Rye07A	1	4	1	No
Rye08B	2	3	1	No
Rye09D	6	4	13	Sí
Rye11	4	10	3	Sí
Rye12	10	8	5	Sí
Rye13	6	1	0	No
Rye14	5	3	0	No
Rye15	1	0	1	No
Rye16	4	3	4	No

Ejemplo 6

5

Criterios para clasificar los péptidos de plantas herbáceas individuales

Los 28 péptidos que se seleccionaron por ser particularmente útiles en el tratamiento de la alergia a plantas herbáceas basándose en los criterios utilizados en el Ejemplo 5 se evaluaron además con el fin de comparar sus características. Esto implicaba el cálculo de la respuesta acumulada observada para las 3 citoquinas por cada péptido, es decir, la puntuación total (la suma del número que respondía a las tres citoquinas). También se consideraron los aspectos de desarrollo farmacéutico para cada péptido basándose en las propiedades físicas y químicas, en particular la solubilidad, pI e índice de hidrofobia (GRAVY). También se utilizó el software EpiMatrix para predecir la fuerza de unión a los alelos HLA DR del MHC Clase II, con valores que se muestran como de alta (1%), media (5%) y baja (10%) afinidad para cada alelo HLA DR del MHC Clase II que se muestran.

Los resultados de este análisis para 14 péptidos particularmente preferidos se muestran en la Tabla 6. Estos péptidos particularmente preferidos se colocan en un orden de importancia interno de 1 a 14 que corresponde con la evaluación de los inventores sobre su utilidad relativa para el tratamiento de la alergia a las plantas herbáceas. Los 14 péptidos se clasificaron de acuerdo principalmente con la puntuación total (suma del número de los que respondía a las tres citoquinas) con algo del peso situado en la respuesta a IFN-gamma. El recuento también se

tomó en los aspectos de desarrollo farmacéutico y el cubrimiento del MHC, como se ha señalado anteriormente.

Tabla 6

Péptido	Puntuación Total	Pi	GRAVY	Análisis EpiMatrix de afinidad de unión MHC			Solubilidad mg/ml	Puesto en la clasificación
				1%	5%	10%		
Ber01	91	8,22	-0,94	08,11	01,08,15	03,04,08	>20	1
Ber02	62	8,75	-0,26		01, 04, 08, 11, 13	11,15	>20	5
Ber02B	42	6,12	-0,75		01, 04, 08, 11, 13	11,15	>20	13
Ber02C	56	10,46	-0,941	03,07,08	01, 11	04,13,15	>20	6
Bio02A	58	6,07	-0,157	01,04,07	08, 11, 13	03,15	>20	8
Bio03A	54	10,00	0,344	03	01, 03, 04, 08, 11, 13, 15		>20	7
Bio04A	81	8,50	-0,377	04	01, 03, 04, 08, 11,13		>20	3
Rye05C	51	10,00	0,176	01,04	03, 08, 11, 13	04,15	10	11
Rye08A	58	6,24	-0,194	01,03,04, 11	13, 15	07	>20	9
Rye09B	68	6,56	0,447	01,07	01,04, 11, 15	03,08, 13	5	4
Tim04A	51	5,96	-0,408	03,04,07	01, 11	08, 15	2	12
Tim07B	82	4,56	0,107		03, 11, 15	01, 13	0.56	2
Tim07G	49	8,59	-0,062		01, 04, 05, 15	03, 07, 11	>20	14
Tim10B	62	8,43	-0,017	04	01, 03, 04, 08, 11, 13		1.65	10

- 5 El orden de clasificación para los péptidos de plantas herbáceas particularmente preferidos es esta: 1, Ber01, (SEC ID N° 1), Cyn d 1; 2, Tim07B (SEC ID N° 69), Phl p 5; 3, Bio04A (SEC ID N° 31), Lol p 5; 4, Rye09B (SEC ID N° 46), Lol p 5; 5, Ber02 (SEC ID N° 2), Cyn d 1; 6, Ber02C (SEC ID N° 5), Cyn d 1; 7, Bio03A (SEC ID N° 29), Lol p 5; 8, Bio02A (SEC ID N° 28), Lol p 5; 9, Rye08A, (SEC ID N° 43), Lol p 5; 10, Tim10B, (SEC ID N° 53), Phl p 5; 11, Rye05C (SEC ID N° 35), Lol p 5; 12, Tim04A (SEC ID N° 27), Phl p 1; 13, Ber02B (SEC ID N° 4), Cyn d 1; 14, Tim07G (SEC ID N° 70), Phl p 5.

15 Sorprendentemente, el péptido clasificado en primer lugar, Ber01 y también otros 3 péptidos en los primeros 14 (Ber02, Ber02C y Ber02B) se derivaban del alérgeno Cyn d 1 de la Grama común. La Grama común es una especie perenne de estaciones cálidas adaptada a los climas tropicales y subtropicales, crece bajo largos periodos de altas temperaturas, inviernos suaves y pluviosidad moderada a alta. La temperatura es el factor medioambiental principal que limita su adaptabilidad a las áreas tropicales y subtropicales del mundo. Los límites septentrionales de la Grama común, se extienden desde la zona transicional de Estados Unidos donde las bajas temperaturas raramente caen por debajo de los -12,22 °C. Por esta razón no se esperaría que los alérgenos de Grama común fueran de los principales alérgenos reconocidos en sujetos de Canadá. Además, el Raigrás perenne, aunque está presente, no es la planta herbácea más común en Canadá y 6 de los 14 péptidos mejor clasificados (Bio02A, Bio03A, Bio04A, Rye05C, Rye08A, Rye09B) se derivaban de alérgenos del Raigrás perenne.

25 A continuación, un resumen de los tipos de plantas herbáceas prevalentes en Canadá. Casi todas las plantas herbáceas forrajeras de Canadá son cultivares mejorados de especies europeas. Las diferentes plantas herbáceas han adaptado su crecimiento a diferentes áreas de Canadá, dependiendo del suelo y las condiciones climáticas. La Timotea (*Phleum pratense*) es la planta herbácea que crece más ampliamente fuera de las partes secas de la región, y es la hierba forrajera dominante en el este de Canadá. El Agropiro (*Agropyron cristatum*) es una hierba forrajera dominante en Canadá occidental. El Dactilo (*Dactylis glomerata*) y el Raigrás silvestre ruso (*Elymus junceus*) son hierbas forrajeras dominantes en la Columbia Británica. El Bromo inerme (*Bromus inermis*) crece en el este de Canadá y en la región de las Praderas. La hierba azul de Kentucky (*Poa pratensis*) crece comúnmente en muchas áreas. En términos de hierbas pratenses, la hierba de 3 aristas (*Aristida longiseta*) se encuentra en regiones áridas de la Columbia Británica, y el arroz silvestre (*Zizania aquatica*) en los lagos del este de Canadá. Ciertos géneros (por ejemplo, *Arctagrostis* y *Arctofila*) son nativas del Ártico canadiense. Las plantas herbáceas para el césped se desarrollan a partir de especies que muestran las características deseadas, por ejemplo, densidad de crecimiento, rápido crecimiento tras la siembra, capacidad de permanecer verde, etc. En Canadá la resistencia al frío y la resistencia a la sequía frecuente también son importantes. Las mezclas de césped canadienses populares a

menudo incluyen especies de Poa (por ejemplo, hierba azul de Kentucky, hierba azul de tallo áspero) y Festuca (especialmente festuca roja trepadora, festuca masticable), aunque se han desarrollado otras especies útiles.

- 5 Basándose en la prevalencia de los tipos de plantas herbáceas en Canadá, la observación de que los individuos de origen canadiense respondan altamente a los péptidos de la Grama común y Raigrás perenne es inesperado. Tales péptidos por lo tanto tienen el potencial de tener una amplia utilidad en el tratamiento de individuos alérgicos por todo el mundo. También, los péptidos de los que se encontró que inducían altos niveles de respuesta (es decir, una alta puntuación) comúnmente se derivan de alérgenos proteicos descritos convencionalmente como “alérgenos menores”, por ejemplo, Lol p 5 y Phl p 5. Los principales alérgenos de Timotea y Raigrás perenne que se reconocen por anticuerpos IgE en sujetos alérgicos a las plantas herbáceas son, respectivamente, Phl p 1 y Lol p 1. La inducción de anticuerpos contra estos alérgenos principales en individuos alérgicos es un proceso dependiente de las células T y por lo tanto se esperaría que los péptidos que inducen altos niveles de respuesta de células T serían principalmente del Phl p1 y Lol p 1.
- 10
- 15 La determinación de los 14 péptidos estimuladores de células T mejor clasificados del grupo de 59 péptidos ensayados en el Ejemplo 5, y particularmente la identificación de los 8 péptidos mejor clasificados que se pueden utilizar más óptimamente en combinación implica una selección estrecha y específica. Un subgrupo estrecho de combinaciones se identificaron de un gran número de inicialmente combinaciones posibles de péptidos. El número total de combinaciones posibles para seleccionar 8 péptidos de los 14 péptidos clasificados es de 3003. Este número de combinaciones (3003) representa una proporción muy pequeña de posibles combinaciones de 8 péptidos con respecto al grupo original de 73 péptidos (13.442.126.049). La posibilidad para identificar los ocho péptidos mejor clasificados por suerte es por lo tanto minúscula.
- 20

25 Ejemplo 7

Combinaciones de péptidos de plantas herbáceas

- 30 Las combinaciones de péptidos basadas en selecciones de los 8 péptidos mejor clasificados se investigaron con vistas a identificar las vacunas óptimas para el tratamiento de la alergia a las plantas herbáceas. Los ensayos de citoquinas se llevaron a cabo como en el Ejemplo 5 para cada mezcla. Los resultados de 10 combinaciones óptimas se enumeran en la Tabla 7. La combinación 1 es la combinación más óptima y comprende todos los 8 péptidos clasificados. Se debería señalar que estas combinaciones específicas representan una proporción minúscula del número de posibles combinaciones de péptidos que se exploran en los Ejemplos 1 y 2.
- 35 Las mezclas vacunales óptimas de plantas herbáceas se seleccionaron basándose en la demostración de una liberación significativa de IFN- γ , IL-10 e IL-13 en una gran proporción del grupo de estudio de 48 individuos alérgicos. Como tal, proporcionando péptidos de plantas herbáceas individuales preferidos en combinación se aumenta la cobertura MHC y se proporciona un producto optimizado de utilidad general como vacuna de plantas herbáceas. Las mezclas vacunales óptimas de plantas herbáceas también se seleccionaron basándose en consideraciones de fabricación, incluyendo las características físicas y químicas de cada péptido de la combinación.
- 40

Tabla 7

Combinación de péptidos	IL-10 +/48	IL-13 +/48	IFN- γ 10 +/48
1	47	41	48
2	47	41	48
3	47	39	48
4	46	39	48
5	44	39	47
6	41	39	46
7	47	40	48
8	46	40	48
9	44	40	48
10	40	40	48

Combinaciones:

- 1: Ber01; Ber02; Ber02C; Bio02A; Bio03A; Rye09B; Tim07B; Bio04A
- 2: Ber01; Ber02; Ber02C; Bio02A; Bio03A; Rye09B; Tim07B
- 5 3: Ber01; Ber02; Ber02C; Rye09B; Tim07B; Bio04A
- 4: Ber01; Ber02; Ber02C; Rye09B; Tim07B
- 5: Ber01; Ber02; Ber02C; Rye09B; Bio04A
- 6: Ber01; Ber02; Ber02C; Rye09B
- 7: Ber01; Ber02C; Bio03A; Rye09B; Tim07B; Bio04A
- 10 8: Ber01; Ber02C; Rye 09B; Tim07B
- 9: Ber01; Ber02C; Bio03A; Rye09B; Bio04A
- 10: Ber01; Ber02C; Bio03A; Rye09B

15 La combinación 1 es la combinación más óptima basándose en las características de liberación de citoquinas y comprende los 8 péptidos mejor clasificados. Esta combinación proporciona péptidos derivados de tres alérgenos de plantas herbáceas, Cyn d1 (Ber01; Ber02; Ber02C), Lol p 5 (Bio03A; Rye09B, Bio04A) y Phl p 5 (Tim07B). La combinación por lo tanto sirve para variaciones regionales en la exposición a alérgenos específicos, incluso aunque los datos del grupo de estudio canadiense sugieren que esto puede no ser un factor importante.

20 Se debería señalar que cada combinación óptima específica representa una proporción minúscula del número de posibles combinaciones de péptidos que se exploraron en los Ejemplos. Como se ha resaltado anteriormente, por ejemplo, la mezcla de ocho péptidos de la combinación 1 representa una de 13.442.126.049 combinaciones potenciales de los 73 péptidos seleccionados en los Ejemplos 1 y 2. Cada combinación óptima proporciona una liberación significativa de IFN- γ , IL-10 e IL-13 en $\geq 39/48$ individuos.

25 Es digno de mención que la alta cobertura MHC se mantiene en las Combinaciones 2 a 10 a pesar de la variación significativa tanto en el número de péptidos como en los péptidos específicos que se incluyen de los 8 mejores identificados en el Ejemplo 6. Se puede ver que incluso seleccionando una mezcla de 4 péptidos (Combinación 10) aún da un 100% de cobertura de respuesta IFN- γ y un 83% de cobertura para la respuesta de IL-10/IL-13. La combinación 10 se basa en 2 péptidos de Grama común y 2 péptidos de Raigrás perenne. La cobertura que se obtiene con tal mezcla es sorprendente, debido tanto la falta de prevalencia de estas plantas herbáceas en Canadá, como al hecho de que los péptidos de Lol p 1, un alérgeno principal reconocido por los anticuerpos IgE en los individuos alérgicos a las plantas herbáceas no está incluido.

35 Ejemplo 8

Mejora de la solubilidad

40 Dos de los 8 péptidos mejor clasificados, Rye09B y Tim07B, se identificaron por tener características de solubilidad que se podían mejorar (véase la Tabla 6). Para mejorar la solubilidad, se idearon varios análogos utilizando uno o más restos de lisina en los extremos N o C del péptido. Los péptidos se evaluaron en el software EpiMatrix para asegurar que las modificaciones no afectaban el epítipo de células T en el péptido y que no se había creado un neoepítipo. Dos variantes de péptidos se seleccionaron para el Rye09B (Rye09B1 y Rye09B2) y Tim07B (Tim07B1 y Tim07B2). Las secuencias se muestran en la Tabla 8 junto con los valores de solubilidad. Las variantes de Rye09B son dos veces más solubles que el péptido nativo. Las variantes de Tim07B eran más de veinte veces más solubles que el péptido nativo. Además de mejoría en la solubilidad, ambas variantes también mantenían su capacidad para inducir la liberación de citoquinas cuando se ensayaban en un grupo de 10 sujetos. Estas variantes de Rye09B y Tim07B por lo tanto son alternativas preferidas a los péptidos nativos, por ejemplo en cualquier mezcla de péptidos de plantas herbáceas para su uso en una vacuna terapéutica.

50

Tabla 8

Péptido	Secuencia	Solubilidad(mg/ml)	SEC ID N°
Rye09B1	KPEVKYAVFEAALTKAIT	10	91
Rye09B2	KKPEVKYAVFEAALTKAIT	10	92
Tim07B1	KKIPAGELQIIDKIDA	20	93
Tim07B2	KKIPAGELQIIDKIDAK	20	94

Ejemplo 9

55 Selección de una vacuna de plantas herbáceas preferida

Durante el intento de fabricación, se encontró que un péptido de los péptidos mejor clasificados presentes en la

Combinación 1 anterior (Bio03A) era difícil de fabricar debido a que tenía una banda de 5 aminoácidos hidrófobos contiguos. Cuando se evaluó el impacto de no incluir el Bio03A en una vacuna de plantas herbáceas, se analizó la cobertura total de los 7 péptidos mejor clasificados restantes presentes en la Combinación 1 para los 48 sujetos. En esta mezcla de 7 péptidos (Ber01, Ber02, Ber02C, Bio02A, Rye09B, Tim07B y Bio04A) se sustituyeron el Tim07B y Rye07B opcionalmente por las variantes Tim07B1 y Rye07B1 que tenían una solubilidad mejorada.

Con los 8 péptidos presentes, incluyendo Bio03A, 47/48 sujetos (IL-10), 41/48 sujetos (IL-13) y 48/48 sujetos (IFN-gamma) mostraban respuestas positivas de citoquinas. En comparación, con los siete péptidos presentes, excluyendo el Bio03A, 47/48 sujetos (IL-10), 40/48 sujetos (IL-13) y 48/48 sujetos (IFN-gamma) mostraban respuestas positivas de citoquinas. Por lo tanto se concluyó que había un pequeño impacto en la fabricación al no incluir el Bio03A en una vacuna de plantas herbáceas.

Las propiedades de respuesta de las combinaciones de péptidos anteriores se compararon con el extracto de polen de plantas herbáceas completo que contenía pólenes de Timotea, Raigrás perenne, y Grama común (Greer Laboratories) y un positivo control más, el mitógeno SEB. El extracto de polen de plantas herbáceas completo inducía respuestas de citoquinas en 11/48 (IL-10), 42/48 (IL-13) y 43/48 (IFN-gamma). La mezcla de siete péptidos proporciona así fuertes respuestas de citoquinas en porcentajes similares de la población que para el alérgeno de plantas herbáceas completo.

La selección de los péptidos Ber01, Ber02, Ber02C, Bio02A, Rye09B, Tim07B y Bio04A para una vacuna preferida de siete péptidos de plantas herbáceas también se basó en consideraciones de homología. Cuando estas siete secuencias de péptidos se comparaban entre las diferentes plantas herbáceas, hay una homología considerable en muchos casos lo que aumenta la probabilidad de que los individuos alérgicos a las plantas herbáceas respondan a los péptidos. Esto significa que los péptidos tienen una utilidad incluso se los sujetos que tiene una respuesta alérgica dominante es a una planta herbácea distinta de la Grama común, Timotea o Raigrás perenne. Las secuencias homólogas de otras plantas herbáceas para los siete péptidos anteriores se muestran en las SEC ID N^{os} 74 a 90 anteriores. Por ejemplo, el péptido Ber01 contiene el epítipo 9mérico FGAMAKKGQ que tiene homólogos muy cercanos en muchas otras plantas herbáceas comunes.

Además, los siete péptidos vacunales se derivaban de entre el grupo 1 y el grupo 5 de alérgenos de las tres plantas herbáceas más prevalentes (Timotea, Raigrás perenne y Grama común) e incluyen epítipos con homología completa o significativa con otras plantas herbáceas comunes (Pasto Ovillo, Holco, azul de Kentucky, y alpiste). Las siete secuencias peptídicas maximizan de esta manera la amplitud de cobertura de los individuos alérgicos al polen haciendo la vacuna adecuada para tratar todos los individuos alérgicos al polen.

Ejemplo 10

Ensayo de liberación de histamina

El propósito de este ensayo era identificar si la combinación de los siete péptidos preferidos del Ejemplo 9 era capaz de activar los basófilos de la sangre (como sustitutos de mastocitos tisulares) lo que da como resultado la liberación de histamina que puede dar lugar a reacciones alérgicas durante la terapia. Una combinación de péptidos que induce la liberación de histamina con frecuencia se puede considerar inadecuada para su uso como una vacuna peptídica.

La liberación de histamina necesita el entrecruzamiento de moléculas adyacentes de IgE específicas en la superficie de los basófilos. Los péptidos que se van a estudiar eran pequeños (10 a 18 aminoácidos de longitud) y no debería, por lo tanto, poseer una estructura terciaria significativa que les capacite para retener la conformación de un epítipo de unión a IgE de molécula completa. Además, los péptidos monoméricos en solución, incluso si están unidos a una IgE, no deberían ser capaces de entrecruzarse con moléculas de IgE adyacentes. Se evaluó la histamina liberada por los basófilos de sangre periférica aislados de sangre completa periférica obtenida de sujetos alérgicos a las plantas herbáceas. Se utilizaron los basófilos de sangre periférica como sustitutos de los mastocitos tisulares que no eran prácticos para ensayarse. El ensayo necesitaba 3×10^6 células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por sujeto. Se incubaron las PBMC in vitro con los siete péptidos de plantas herbáceas del Ejemplo 9 en combinación. La liberación de histamina en respuesta al extracto de alérgenos del polen completo que contenía pólenes de Timotea, Raigrás perenne, y Grama común (Greer Laboratories) se incluyó como un control. Se incluyó también un control positivo, representado por la liberación total de histamina, generada por la congelación/descongelación de las células dos veces en cada ensayo.

Las concentraciones de histamina se midieron por ELISA y se expresaron los resultados como un porcentaje del control positivo (% de control positivo). El ensayo se llevó a cabo utilizando el kit de Inmunoensayo de Liberación de Histamina Immunotech de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del desafío in vitro de las PBMC con péptidos, mezclas de péptidos, alérgenos completos o tampón en pocillos de placa microtiter, los sobrenadantes se eliminaron y la histamina de las muestras se convirtieron en acil histamina. Las muestras aciladas se ensayaron por un ELISA competitivo de acil histamina.

Se ensayó la capacidad de los péptidos para inducir la liberación de histamina sobre un intervalo de 5 log₁₀ (1 a 10.000 ng/ml). El intervalo de concentración que se ensayó se basaba en las dosis teóricas in vivo del péptido que se puede alcanzar durante la terapia. Basándose en el suministro de los péptidos por inyección intradérmica, podrían estar presentes altas concentraciones locales del péptido de hasta 10 µg/ml. Aunque es poco probable, existe un riesgo de que la dosis completa se inyecte en la circulación sanguínea. En este improbable caso, la dosis clínica máxima de 20 µg (12 nmol) de cada péptido que entra en un volumen sanguíneo de daría como resultado una concentración sanguínea máxima de 4,0 ng/ml. Esta está en extremo inferior del intervalo de dosis del ensayo de liberación de histamina y 2000 veces menor que la mejor concentración utilizada en el ensayo.

- 5
- 10 Una preparación de alérgeno de plantas herbáceas completo que contenía pólenes de *Timotea*, *Raigrás perenne* y *Gramma común* (Greer Laboratories) se utilizó como control para la liberación de histamina sobre un intervalo 5 log₁₀ de 10 a 100.000 mg/ml. Se generó un control negativo para la liberación de histamina espontánea incubando las células solo con tampón.
- 15 Se llevaron a cabo mediciones únicas de cada dilución. Tras terminar el ELISA, se determinaron los niveles de histamina individuales para la interpolación a partir de la curva de referencia generada en el ensayo ELISA. Los resultados de las muestras se ajustaron para permitir su dilución. Cuando dos o más diluciones consecutivas de una preparación de péptido/alérgeno produce > 15% de la liberación total de histamina que se ve en el control positivo congelado descongelado (> 15% del control positivo), o cuando se alcanza un valor único > 15% del control positivo a la concentración ensayada más alta (10 µg/ml para los péptidos), se consideró una "liberación de histamina positiva".
- 20

Se completaron un total de 45 ensayos de liberación de histamina durante el estudio. De estos, se rechazaron 3 ensayos, debido a niveles inaceptablemente altos (> 15%) de liberación de histamina en el medio más los pocillos de control negativo con tampón o ninguna respuesta en los pocillos del control positivo. Por lo tanto se incluyeron un total de 42 sujetos en el análisis. Los hallazgos del estudio se resumen en la Tabla 9.

- 25

Concentración proteica (mg/ml)	Sujetos con liberación de histamina positiva (>=15%)	Media de liberación de histamina (%control pos) n=42	Intervalo (%control pos)
Combinación de siete péptidos * (10)	0/42	0	0-4
Planta herbácea completa (100)	32/42	41	2-152
Planta herbácea completa (0.01)	21/42	24	0-84

* Combinación de siete péptidos: Ber01, Ber02, Ber02C, Bio02A, Rye09B1, Tim07B1 y Bio04A.

- 30 La preparación de alérgenos de plantas herbáceas completos inducía una liberación de histamina del 15% o mayor en 32/42 (76%) de los sujetos a 100 µg/ml. Incluso a la concentración más baja de 10 ng/ml, el alérgeno completo inducía altos niveles de liberación de histamina en 21/42 individuos (50%).

Por el contrario, la combinación de siete péptidos no podían producir liberación de histamina significativa en cualquiera de los 42 sujetos ensayados, incluso a la concentración más alta para los que se muestran los datos, donde cada péptidos estaba presente a 10 µg/ml. Esto es una concentración 1000 veces más altas que la concentración del alérgeno completo que sigue dando altos niveles de liberación de histamina en más de la mitad de los sujetos (10 mg/ml). La composición de siete péptidos, por tanto, tiene un potencial despreciable para producir reacciones mediadas por IgE incluso en individuos altamente sensibles.

- 35
- 40 Dado el gran exceso de dosis de péptido ensayado en este ensayo en comparación con las concentraciones probables de los péptidos siguiendo la dosificación clínica de una vacuna de plantas herbáceas, no se anticipó que la administración de la combinación de siete péptidos produciría una liberación significativa de histamina bien por activación o desgranulación de basófilos o mastocitos mediadas por IgE o mediada por el péptido directamente. Los datos de liberación de histamina indican que la combinación de siete péptidos no inducir la activación de basófilos y por lo tanto tiene un potencial muy bajo para inducir reacciones alérgicas agudas en individuos alérgicos a plantas herbáceas, sean sistémicas o localmente en la piel.
- 45

REIVINDICACIONES

1. Una composición adecuada para su uso en la prevención o tratamiento de la alergia a las plantas herbáceas, cuya composición comprende:
- 5 (a) el polipéptido que consiste en la secuencia KIPAGELQIIDKIDA, o una variante del mismo,
 (b) el polipéptido que consiste en la secuencia SGKAFGAMAKKGQED, o una variante del mismo, y
 (c) el polipéptido que consiste en la secuencia LKKAVTAMSEAEK, o una variante del mismo,
 10 Donde dicha variante es un polipéptido más largo de hasta 30 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia especificada en (a), (b) o (c).
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos una de dichas variantes del polipéptido de hasta 20 aminoácidos de longitud.
- 15 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos una de dichas variantes del polipéptido de hasta 17 aminoácidos de longitud.
4. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde (a) es el polipéptido que consiste en la secuencia KKIPAGELQIIDKIDA.
- 20 5. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende:
- (d) el polipéptido que consiste en la secuencia PEVKYAVFEAALTKAIT, o una variante del mismo,
 (e) el polipéptido que consiste en la secuencia FIPMKSSWGA, o una variante del mismo, y
 25 (f) el polipéptido que consiste en la secuencia KSSWGAIWRIDPKKPLK, o una variante del mismo,
 Donde dicha variante es un polipéptido más largo de hasta 30 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia especificada en (d), (e) o (f).
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5, donde (d) es el polipéptido que consiste en la secuencia KPEVKYAVFEAALTKAIT.
- 30 7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
- (a) el polipéptido que consiste en la secuencia KIPAGELQIIDKIDA, o una variante del mismo,
 35 (b) el polipéptido que consiste en la secuencia SGKAFGAMAKKGQED, o una variante del mismo,
 (c) el polipéptido que consiste en la secuencia LKKAVTAMSEAEK, o una variante del mismo,
 (d) el polipéptido que consiste en la secuencia PEVKYAVFEAALTKAIT, o una variante del mismo,
 (e) el polipéptido que consiste en la secuencia FIPMKSSWGA, o una variante del mismo,
 40 (f) el polipéptido que consiste en la secuencia KSSWGAIWRIDPKKPLK, o una variante del mismo, y
 (g) el polipéptido que consiste en la secuencia KYDAYVATLTEALR.
8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una solución donde cada polipéptido tiene una concentración en el intervalo de 0,03 a 200 nmol/ml.
- 45 9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, donde cada polipéptido tiene una concentración en el intervalo de 5 a 200 nmol/ml.
10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una formulación farmacéutica que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 50 11. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, que se formula para administración oral, administración tópica, administración nasal, administración subcutánea, administración sublingual, administración intradérmica, administración bucal, administración epidérmica o en parches o por administración por inhalación o por inyección.
- 55 12. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, para su uso en un método de prevención o tratamiento de la alergia a las plantas herbáceas.
13. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicho método es para la prevención o el tratamiento de la alergia a las plantas herbáceas en un ser humano.
- 60 14. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicho ser humano es alérgico a las plantas herbáceas.
- 65 15. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho humano:

- está sensibilizado contra uno o más alérgenos del polen de plantas herbáceas;
- tiene una historia familiar de alergia a las plantas herbáceas; o
- presenta síntomas de alergia cuando se expone a las plantas herbáceas.